

Софийски Университет “Св. Климент Охридски”  
Факултет по Химия и Фармация  
Катедра Неорганична химия

---

Марко Димитров Костадинов

**Наноструктурирани и аморфни  
калций-съдържащи фосфати  
като потенциални имунологични адюванти**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на  
образователната и научна степен “доктор”

4.2 Химически науки (Неорганична химия)

Научен ръководител: доц. дн Георги Йорданов

София, 2025

Дисертацията е написана на български език, съдържа 119 страници, включени са 80 фигури и 19 таблици. Цитирани са 127 литературни източника. Част от резултатите на дисертационния труд са публикувани в две научни публикации. Дисертацията е обсъдена и насочена за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по неорганична химия към Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“, състоял се на 25.09.2025 г.

**Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... 2025 г.  
от ..... часа в зала ..... на Факултета по химия и фармация  
на СУ „Св. Климент Охридски“.**

Съдържание:

1. Увод.....	3
2. Изводи от литературния обзор.....	4
3. Цел и задачи.....	5
4. Суспензии от смесени калциеви и магнезиеви фосфати .....	6
5. Суспензии от калциеви фосфати без добавена основа .....	13
6. Суспензии от калциеви фосфати с добавена основа .....	23
7. Резюме на основните резултати .....	34
8. Приноси.....	36
Литература .....	37
Научни публикации .....	40
Участия в научни конференции .....	40

## Използвани съкращения:

АКМФ – аморфен калциев магнезиев фосфат

ХА – хидроксилапатит

ХАДК – хидроксилапатит с дефицит на калций

ОКФ – октакалциев фосфат

ИК – индекс на кристалност

АН – алуминиев хидроксид

АР – алуминиев фосфат

СаР – калциев фосфат

MWH – магнезиев уитлокит

HSA – човешки серумен албумин

Tris – трис(хидроксиметил)аминометан

*или* 2-амино-2-(хидроксиметил)пропан-1,3-диол

SEM – сканираща електронна микроскопия

TEM – трансмисионна електронна микроскопия

STEM – сканираща трансмисионна електронна микроскопия

EDS – енергийно-дисперсионна спектроскопия

SAED – електронна дифракция от избран район

XRD – прахова рентгенова дифракция

WAXS – широкоъгълно рентгеново разсейване

FTIR – инфрачервена спектроскопия

MAS NMR – ядрено-магнитен резонанс с въртене под магичен ъгъл

ICP-OES – оптична емисионна спектроскопия с индуктивно свързана плазма

TGA – термогравиметричен анализ

## Величини

$d$  – диаметър на частици

$n$  – количество вещество

$\nu$  – вибрационен мод

$\zeta$  – дзета потенциал

$\theta$  – ъгъл (при XRD анализ)

## 1. Увод

Търсенето на подобрени ваксини, които са едновременно високоефективни и безопасни срещу различни инфекциозни заболявания, продължава да стимулира напредъка в адювантните системи. От 20-те години на XX век имунологичните адюванти играят решаваща роля в подобряването, разширяването и засилването на имунния отговор към антигени, когато се използват в комбинация с тях (Di Pasquale и съавт., 2015). Сред адювантите, използвани в лицензираните понастоящем ваксини, единствените неорганични варианти са базирани на алуминиеви съединения, по-специално алуминиев хидроксид (АН), алуминиев фосфат (АР) и алуминиев хидроксифосфат-сулфат. Тези съединения са неразделна част от ваксини срещу заболявания като тетанус, дифтерия, коклюш, хепатит А и В, човешки папиломен вирус (HPV) и други патогени. Въпреки че има някои изследвания на други неорганични адюванти, съдържащи Ca(II), Mg(II), Fe(III) и други, те все още не са част от лицензирани формулировки на ваксини (Maughan и съавт., 2015; Paneque-Quevedo, 2013). Освен във ваксини, адюванти се използват и при алерген-специфична и противотуморна имунотерапия (Jensen-Jarolim и съавт., 2021; Khalifehzadeh & Arami, 2020; Lin и съавт., 2024).

Неорганичните адюванти обикновено се състоят от гелобразни водни дисперсии, които съдържат първични частици с наноразмер (10-50 nm), които агрегират, образувайки по-големи вторични частици (1-20  $\mu\text{m}$ ) (Hem & HogenEsch, 2007). Тази структура е от решаващо значение за тяхната функция, тъй като пространствата около първичните частици осигуряват голяма повърхност, идеална за адсорбция на протеинови антигени върху тях. Размерът на вторичните частици от своя страна е оптимален за тяхното усвояване от макрофаги и други антиген-представящи клетки, повишавайки тяхната ефективност при доставяне на антигени до тези клетки (Morefield и съавт., 2005). Ако тези вторични агрегати са твърде големи, фагоцитозата ще бъде по-малко ефективна; ако са прекалено малки, те могат да попаднат в нецелели клетки, което да доведе до нежелани ефекти. Следователно, при разработването на нови адювантни системи се търсят характеристики като висок адсорбционен капацитет, размери на вторични агрегати в диапазона 1-20  $\mu\text{m}$ , стабилност при физиологични условия, трайност и възможност за стерилизация.

Базираните на алуминий адюванти (АР и АН) са добре установени в разработването на ваксини и препарати за имунологична десенсибилизираща терапия, служейки като еталонни материали. В сравнение с тях, калций-съдържащите адюванти понастоящем се използват по-

ограничено, но предлагат някои явни предимства. Въпреки че алуминиевите адюванти са известни със своята ефективност при предизвикване на силен имунен отговор, понякога те могат да причинят локални странични реакции на мястото на инжектиране. Базираните на калций адюванти, от друга страна, са свързани с по-малко локални странични ефекти и са биосъвместими, тъй като калцият е естествен компонент на човешкото тяло. Това е още по-важно при препаратите за имунотерапия, тъй като се прилагат много по-често и за по-дълъг период от време (Jensen-Jarolim и съавт., 2021). Калциевият фосфат е изследван като алтернативен адювант поради способността му да индуцира балансиран имунен отговор с по-нисък риск от нежелани реакции. Калциевият фосфат вече е бил използван официално като ваксинен адювант във Франция и връщането му в употреба би било по-бързо и евтино в сравнение с разработването на нови адюванти. Въпреки тези предимства, калциевите адюванти все още не намират широка употреба като алуминиевите, и това предлага поле за изследователска работа за създаване на подобрени адюванти, базирани на калций (Masson и съавт., 2017; Sun и съавт., 2021).

Калциевият фосфат намира широко приложение в медицината, но предимно в тъканното инженерство под формата на прахове, гранули, цименти, покрития, композити, триизмерни порести скелета (scaffolds) (Chen и съавт., 2023; Najjali и съавт., 2021). Употребата и изследванията му като адювант, където е под формата на суспензия или гел, са значително по-ограничени.

Названието калциев фосфат не означава едно конкретно съединение, а се използва за означаване на група съединения, съдържащи калциев и фосфатен йон, включваща минерали като брушит, монетит, хидроксилapatит, октакалциев фосфат, трикалциев бис(фосфат) и други, както и аморфни калциеви фосфати (Dorozhkin, 2009).

## 2. Изводи от литературния обзор

От направения литературен обзор могат да бъдат направени следните изводи:

1. Неорганичните адюванти в съвременните ваксини са съединения на алуминия – алуминиев хидроксид, оксихидроксид, хидроксифосфат и хидроксифосфат-сулфат.
2. Адюванти на основата на калциев фосфат се използват предимно във Франция, но в края на 1980-те години това бива преустановено, защото производителят пренасочва усилията си към употребата на калциевия фосфат за имунотерапевтични цели.

3. Макар в момента да не се използват като такива, калциевите съединения са разрешени за употреба като адюванти.
4. Според относително голям брой проучвания калциевите фосфати показват добри адювантни свойства. Те имат и по-добър профил на безопасност в сравнение с алуминиевите адюванти. Съобщава се, че добавянето на Mg(II) и/или Zn(II) към калциев фосфат води до усиляване на адювантния ефект.
5. Описани са разнообразни процедури за получаване на смесени калциеви и магнезиеви фосфати. При по-простите варианти се подхожда чрез прибавяне на смес от CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> към Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Ryan и съавт., 1999) или чрез прибавяне на трите соли едновременно във вода (Rowles, 1968), като и в двата случая синтезът се извършва при повишена температура.
6. Информацията за процедури за синтез на калциеви фосфати в суспензионна форма за имунологична употреба е оскъдна. Откриват се два протокола за получаване на адюванти от калциев фосфат – на учени от Институт Пастър (Франция) и от BioSante Pharmaceuticals (САЩ). Единствено френската група съобщава оскъдна информация, свързана с физикохимичното охарактеризиране на получените адювантни системи.

### 3. Цел и задачи

**Целта** на дисертационната работа е разработването на процедури за получаване на суспензионни системи за потенциално приложение като имунологични адюванти на основата на калций-съдържащи аморфни и наноструктурирани фосфати.

За изпълнение на тази цел са формулирани следните задачи:

1. Получаване и физикохимично охарактеризиране на различни калциево-магнезиеви фосфати в суспензионна форма като потенциални носители на протеинови антигени.
2. Изследвания върху получаването на адювантни суспензии на основата на брусит и превръщането му в апатит и монетит. Установяване на ефектите на експерименталните условия върху адсорбцията на моделен протеин върху получените фосфати.
3. Изследвания върху получаването на суспензии от апатит в присъствие на натриев хидроксид в момента на утаяването. Установяване влиянието на метода за стерилизация върху адсорбционните свойства.

## 4. Суспензии от смесени калциеви и магнезиеви фосфати

### 4.1. Синтези с вариращо начално отношение Ca:Mg

Целта на тези експерименти е да се оцени влиянието на съотношението Ca:Mg върху утаяването и последващата термична трансформация на калциево-магнезиеви фосфати като потенциални имунологични адюванти. Фосфатният реагент е добавян бавно (1 капка/секунда) при постоянно разбъркване ( $\sim 500 \text{ min}^{-1}$ ) към смесени разтвори на калций и магнезий при стайна температура (20 °C). Молното съотношение (Ca+Mg):P е фиксирано на 1:1, докато съотношението Ca:Mg се мени. Концентрациите на солите са избрани така, че при пълно утаяване йонната сила на суспензиите да е близка до тази на физиологичен разтвор ( $\sim 0,15 \text{ M NaCl}$ ). След утаяването суспензиите са стерилизирани чрез автоклавиране при 114–116 °C и налягане 1,6–1,7 bar за 1 час (автоклавиране при меки условия).

Суспензиите и получените твърди материали са охарактеризирани чрез XRD, микроскопско наблюдение, TEM (вкл. STEM-EDS), FTIR. Резултатите показват, че съотношението Ca:Mg определя фазовия състав и морфологията на получените продукти (Таблица 1). Интересен факт е, че при Ca:Mg = 25:75 и 50:50 след автоклавирането се наблюдава АКМФ. Известно е, че магнезият инхибира кристализацията на CaP и превръщането на брушит в апатит (Cheng, 1989; Salimi и съавт., 1985), но доколкото ни е известно, не е било докладвано, че аморфната фаза се запазва и след автоклавиране.

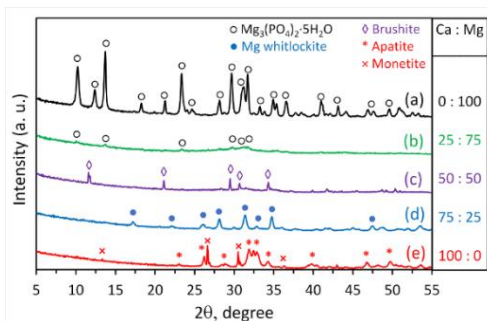
Таблица 1. Вид на продуктите, определени чрез XRD, при синтез с различни съотношения Ca:Mg с последващо автоклавиране при 115 °C за 1 h.

<i>n</i> (Ca): <i>n</i> (Mg)	Фаза	Допълнителни наблюдения
0:100	Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Полиедрични кристали ( <i>d</i> -35 nm)
25:75	АКМФ *	Аморфен продукт
50:50	АКМФ и брушит	Аморфен продукт и брушит с кристалити ~65 nm
75:25	MWH	Кристалити с <i>d</i> -25 nm, образуващи агрегати с микронни размери
100:0	апатит и монетит	

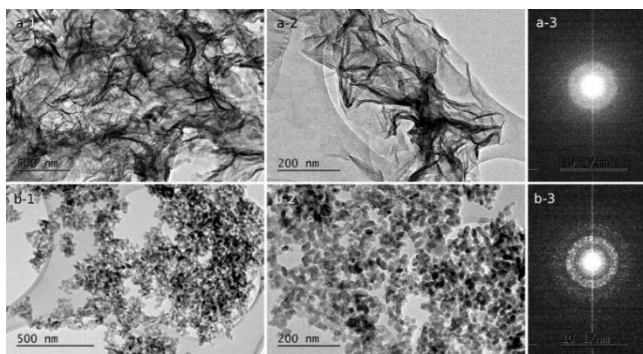
\* Съдържа следи от Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O

При отношение Ca:Mg = 75:25 се образува нанокристален MWH, а размерът на частиците е най-често в диапазона 20-40 nm. Други автори също са получавали MWH при

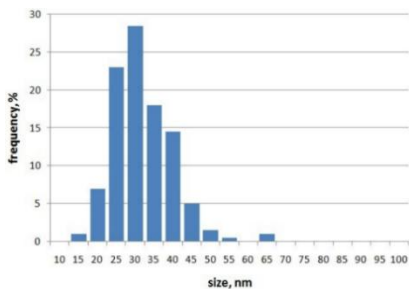
сходни процедури, но с по-продължителна термична обработка от един ден и повече (Tas, 2016) или при по-висока температура и с контрол върху pH (Qi и съавт., 2016), или при използване на скъп органичен фосфорен прекурсор (Qi и съавт., 2015).



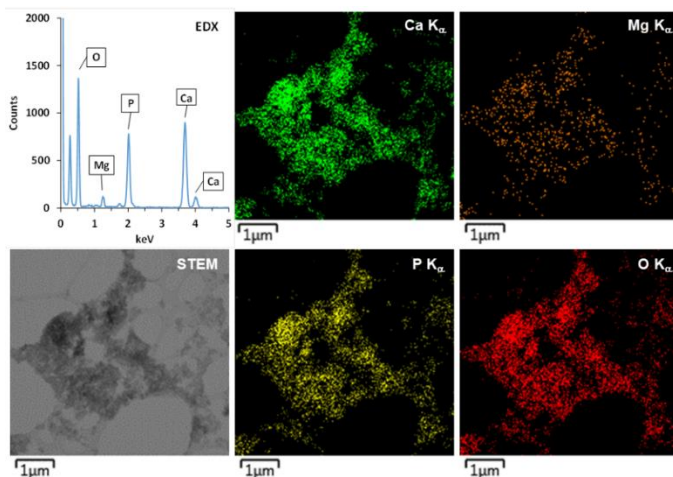
Фигура 1. XRD дифрактограми на пробите с различно отношение Ca:Mg, автоклавирани за 1 h при 115 °C.



Фигура 2. Изображения от TEM (лява и средна колона) и SAED (дясна колона) на пробите, автоклавирани за 1 h при 115 °C, с молно отношение Ca:Mg: а) 25:75; б) 75:25.



Фигура 3. Разпределение по размери на частиците на проба с молно отношение Ca:Mg = 75:25, получено от анализ на TEM изображенията.



Фигура 4. EDS спектри и изображения от STEM с картиране на елементите на проба с молно отношение Ca:Mg=75:25.

Допълнителни експерименти в диапазон на съотношенията Ca:Mg от 65:35 до 85:15 потвърждават образуването на MWH във всички случаи, като увеличаването на дела на калций води до увеличаване на размера на кристалитите (~10-30 nm). Други автори също са получавали MWH при сходни процедури, но с по-продължителна термична обработка от един ден и повече (Tas, 2016) или при по-висока температура и с контрол върху pH (Qi и съавт., 2016), или при използване на органичен фосфорен прекурсор (Qi и съавт., 2015).

#### 4.2. Синтези с различна топлинна обработка

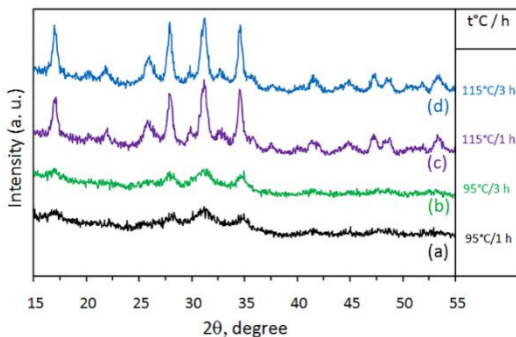
Във втората серия експерименти съотношението Ca:Mg е фиксирано на 75:25, а условията на последваща термична обработка варират – нагряване в колба на кипища водна баня (93-95 °C) под обратен хладник или автоклавиране при 115 °C и 1,7 bar за 1-3 h с цел да се установи как тези параметри влияят на превръщането на брушит в други фази. Рентгеноструктурният анализ показва, че преди нагряването единствена кристална фаза е брушит, а във всички случаи след него се формира MWH, като размерът на кристалитите нараства с увеличаване на температурата и продължителността на обработката (Таблица 2, Фигура 5). ТЕМ изображенията показват различна морфология

в зависимост от условията: автоклавираните проби съдържат кристали с правилни стени, докато нагряваните на водна баня проби изглеждат слепени и по-неправилни (Фигура 6).

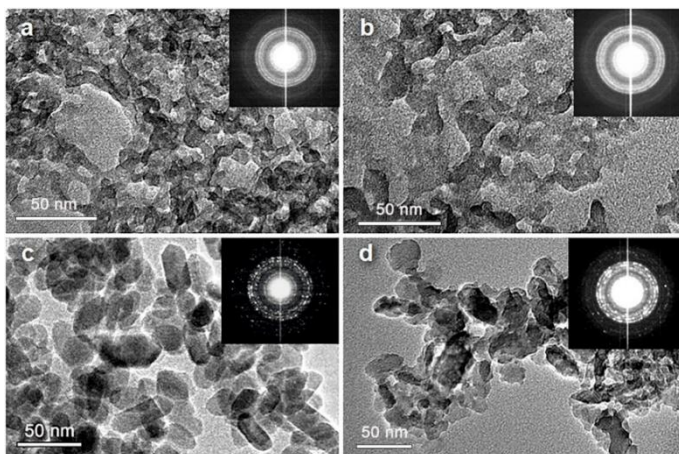
STEM-EDS анализът на пробата преди нагряването показва наличие на аморфни микросфери с еднородно разпределение на Ca, Mg, P и O, както и на кристали, състоящи се предимно от Ca, P и O и съвсем малко Mg (Фигура 7). За сравнение, след 1 h автоклавиране пробата съдържа само MWN с равномерно разпределени Ca, Mg, P и O (Фигура 4). Тези резултати показват, че брушитът бива разрушен в процеса на нагряване и бива превърнат в MWN.

Таблица 2. Размер на кристалитите, определен от XRD, на пробите със начално отношение Ca:Mg = 75:25, при различна температурна обработка.

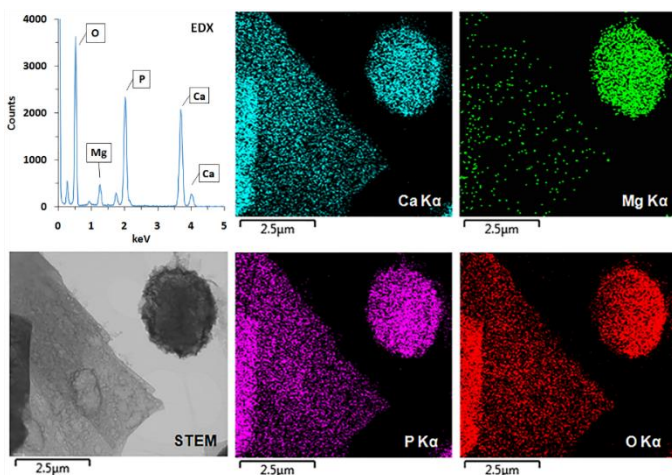
Температура и продължителност на обработката	95 °C/ 1 h	95 °C/ 3 h	115 °C/ 1 h	115 °C/ 3 h
Размер на кристалитите, nm	5	14	25	45



Фигура 5. XRD дифрактограми на проби с начално отношение Ca:Mg = 75:25, обработени при различна температура и за различно време.



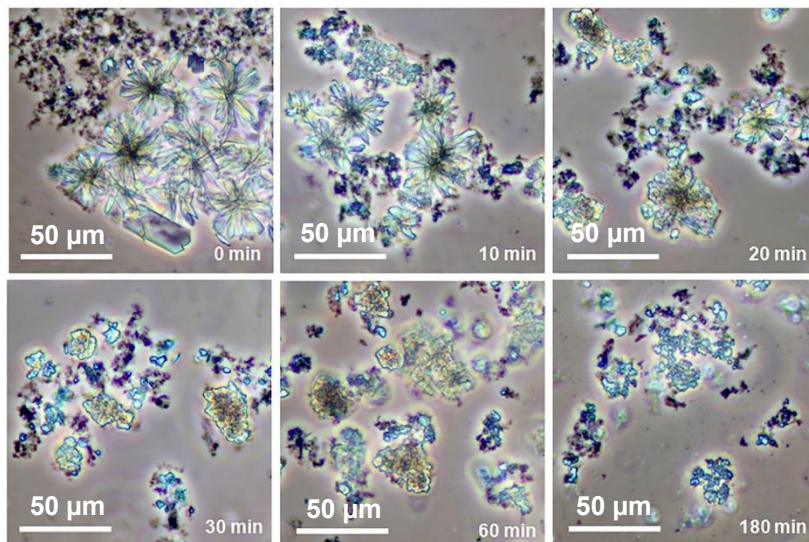
Фигура 6. Изображения от TEM на проби с начално отношение Ca:Mg = 75:25, обработени по различен начин: а) 95 °C за 1 h; б) 95 °C за 3 h; в) 115 °C за 1 h; д) 115 °C за 3 h.



Фигура 7. Изображение от STEM и EDS картиране на елементите на преципитата, получен при начално отношение Ca:Mg = 75:25.

Изследвана е динамиката на преобразуването на брушит в MWH при съотношение Ca:Mg = 75:25 чрез заснемане на аликовти под микроскоп с фазов контраст през определен интервал от време при нагряването на водна баня (93-95 °C). Последователните изображения показват ерозия на първоначалните брушитни кристали (с размер няколко десетки микрометра) и формирането на по-дребни зърнести частици, вероятно

представляващи АКМФ. В рамките на 10-20 минути започва разрушаване на брушитните кристали, а след 60-180 минути те изчезват, като се наблюдава фина зърнеста маса, която впоследствие се трансформира в нанокристали от МВН (Фигура 8).



Фигура 8. Изображения от оптичен микроскоп с фазов контраст на развитието във времето на кристалите на проба при начално отношение Ca:Mg = 75:25 при нагряване на кипяща водна баня.

### 4.3. Адсорбционни експерименти

За оценка на адсорбционните свойства е използван човешки серумен албумин като моделен протеин. Работният разтвор на албумин (1,35 mg/mL) се инкубира със суспензиите на изследваните фосфати в присъствие на ацетатен буфер (0,15 M, pH 6) при стайна температура за 3 h. Приготвени са контроли по идентична схема, но без добавяне на суспензия. След центрофугиране ( $10000 \text{ min}^{-1}$ , 10 min) съдържанието на свободен протеин в супернатанта се определя спектрофотометрично при 280 nm, като количеството адсорбиран протеин се изчислява по разлика спрямо контролите.

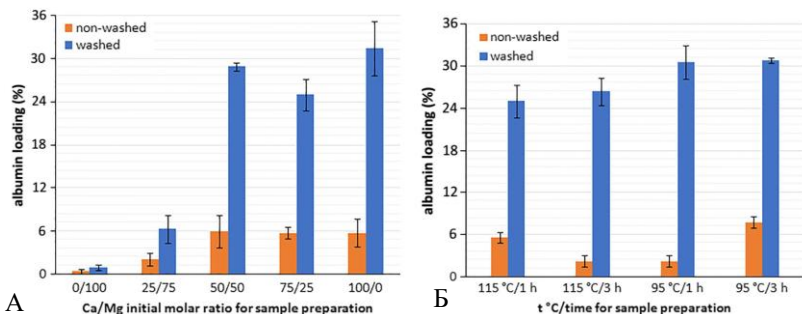
Изследвани са пробите с различно начално отношение Ca:Mg, автоклавираны за 1 h, както и върху тези с начално отношение Ca:Mg = 72:25 и обработени при различна температура с различна продължителност.

Резултатите (Фигура 9А) показват, че магнезиевият фосфат адсорбира минимално количество протеин, докато аморфният калциево-магнезиев фосфат има по-добри, а

смесите с участие на калций – най-добри адсорбционни свойства. При пробите с Ca:Mg = 75:25 (Фигура 9Б) разликите в адсорбцията при различни условия на нагряване са по-малки, като най-високи стойности се наблюдават за пробите, обработени на водна баня.

Промиването на суспензиите с физиологичен разтвор преди адсорбцията води до значително повишаване на адсорбцията (в някои случаи до 5–13 пъти). Спрямо масата на твърдата фаза, това съответства на 175–225  $\mu\text{g}$  HSA на 1 mg адсорбент. Възможно обяснение на това е отстраняването на нереагирани йони и освобождаване на повърхностни места за свързване. При промиването също така се изменя pH на суспензията и буферният ѝ капацитет, което също може да повлияе на взаимодействията с протеина.

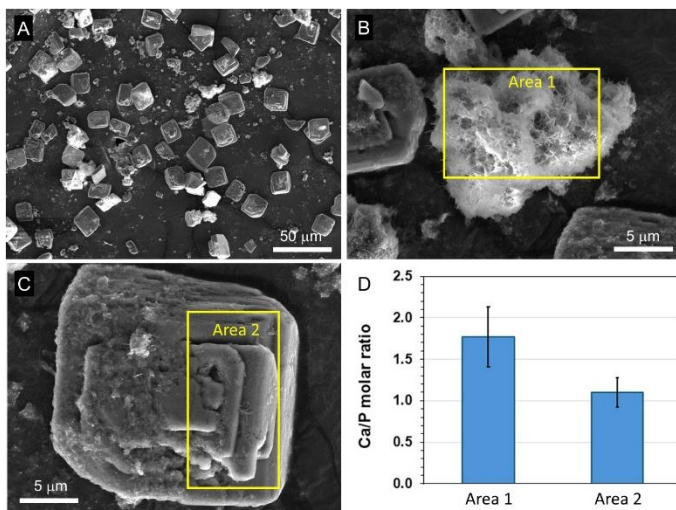
Тези резултати подчертават, че изборът на подходящо съотношение Ca:Mg и последваща обработка позволяват контрол върху адсорбционните свойства на материалите, което е ключово за приложението им като адюванти.



Фигура 9. Ефективност на адсорбция на албумин за буферизирана с ацетатен буфер с pH 6 суспензия, за проби, приготвени по различни начини: А) автоклавирани при 115 °C за 1 h при различни начални отношения Ca:Mg; Б) при начално отношение Ca:Mg = 75:25 и нагрявани при различна температура и с различна продължителност.

## 5. Суспензии от калциеви фосфати без добавена основа

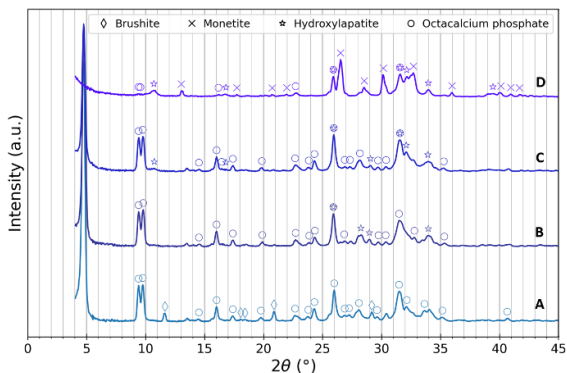
Проведени са синтези на калциеви фосфати със същите прекурсори, концентрации, последователност на смесване и термична обработка като при експериментите със смесени фосфати. В повечето експерименти прибавянето на  $\text{HPO}_4^{2-}$  към  $\text{Ca}^{2+}$  е бавно (2,36 mL/min) на капки чрез инфузионна помпа, а крайният обем на суспензиите е 42 mL. Като единствена кристална фаза преди нагряването е идентифициран брушит, а след автоклавиране се получава смес от апатит и монетит. Получени са апатитни кристали с иглеста форма, докато монетитните кристали са неправилни паралелепипеди (Фигура 10).



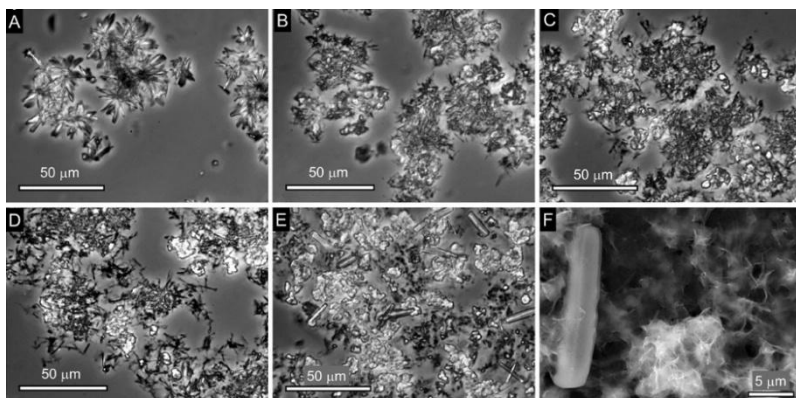
Фигура 10. SEM изображения на проба, получена след автоклавиране при начално съотношение Ca:P = 1:0,90, при увеличение: A) 1000x; B) и C) 10 000x. D) Молни отношения Ca:P в две конкретни области от материала, определени чрез SEM-EDS анализ.

Установено е, че възпроизводимостта на синтезите не е особено добра (по отношение както на морфологията на частиците, така и на адсорбционните свойства), като е направена хипотеза, че главни причини за това са нехомогенности при нагряването (включително липса на разбъркване), както и изминалото време между синтеза и автоклавирането. В опит да се подобри възпроизводимостта, като междинна стъпка е въведено нагряване на суспензиите от брушит на кипяща водна баня под обратен хладник при постоянно разбъркване. Установено е, че след 10 min брушитът е трансформиран, а като междинна фаза е установен ОКФ, която присъства и след 30 min, но я няма след

автоклавиране (Фигура 11). Формирането на апатит започва малко по-късно от това на ОКФ, а монетит се образува едва при автоклавирането. При тези условия монетитните кристали са продълговати призми с дължина, подобна на тази при получените чрез директно автоклавиране кристали, но са със значително по-малка широчина. Показано е, че по време на нагряването на водна баня се формират множество дребни иглести кристали (Фигура 12).



Фигура 11. WAXS спектри на твърдата фаза в аликвоти, вземани по време на нагряването на кипяща водна баня на суспензии брушит, получени при начално съотношение Ca:P = 1:1, в различен момент от нагряването: A) 5 min, 89 °C; B) 10 min, 93 °C; C) 30 min, 94 °C; D) автоклавирана проба. Пиковите са нормализирани спрямо най-високия пик за всяка проба при ъгъл над 5°.



Фигура 12. Еволюция на морфологията на частиците в суспензията, получена при начално съотношение Ca:P = 1:1, по време на превръщането на брушит на кипяща водна баня. A) 0 min, 20°C, B) 5 min, 89°C; C) 10 min, 93°C, D) 30 min, 94°C; E) автоклавирана проба. F) SEM изображение на автоклавираната проба.

Проведени са и аналогични експерименти с бързо прибавяне на  $\text{HPO}_4^{2-}$  към  $\text{Ca}^{2+}$  (1–2 s), при които не се наблюдават споменатите дребни иглести кристали по време на нагряването на водна баня, а след автоклавиране количеството на монетитните кристали е значително по-малко, както е установено чрез микроскопски наблюдения и рентгенов анализ. Това дава основание да се счита, че скоростта на смесване на прекурсорите има важна роля при по-нататъшното развитие на материала, и е предпоставка за допълнителни бъдещи изследвания.

Обърнато е внимание и на рН на суспензиите преди и след автоклавиране. Очаквано, установено е понижение на рН, дължащо се на отнемане на  $\text{OH}^-$  йони от водата или на  $\text{Ca}^{2+}$  йони от разтвора при прехода от брушит през ОКФ към хидроксилapatит (стехиометричен или с дефицит на калций).

### 5.1. Синтези с вариращо молно съотношение Ca:P на прекурсорите

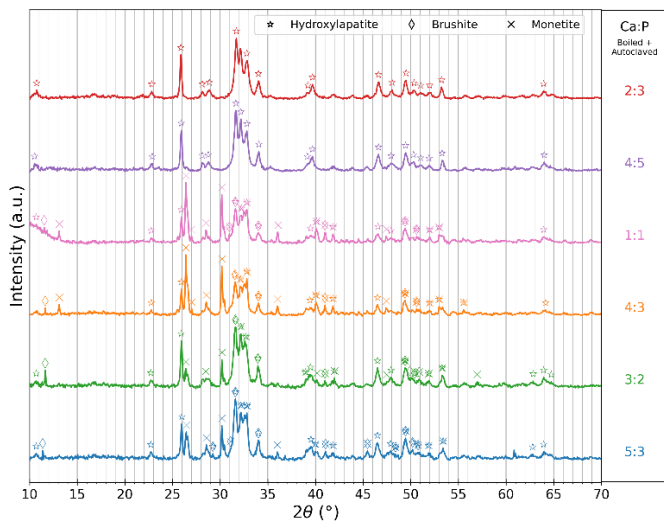
Синтезирани са калциеви фосфати с начално отношение Ca:P в диапазона от 1:0,60 до 1:1,50 (от 5:3 до 2:3) чрез бавно смесване (2,36 mL/min). Те са стерилизирани чрез използване на двустъпковата схема с нагряване на водна баня и последващо автоклавиране. Суспензиите и получените твърди материали са охарактеризирани с XRD, микроскопско наблюдение, SEM, TEM (вкл. STEM-EDS), FTIR, твърдотелен MAS NMR, TGA. Проведени са анализи на надутайките чрез ICP-OES. Данни за използваните начални състави и откритите кристални фази са представени в Таблица 3. В повечето случаи крайният обем на суспензиите е 42 mL.

Таблица 3. Условия на синтез, рН на суспензиите и кристални фази, определени с XRD, в получените продукти с различно начално съотношение Ca:P при скорост на добавяне на  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,36 mL/min. Пробите са нагreti на водна баня ( $91,5 \pm 1,5$  °C) с разбъркване за 30 min, след което са стерилизирани при 115 °C за 1 h.

$n_{\text{Ca}}:n_{\text{P}}$	Преди нагряване			След автоклавиране		
	Проба	рН	Крист. фаза	Проба	рН	Кристална фаза (%)
1:0,60	Ob060	5,93	брушит	Ob060_bA	4,51	апатит <sup>a</sup> (79), монетит (21) *
1:0,67	Ob067	5,77	брушит	Ob067_bA	4,49	апатит <sup>a</sup> (84), монетит(15), брушит (1)
1:0,75	Ob075	5,99	брушит	Ob075_bA	4,53	апатит <sup>a</sup> (54), монетит(46) *
1:1	Ob100	6,45	брушит	Ob100_bA	4,77	апатит <sup>a</sup> (59), монетит(41) *
1:1,25	Ob125	7,09	брушит	Ob125_bA	5,13	апатит <sup>a</sup> (100)
1:1,50	Ob150	7,44	брушит	Ob150_bA	5,94	апатит <sup>a</sup> (100)

<sup>a</sup> Вероятно хлорсъдържащ апатит ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_{1,56}\text{Cl}_{0,44}$ ); \*Съдържа следи от брушит

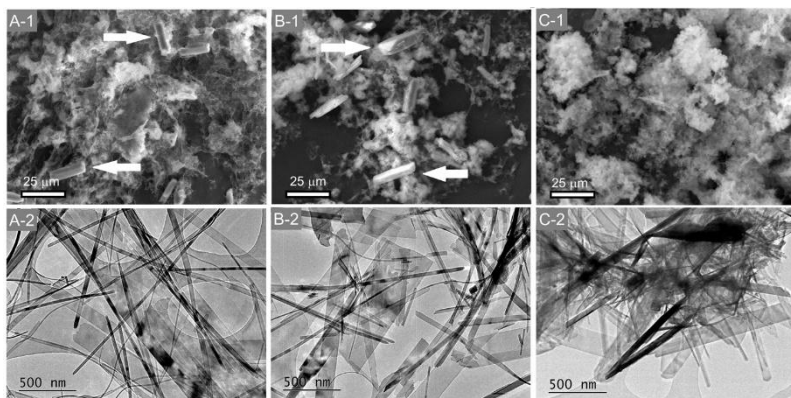
Установено е, че при равни количества от прекурсорите и при излишък на калций се образуват смеси от монетит и ХА, докато при излишък на фосфор се образува само апатит. Обяснение на това се дава с киселинността на средата. Известно е, че брушитът е нестабилен над определени стойности на рН, зависещи от концентрациите на Са и Р, тяхното съотношение, и температурата (Elliot и съавт., 1959), превръщайки се в ОКФ и ХА. При по-ниски стойности тази трансформация е затруднена и има възможност за протичане и на дехидратация.



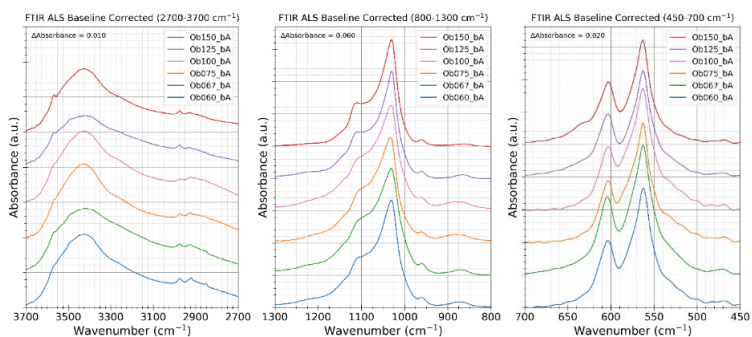
Фигура 13. Прахови рентгенови дифрактограми (XRD) на нагнетите на водна баня и автоклавиранни проби. Всеки спектър е нормиран спрямо най-високия си пик.

Кристалите на монетита при различните отношения Са:Р имат сходна форма и размери. Изследванията с ТЕМ показват, че частиците на ХА са с иглеста или лентовидна форма, с дължина няколко микрометра и широчина десетки или стотици нанометри, като при пробите с повече фосфор образуват по-гъсти скупчвания (Фигура 14).

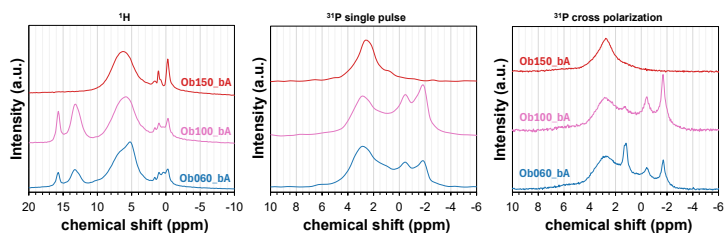
Чрез FTIR спектроскопия е установено, че апатитът е с дефицит на калций. За това се съди по почти пълна липса на характерните ивици за разтягане  $\nu_s$  при  $3570\text{ cm}^{-1}$  и за клатушкане  $\nu_L$  на  $\text{OH}^-$  при  $\sim 630\text{ cm}^{-1}$ , особено явна при пробите с отношение  $\text{Ca:P} \geq 1$ , и по наличие на слабо уширение от характерна ивица за апатитни  $\text{HPO}_4^{2-}$  при  $\sim 550\text{ cm}^{-1}$  около едната ивицата за огъване  $\nu_4$  на  $\text{PO}_4^{3-}$  при  $562\text{ cm}^{-1}$  (Drouet, 2013; Vandecandelaere и съавт., 2012).



Фигура 14. Изображения от SEM (горе) и TEM (долу) на нагръвани и автоклавиращи проби, приготвени при начално съотношение Ca:P = 1:0,60 (A); 1:1 (B); 1:1,50 (C). Изображенията от TEM са при по-високи увеличения и показват само кристалите от ХА.



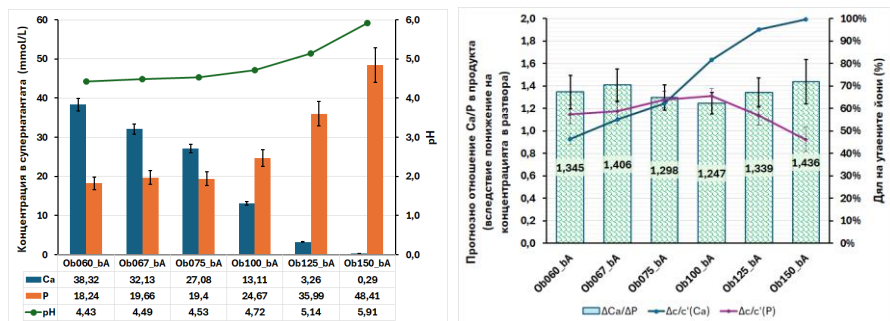
Фигура 15. Отделни участъци от FTIR спектрите на пробите от Таблица 3.



Фигура 16.  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  MAS NMR спектри на проби от Таблица 3. В режим кръстосана поляризация  $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$  преносът на намагнитване е осъществен с протони с химично отместване: от долу нагоре 5,40 ppm; 5,90 ppm; 5,00 ppm. Носещата честота на  $^{31}\text{P}$  е настроена на 0 ppm.

За пробите с отношение Ca:P  $\geq 1$  е установено, че съдържат и следи от брушит. В XRD спектрите се наблюдава слаба рефлексия от най-интензивния пик на брушита (020) при  $\sim 11,7^\circ$ , в  $^1\text{H}$  спектъра има малки гърбици при  $\sim 7$  и  $\sim 10$  ppm (Pouproint и съавт., 2007), а в  $^{31}\text{P}$  NMR в режим на кръстосана поляризация се забелязва сигнал от брушитен фосфор при  $\sim 1,2$  ppm. Възможно е това да се дължи на непревърнал се брушит, но не може да се изключи и образуването му чрез хидратация на монетит.

Анализите на разтворите над утайките (Фигура 17) са извършени четири месеца след синтезите, когато процесите на стареене вероятно са приключили. В повечето случаи pH е много близо до стойността скоро след синтеза. Очаквано, с нарастване на началното количество фосфор делът на калция в разтвора се понижава, а на фосфора се повишава. Почти пълната липса на изменение при фосфора за първите три проби би могла да се свърже с нарастването на дела на монетит в продукта. Въз основа на концентрациите е изчислено прогнозно атомно отношение Ca:P в продукта. То варира в сравнително тесни граници от 1,25 до 1,44. Най-ниските стойности са наблюдавани при пробите с повече монетит. Най-високите стойности също сочат за дефицит на калций в апатита.



Фигура 17. Състав на разтвора над утайката и прогнозно атомно отношение Ca:P, изчислено от разликата между начална и крайна концентрация на разтвора, за пробите от Таблица 3.

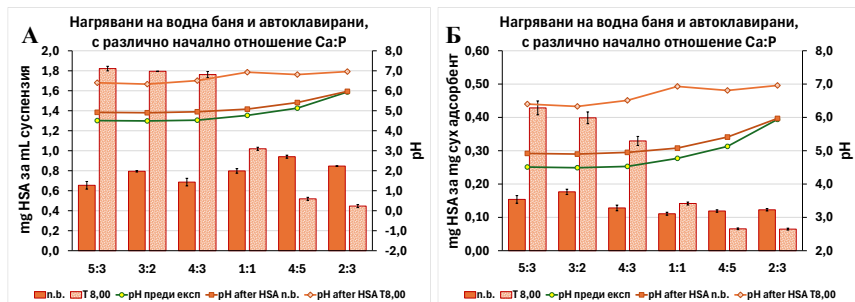
## 5.2. Адсорбционни експерименти

В сравнение с опитите със смесени калциеви и магнезиеви фосфати, постановката при адсорбционните експерименти е различна – използван е четири пъти по-голям обем суспензия от калциев фосфат, експериментите са провеждани както в отсъствие, така и

в присъствие на добавен буфер, а работният разтвор на албумин е с повишена концентрация (2 и 4 mg/mL, съответно). Концентрацията на албумин в крайните суспензии се запазва почти същата (от 0,97 mg/mL се променя на 1,00 mg/mL).

Направени са няколко начални експеримента с използване на различни буфери – фосфатен с рН 6,72 и 7,26, и Tris буфер с рН 7,21, 7,42 и 7,78. Въз основа на по-добри резултати с Tris буфер с рН 7,21 в сравнение с фосфатен буфер с рН 7,26 е предпочетено при всички по-нататъшни експерименти с буфер да се използва Tris. Също така той дава възможност и за постигане на по-високи стойности на рН, което по-добре съответства на физиологичната киселинност, което е важно при експерименти с евентуални имунологични адюванти.

Данните от адсорбция на HSA върху пробите от Таблица 3 са представени на Фигура 18. Ефективността на адсорбцията в отсъствие на буфер е между 33 и 47%, като изглежда няма особено изразена зависимост от началното съотношение Са:Р, но изглежда е малко по-добра при проби с по-ниско такова. Като се отчете масата на сухия остатък преди експеримента, по-добри са резултатите при пробите с най-малко фосфор, които са с най-малка маса, най-много разтворен калций и най-ниско рН.



Фигура 18. Небуферизирана и буферизирана адсорбция на HSA за пробите от Таблица 3, заедно със стойности на рН преди и след съответния експеримент. При А) адсорбцията е изразена за 1 mL суспензия, а при Б) – за 1 mg сухо вещество.

Таблица 4. Зависимост на дзета-потенциала на частиците на проби Ob060\_bA и Ob150\_bA от рН.

Проба	рН	ζ, mV
Ob060_bA (5:3)	4,5	+12,9
	6,4	+2,0
Ob150_bA (2:3)	6,0	-11,1
	7,0	-19,3

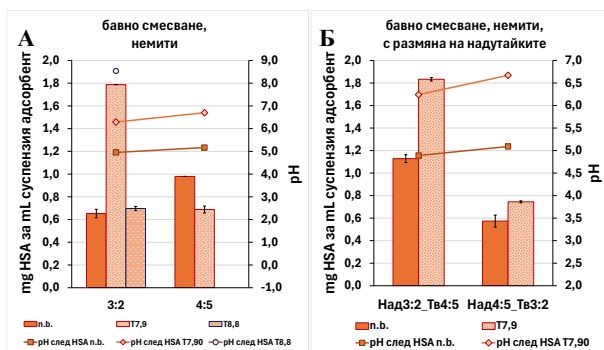
Логична първа стъпка за обяснение на резултатите са електростатични взаимодействия между калциевия фосфат и албумина. Затова са определени дзета-потенциалите на частиците на две от пробите калциев фосфат (Таблица 4). Проба Ob060\_bA е с рН 4,5, а при смесване с разтвора на албумин рН става 4,9. Частиците при това рН са положителни, а албуминът, който е с изоелектрична точка 4,7, е с нисък отрицателен заряд. Това води до електростатично привличане между тях. Албуминът е с доста по-отрицателен заряд при рН 6,0 (проба Ob150\_bA), но частиците също са отрицателни, което води до електростатично отблъскване. Въпреки това, тъй като молекулите на албумина имат положителни домейни, е възможна слаба адсорбция и при отрицателен нетен заряд.

При използване на Tris буфер рН е между 6,3 и 7,0. Забележителна е високата адсорбция на албумин (до 92% за проба Ob060\_bA) при високи отношения Са:Р, при Са:Р=1:1 тя спада значително, а при ниски отношения (например проба Ob150\_bA) е още по-ниска (до 22%). Нормирани за единица маса адсорбент, резултатите се понижават постепенно при първите три проби, а при следващите три, подобно на тези за единица обем, са съществено по-ниски. Както дзета-потенциалът, така и албуминът са доста отрицателни при проба Ob150\_bA (Са:Р = 2:3) и рН 7,0, което обяснява по-ниската ефективност. Дзета-потенциалът на частиците в Ob060\_bA при рН 6,4 е близък до нула, но положителен (Таблица 4), което предполага електростатично привличане с още по-отрицателния албумин.

Проведени са и допълнителни адсорбционни експерименти с новосинтезирани проби с начално молно отношение Са:Р = 3:2 и 4:5 по същата синтезна процедура. Първият от тях е повторение на вече описаните адсорбционни експерименти (резултатите съвпадат много добре с тези за пробите от Таблица 3), но с допълнително провеждане в присъствие на буфер с по-високо рН – 8,8 при отношение Са:Р = 3:2 (Фигура 19А). Изразена е хипотезата, че тъй като при значително по-високото рН (8,54 след адсорбцията) дзета-потенциалът на пробата ще е отрицателен, а албуминът също би бил доста отрицателен, това би довело до намаляване на адсорбираното количество. Получените резултати потвърждават хипотезата.

Вторият експеримент се състои в размяна на течната фаза между двете суспензии, за да се установи дали високата адсорбция в присъствие на Tris при по-богати на калций

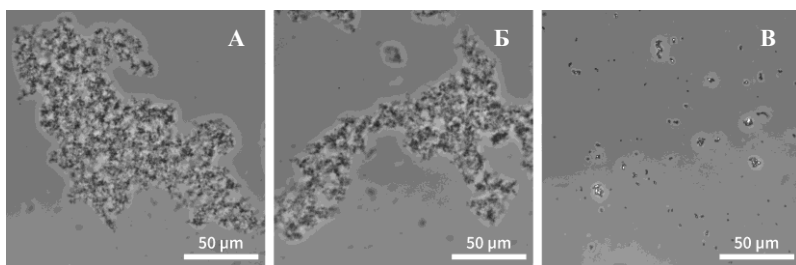
състави се дължи на състава на разтвора – конкретната комбинация от калциеви йони, Tris и рН – или на повърхностните свойства на твърдата фаза от апатит/монетит. Това е постигнато, като 15 mL от суспензиите са центрофугирани при 2500 rpm за 10 min, след което са взети 13 mL от всеки разтвор и са поставени при останалите 2 mL от другата суспензия (състоящи се предимно от твърда фаза). След това са извършени адсорбционните експерименти със и без буфер. Резултатите без добавен буфер (Фигура 19Б) са доста подобни на тези с оригиналните суспензии със същите твърди частици, докато в присъствие на буфер резултатите са подобни на тези за суспензиите със същата течна фаза. Това потвърждава влиянието на течната фаза при Tris буфер с рН 7,9.



Фигура 19. Допълнителни адсорбционни експерименти с проби с бавно смесване на прекурсори. А) с оригинални суспензии и допълнителен експеримент с използване на Tris с рН= 8,8; Б) с размяна на надутайките – левите стълбчета са с твърди частици от синтеза с отношение Ca:P=4:5 и надутайка от синтеза с отношение 3:2, а десните са с твърди частици от синтеза с отношение 3:2 и надутайки от синтеза с отношение 4:5.

Изразена е и още една хипотеза за допълнително утаяване по време на адсорбцията. Тъй като неутасният калций представлява голям дял от общото му количество при проби с отношение Ca:P от 5:3 до 4:3 и дори 1:1, а рН е относително ниско (Фигура 17), след добавяне на Tris буфер рН се повишава значително, което създава възможност за утаяване на допълнително количество калциев фосфат, който да предостави още места за адсорбция на албумин. За проверка на тази хипотеза са проведени още няколко експеримента с допълнително синтезираните проби с отношение Ca:P = 3:2 и 4:5. Експериментите са подобни на тези за адсорбцията – използвани са същите разтвори, в същите съотношения и същата последователност на смесване, но вместо суспензия са използвани бистрите разтвори над утайките, като смесването е направено директно в кварцова

кувета. В част от експериментите са смесени надутайки с разтвор на Tris с различно рН, а в друга част – надутайки, Tris и албумин. Наблюдава се помътняване на разтворите при всички случаи, но с надутайката при Са:Р=3:2 това става мигновено, докато при 4:5 има дълъг индукционен период и са необходими около 10 минути. Образуваните частици са значително по-дребни от наличните преди началото на адсорбиционния експеримент (Фигура 20). Масата им за 1 mL суспензия е оценена на ~3,7 mg при Tris с рН 7,90 и 3,6 mg при рН 8,86. Макар това да превишава изчисления теоретичен максимум от 3,2 mg (при допускане, че частиците са от ХА) с около 15% (което поне частично може да се дължи на адсорбирана и структурна вода), става ясно, че голямо количество неутаен калций образува нова твърда фаза *in situ*, което води до почти двойно увеличение на масата на твърдата фаза. Повишението на адсорбцията при добавяне на Tris с рН 7,90 е повече от двойно. Дадено е обяснение, че този „излишък“ на адсорбиран албумин за единица маса се дължи на значително по-фините образувани *in situ* частици.



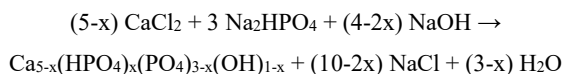
Фигура 20. Снимки от оптичен микроскоп с фазов контраст на допълнителните преципитати, образувани при смесване на супернатанти с Tris. А) Са:Р = 3:2, рН(Tris) = 7,9, след 3 min; Б) Са:Р = 3:2, рН(Tris) = 8,86, след 5 min; В) Са:Р = 4:5, рН(Tris) = 7,9, след 15 min.

Тези резултати потвърждават хипотезата, че водеща причина за рязкото повишаване на адсорбцията на албумин при добавяне на Tris буфер с подходящо рН при проби с високи отношения Са:Р е допълнителната преципитация на калциев фосфат, която е възможна заради значителния дял на неутаени калциеви и фосфатни йони при ниските рН стойности на суспензиите. При твърде високи стойности за рН обаче доминира зарядът на частиците – отрицателните частиците се отблъскват с отрицателно заредения албумин.

## 6. Суспензии от калциеви фосфати с добавена основа

### 6.1. Синтези с вариращо молно съотношение Са:Р:ОН на прекурсорите

С цел да се елиминира стапът на превръщане на брушит и да се получи директно ХА, в друга поредица експерименти са синтезирани няколко проби в присъствие на NaOH с различно молно отношение Са:Р:ОН. За определяне на отношенията е използвана хипотеза за получаването на поредица от продукти със състав  $\text{Ca}_{5-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{3-x}(\text{OH})_{1-x}$  (Berry, 1967), където  $x$  е между 0 и 1, вариращ от стехиометричен ХА през ХАДК до ОКФ, като реакцията протича съгласно уравнението:



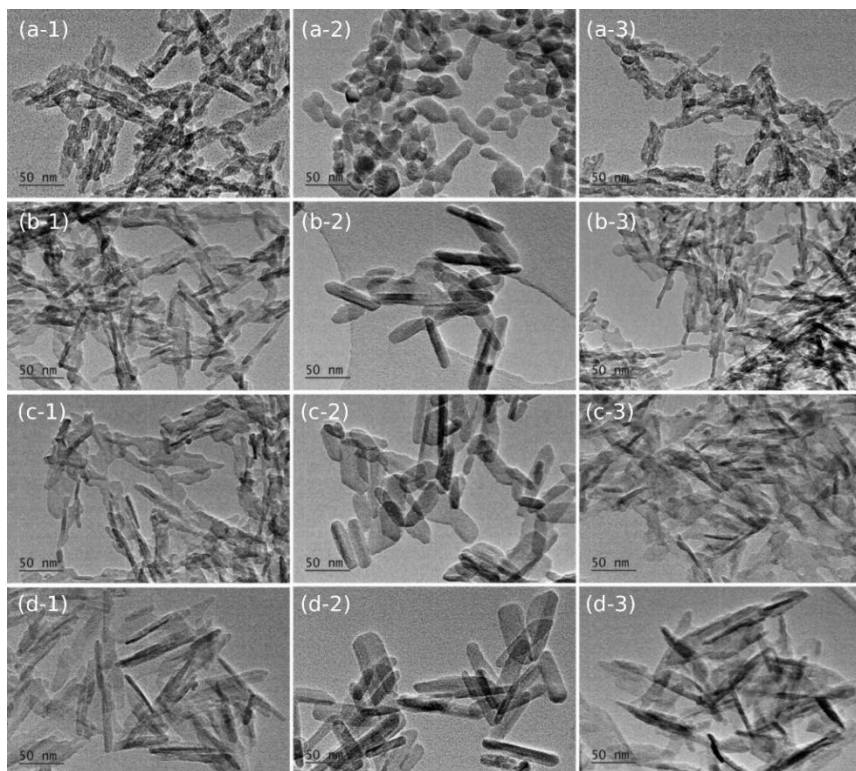
Избрани са стойности на  $x = 0; 0,500; 0,667$  и  $1,00$ . Това съответства на молни отношения Са:Р:ОН равни на 5:3:4 (1:0,60:0,80); 3:2:2 (1:0,67:0,67); 13:9:8 (1:0,69:0,615) и 4:3:2 (1:0,75:0,50) и следните хипотетични крайни състави –  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ;  $\text{Ca}_{4,5}(\text{HPO}_4)_{0,5}(\text{PO}_4)_{2,5}(\text{OH})_{0,5}$ ;  $\text{Ca}_{4,33}(\text{HPO}_4)_{0,67}(\text{PO}_4)_{2,33}(\text{OH})_{0,33}$  и  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (или  $\text{Ca}_4(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_2$ ). Синтезите с тези четири съотношения са проведени при бързо смесване на прекурсорните разтвори, в рамките на 1-2 s.

Наблюдението под микроскоп с фазов контраст показва, че не се образува брушит, а много фини кристалчета. Затова тези проби не са нагривани на водна баня, а са нагривани директно в автоклав. Ненагриваните и автоклавираните проби са охарактеризирани с XRD, SEM, TEM, FTIR, MAS NMR, ICP-OES. Данните за началните състави и получените фази, определени чрез XRD, са представени в Таблица 5. Част от ненагриваните проби са облъчени с гама-лъчи, което е често използван метод за стерилизация при стайна температура. Погълнатата доза беше 25 kGy. Гама-стерилизацията е използвана и при калциеви фосфати и по-специално апатит, но при изследвания на композити, филми и други биоматериали (Ramya и съавт., 2016; Sahadat Hossain и съавт., 2023; Shahabi и съавт., 2014), но доколкото ни е известно, не са докладвани резултати със сравнение на адсорбция на албумин върху необлъчени и облъчени с гама-лъчи проби.

Таблица 5. Начални отношения и кристални фази, определени с XRD, в получените продукти с различно начално отношение Са:Р:ОН при бързо добавяне на разтвор на Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и NaOH (1-2 s) към 20,0 mL 0,15 M CaCl<sub>2</sub>. Пробите са стерилизирани 1h при 115°C.

<i>n</i> Ca: <i>n</i> P: <i>n</i> OH	Проба	Крист. фаза	Проба	Крист. фаза
1:0,60:0,80 (5:3:4)	Oe060	апатит <sup>a</sup>	Oe060_A	апатит <sup>a</sup>
1:0,67:0,67 (3:2:2)	Oe067	апатит <sup>a</sup>	Oe067_A	апатит <sup>a</sup>
1:0,69:0,615 (13:9:8)	Oe069	апатит <sup>a</sup>	Oe069_A	апатит <sup>a</sup>
1:0,75:0,50 (4:3:2)	Oe075	апатит <sup>a</sup>	Oe075_A	апатит <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Вероятно карбонат-съдържащ апатит



Фигура 21. Изображения от ТЕМ на проби от Таблица 5. Съотношения на прекурсорите Са:Р:ОН – а) 5:3:4; б) 3:2:2; в) 13:9:8; д) 4:3:2. Вляво – ненагрявани проби; в средата – автоклавирани проби; вдясно – облъчени с гама лъчи.

Чрез ТЕМ изследвания (Фигура 21) е показано, че частиците са много по-малки в сравнение със синтезите без добавена основа. В ненагряваните суспензии те са с неп-

равилна издължена форма, с ширина около 10 nm и дължина няколко десетки нанометра. Забелязва се тенденция за образуване на издължени частици при повишаване дела на фосфора и намаляване дела на основата в прекурсорната смес. Автоклавираните проби се състоят от малко по-големи кристали с малко по-правилна форма и добре изразени краища. Автоклавираната проба с отношение 5:3:4 се състои предимно от овални частици с размер около 20 nm, но съдържа и по-издължени частици (до около 50 nm). Останалите автоклавираните проби съдържат по-издължени частици с размери вариращи между 50 и 150 nm. Изображенията на облъчените с гама лъчи са много сходни с тези на необлъчените проби.

Рентгенограмите на ненагряваните и на автоклавираните проби показват, че ХА е единствената фаза. Възможни съвпадения също са ХА със съдържание на карбонат или хлор. Пиковите на ненагряваните проби са по-малко на брой и по-широки, което е очаквано и е белег за по-малки размери и по-ниска кристалност.

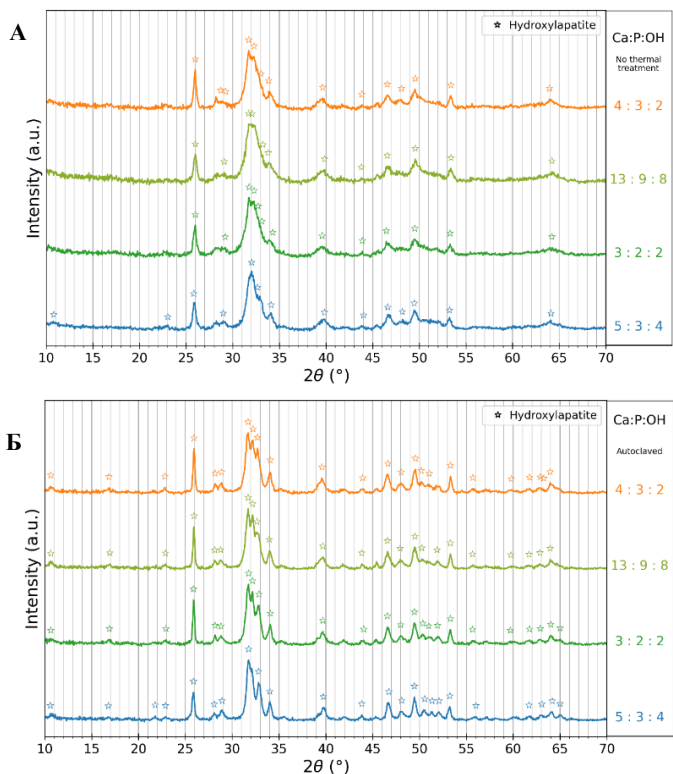
Спектрите от FTIR за са представени на Фигура 23. При ивиците за  $\nu_3$  разтягане на  $\text{PO}_4^{3-}$  с видими пикове при  $\sim 1032\text{-}1038\text{ cm}^{-1}$  и  $\sim 1093\text{ cm}^{-1}$  се забелязва разширяване с нарастване дела на фосфор в прекурсорната смес. Появява се и допълнителна гърбица при  $\sim 1100\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$ , която се свързва с наличие на  $\text{HPO}_4^{2-}$ . За нарастващ дял на  $\text{HPO}_4^{2-}$  може да се съди и по усилване интензитета на слабата ивица при  $870\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ , която същевременно става и все по-широка (интервал  $850\text{-}890\text{ cm}^{-1}$  при проба Oe075\_A).

Ивицата за ОН разтягане  $\nu_2$  при  $\sim 3570\text{ cm}^{-1}$  е доста по-ясно изразена в сравнение с пробите без добавена основа, като е по-силна при автоклавираните проби. Като обща тенденция отслабва с повишаване дела на фосфор и понижаване дела на основа в прекурсорната смес. Подобна тенденция се забелязва и за ивицата за клатушкане  $\nu_L$  на ОН-групата. Това показва, че тези проби са значително по-богати на хидроксидни йони в сравнение с пробите без добавена основа, което е в съответствие с очакванията.

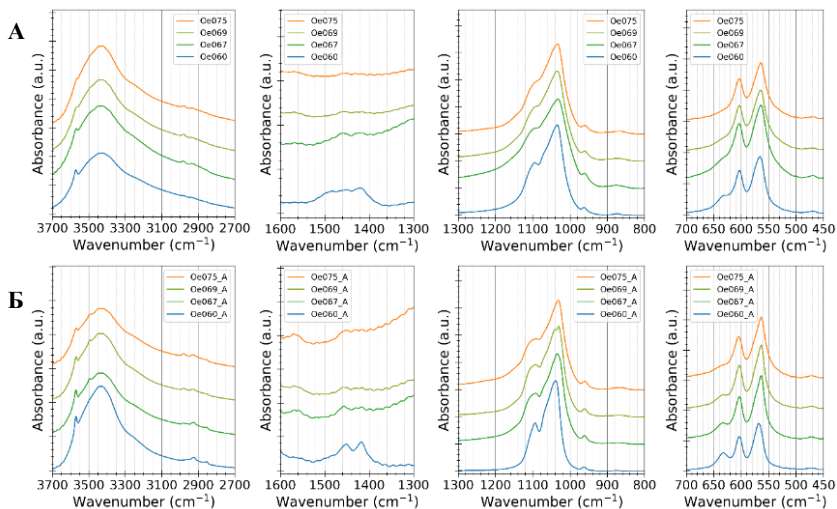
Забелязва се също, че при автоклавираните проби, с изключение на Oe060\_A, има и слаба ивица при  $\sim 3495\text{ cm}^{-1}$ . Според някои източници наличието им се дължи на включване на хлор в структурата на ХА и промяна на честотата на трептене на О-Н връзката (Maiti & Freund, 1981). Това е основание да се допусне, че в пробите е възможно включването на малко количество хлор, за което индикации имаше и от XRD. Заместването на ОН с хлор води и до появата на ивици при  $\sim 755$  и  $\sim 795\text{ cm}^{-1}$  поради

отместване честотата  $\nu_L$ , но това се наблюдава едва при заместване на над ~50% от  $\text{OH}^-$  с хлор, което обяснява липсата на такива ивици в спектрите на пробите.

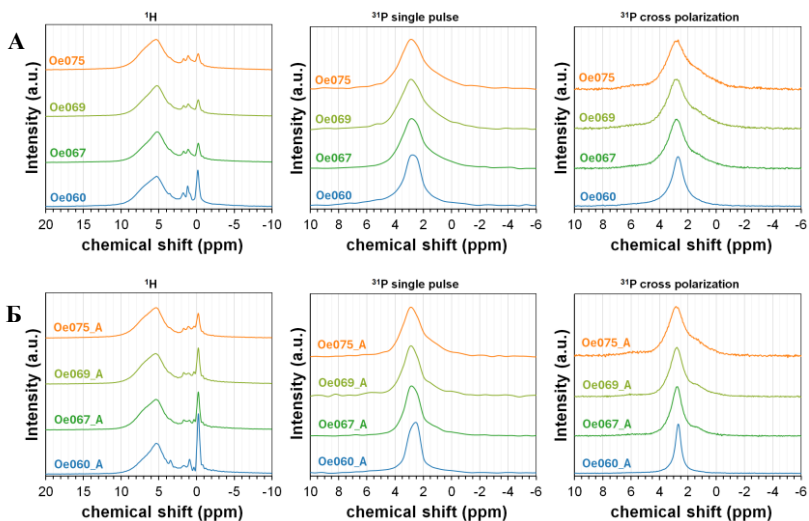
Между 1400 и 1500  $\text{cm}^{-1}$  се наблюдават слаби ивици, които се свързват с  $\nu_3$  ивицата на  $\text{CO}_3^{2-}$  при заместен с карбонат ХА. Това е най-явно при пробите 5:3:4, където има две ивици при около 1417 и 1451  $\text{cm}^{-1}$ . Наличието на карбонат в структурата на ХА не е неочаквано, тъй като при синтеза е използвана основа, за която не са били предприети стриктни мерки за опазване от атмосферния  $\text{CO}_2$ . От броя и позицията на тези ивици е установено, че заместването с карбонат е тип В, т.е. замества се фосфатен йон (Maduralli и съавт., 2017). Въз основа на литературни методи за оценка на количеството карбонат (Grunenwald и съавт., 2014) е установено, че при двете най-богати на калций проби то е съответно около 2,2% и 1,2%.



Фигура 22. Прахови рентгенови дифрактограми (XRD) на А) ненагряваните и Б) автоклавираниите проби (Таблица 5). Всеки спектър е нормиран спрямо най-високия си пик.



Фигура 23. Отделни участъци от FTIR спектрите на пробите от Таблица 5: А) ненагрявани; Б) автоклавирани.



Фигура 24.  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  MAS NMR спектри на пробите от Таблица 5. А) ненагрявани проби; Б) автоклавирани проби. В режим кръстосана поляризация  $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$  преносът на намагнитване е осъществен с протони с химично отместване: А) от долу нагоре 5,00 ppm; 5,14 ppm; 5,20 ppm; 5,67 ppm. Б) от долу нагоре 5,34 ppm; 5,45 ppm; 5,39 ppm; 5,48 ppm Носещата честота на  $^{31}\text{P}$  е настроена на 0 ppm.

Спектрите от  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  MAS NMR в твърдо състояние за двете серии проби са представени на Фигура 24. В протонните спектри на автоклавираните проби се наблюдават само пикове за структурна вода и за  $\text{OH}^-$  йон. Пикът при  $\sim -0,2$  ppm, отнасящ се за  $\text{OH}^-$  протон, е много по-интензивен при автоклавираните проби, което съответства и на изводите от ИЧ анализа. В  $^{31}\text{P}$  спектрите се наблюдава само един пик при около 2,7-2,9 ppm, характерен за апатитен фосфор. Той претърпява леко отместване в рамките на серията с повишаване дела на фосфора. При пробата с отношение 5:3:4 е симетричен и сравнително тесен, което е белег за стехиометричен апатит. При другите проби се разширява с нарастване дела на фосфор, а също е съпътстван и от рамо при  $\sim 1,5$  ppm, което може да се свърже с по-нехомогенно обкръжение и наличие на хидрогенфосфатни йони в нестехиометричен апатит.

Чрез данните от XRD и от FTIR могат да се определи т.нар. индекс на кристалност на ХА (Reyes-Gasga и съвт., 2013), означени съответно като  $\text{ИК}_{\text{XRD}}$  и  $\text{ИК}_{\text{FTIR}}$ . Важно уточнение е, че това не е степен на кристалност.

Методът за определяне на  $\text{ИК}_{\text{XRD}}$  използва пиковете при  $2\theta$  между  $31$  и  $35^\circ$  и се състои в следното. Поставя се базова линия между  $24^\circ$  и  $38^\circ 2\theta$  и се определя височината  $h(211)$  от базовата линия до пика при  $31,77^\circ$ , съответстващ на равнина (211). Определят се височините  $a(112)$ ,  $b(300)$  и  $c(202)$  на пиковете при  $32,20^\circ$ ,  $32,90^\circ$  и  $34,06^\circ$ , съответстващи на равнини (112), (300) и (202), като разстоянията между върха на дадения пик и дъното на долината между него и предходния пик. Индексът на кристалност се изчислява като:

$$\text{ИК}_{\text{XRD}} = \frac{a(112) + b(300) + c(202)}{h(211)}$$

За добре кристализирал синтетичен ХА  $\text{ИК}_{\text{XRD}}$  има стойност 1,5, а за ХА от човешки зъбен емайл и дентин са докладвани стойности 0,8 и 0,2.

$\text{ИК}_{\text{FTIR}}$  представлява отношението на сумата на височините  $A$  на пиковете на  $\nu_4$  огъванията при около  $565$  и  $605 \text{ cm}^{-1}$  и височината на дъното на седловината между тях при около  $595 \text{ cm}^{-1}$ , след като е била направена подходяща корекция на базовата линия.

$$\text{ИК}_{\text{FTIR}} = \frac{A(565) + A(605)}{A(590)}$$

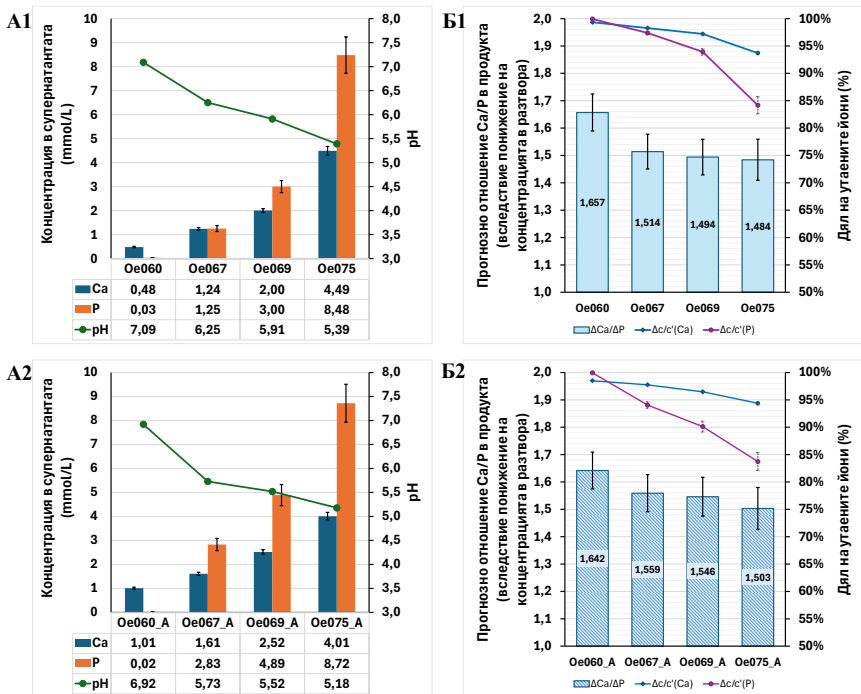
Минималната стойност за този индекс е 2 (ако трите височини са равни). Базовата линия е определена за три различни интервала ( $500-700\text{ cm}^{-1}$ ,  $450-750\text{ cm}^{-1}$  и  $500-750\text{ cm}^{-1}$ ) и съответно са получени три стойности за ИК, от които е определена средна стойност и стандартно отклонение.

Таблица 6. Индекс на кристалност на пробите от синтезите с добавена основа.

Проба	Oe060	Oe067	Oe069	Oe075	Oe060_A	Oe067_A	Oe069_A	Oe075_A
ИК <sub>XRD</sub>	0,24	0,18	0,16	0,26	0,57	0,57	0,47	0,56
ИК <sub>FTIR</sub>	4,69±0,09	4,08±0,11	4,34±0,09	4,58±0,11	6,78±0,19	6,30±0,19	6,26±0,19	5,56±0,19

Резултатите за двата индекса са представени в Таблица 6. Стойностите и за двата са по-високи за автоклавираните проби от тези за ненагряваните. При отношението с най-много калций и двата индекса имат високи стойности (в повечето случаи – най-високи) както за ненагряваните, така и за автоклавираните проби. Прави впечатление обаче, че при пробата с отношение 4:3:2 стойностите също са доста високи в повечето случаи, с изключение на ИК<sub>FTIR</sub> за автоклавираната проба, където индексът е значително по-нисък в сравнение с останалите автоклавиранни проби.

Концентрациите на неутаените калций и фосфор в надутайките са значително по-ниски в сравнение с опитите без добавяне на основа, като и за двата елемента нараства с нарастване началния дял на фосфор в прекурсорната смес (Фигура 25). Особено по отношение на калция това е в контраст с тенденцията при пробите без добавена основа, но лесно може да се обясни, като се има предвид, че с нарастване дела на фосфора намалява дялът на добавената основа и съответно рН се понижава. А разтворимостта на апатита (както на всички други калциеви фосфати) се повишава при понижаване на рН (Ishikawa, 2010). Изчисленото прогнозно отношение Ca:P в твърдата фаза (Фигура 25Б1,Б2) също свидетелства за стехиометричен ХА при пробите с начално отношение Ca:P:OH = 5:3:4. Също доста близо до заложеното отношение (1,50) в прекурсорната смес е отношението при проба Oe067 (1,51), но при автоклавираната проба дялът на калций се увеличава. При останалите проби също има завишаване дела на калций спрямо заложеното в прекурсорите (1,44 за 13:9:8 и 1,33 за 4:3:2). Това предполага, че предпочетено се осъществяват състави, в които дефицитът на калций е по-нисък.

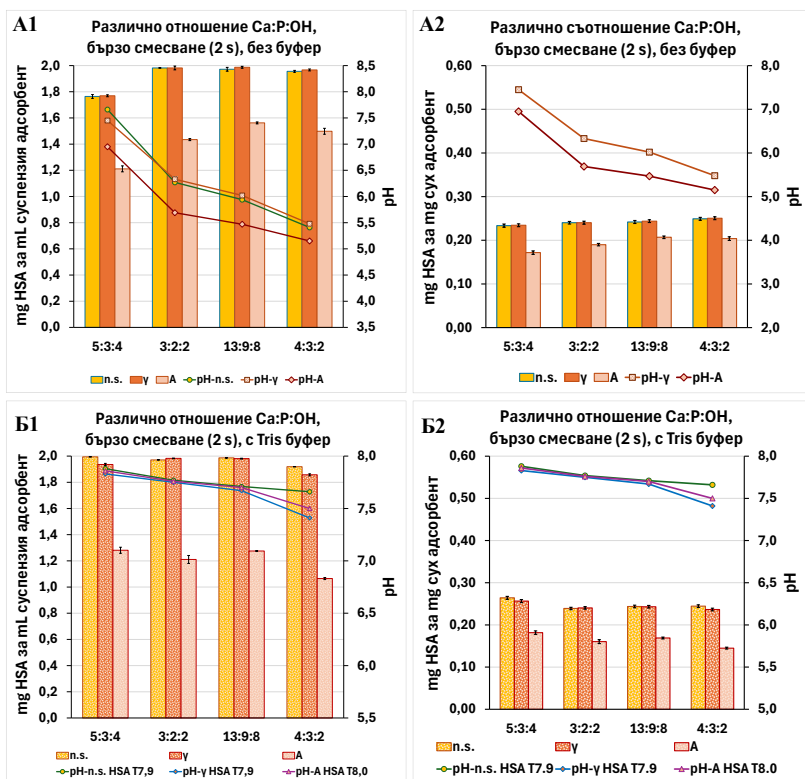


Фигура 25. Състав на разтвора над утайката и pH (A1 и A2), прогнозно атомно отношение Са:Р и дял на утаените йони (B1 и B2), изчислени от разликата между начална и крайна концентрация на разтвора, за пробите от Таблица 5 (A1 и B1 – ненагрявани, B1 и B2 - автоклавирани).

## 6.2. Адсорбционни експерименти

Адсорбционни експерименти с HSA са направени аналогично на тези с пробите без добавена основа. първоначално само с автоклавираните проби от Таблица 5. Ефективността на адсорбцията (Фигура 26) при нестерилизираните проби в отсъствие на буфер е малко под 90% в пробата с отношение 5:3:4, а за останалите три е изключително висока, около 98-99%. Резултатите са на практика същите и за пробите, стерилизирани с гама лъчи. При автоклавираните проби ефективността се понижава значимо, но въпреки това остава висока, като е в интервала от 60% (за 5:3:4) до 78% (за 13:9:8). В присъствие на Tris буфер с pH 7,9-8,0 ефективността на адсорбцията за ненагряваните проби – облъчени и необлъчени – остава близо до 100%, като само при отношение 4:3:2 спада до около 95%.

Адсорбцията, изразена като mg HSA за mg адсорбент (Фигура 26 A2 и B2), при автоклавираните проби е със слаба тенденция за повишаване без добавен буфер и за понижаване в присъствие на Tris. За ненагряваните суспензии – необлъчени и облъчени, е по-дискуссионно доколко е оправдано да се правят сравнения, защото при адсорбиране на ~100% от албумина евентуални разлики в свойствата биха могли да останат скрити. Все пак може да се отбележи, че проба с отношение 5:3:4, която адсорбира под 90% HSA, след отчитане на масата на сухия остатък на практика се изравнява с останалите проби.



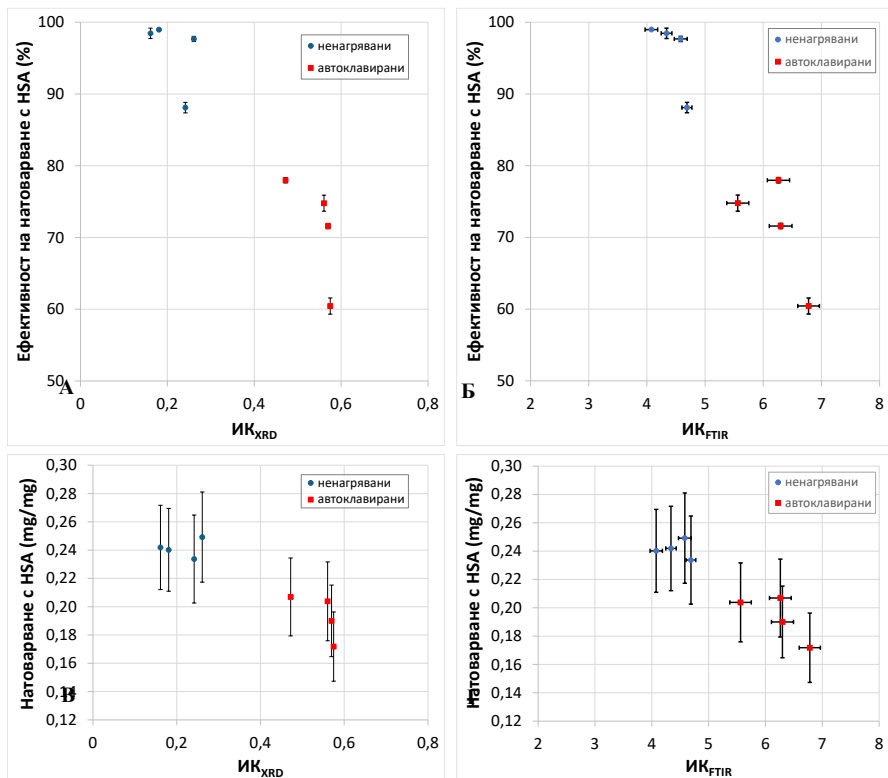
Фигура 26. Небуферизирана (А) и буферизирана (Б) адсорбция на HSA върху пробите с добавен NaOH и бързо смесване на прекурсорите (Таблица 5), заедно със стойности на pH преди и след съответния експеримент. При A1) и B1) адсорбцията е изразена за 1 mL суспензия, а при A2) и B2) – за 1 mg сухо вещество. Отделните стълбчета са съответно за нестерилизирани, облъчени с гама лъчи, и автоклавираните проби.

В сравнение със суспензиите при бавно смесване на прекурсорите без добавена основа, адсорбцията за единица маса при суспензиите с добавена основа е по-добра, с изключение на случаите с добавен Tris. Това предимство може да се обясни със значително по-малкия размер на частиците им. Що се отнася до резултатите с Tris, следва да се има предвид, че съответните данни за пробите без основа (Фигура 18 Б) се отнасят за началната маса на твърдото вещество и не отчитат масата на утаените *in-situ* частици по време на адсорбционния експеримент, поради което могат да се считат за надценени.

Тези резултати показват, че суспензиите, синтезирани с прибавяне на основа по време на синтеза, са много добър кандидат за носител на HSA и вероятно и на други подобни протеини. Облъчването с гама лъчи запазва благоприятните характеристики на ненагряваните проби, като същевременно осигурява стерилност.

Интересна е съпоставката на ефективността на натоварване на частиците апатит с HSA (като процент от общото му количество) с ИК<sub>XRD</sub> и ИК<sub>FTIR</sub> (Фигура 27). Забелязва се тенденция за понижаване на ефективността с нарастване на индекса на кристалност. Макар че в рамките на дадена серия проби (ненагрявани и автоклавиращи) корелацията между индекс на кристалност и адсорбирано количество HSA е слаба, за тяхната обща съвкупност тази корелация е значима. Логично е да се допусне, че индексът на кристалност също е сред факторите, имащи значение за адсорбцията.

Проведен е още един предварителен експеримент с допълнително синтезирани суспензии с отношение Са:Р:ОН = 5:3:4 и 4:3:2 с цел проверка доколко обратима е адсорбцията. Опитът е проведен без използване на Tris буфер. Резултатите при десетократно разреждане с физиологичен разтвор показват, че приблизително 4,9%±2,2% и 5,5%±2,8% от адсорбирания албумин бива освободен обратно в разтвора в рамките на 20 часа. Макар точните стойности да не са особено сигурни, качествено може да се твърди, че албуминът е задържан здраво от частиците. Необходими са още проучвания за по-сигурни количествени данни, както и за подходящо обяснение на наблюдаваното слабо освобождаване.



Фигура 27. Ефективност на натоварване (А и Б) и Натоварване за единица маса (В и Г) спрямо индекс на кристалност, определен чрез данни от XRD (А и В) и FTIR (Б и Г).

## 7. Резюме на основните резултати

1. Синтезиран е наноструктуриран магнезиев уитлокит от водни разтвори на  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и последващо нагряване при различни температури (95 и 115 °C) за различно време (1 и 3 h). Установено е, че утаяването при стайна температура води до смеси от микрокристален брушит и аморфен калциев магнезиев фосфат, които при нагряване образуват различни продукти с променлива морфология и кристална структура в зависимост от началното молно отношение  $\text{Ca}:\text{Mg}$ . Доказано е, че нанокристален магнезиев уитлокит се получава при начални молни отношения  $\text{Ca}:\text{Mg}$  от 65:35 до 85:15. Размерът на кристалитите на уитлокита варира в диапазона от 5 до 45 nm чрез промяна на температурата и времето на нагряване при постоянно молно отношение  $\text{Ca}:\text{Mg} = 75:25$ . Констатирано е, че след промиване на преципитатите с физиологичен разтвор, адсорбционният капацитет за моделен протеин (HSA) се повишава многократно – в зависимост от използваното отношение  $\text{Ca}:\text{Mg}$  и вариант на топлинна обработка между 3- и 13-кратно. Установено е, че пробите, съдържащи магнезиев уитлокит, показват умерена адсорбционна ефективност за HSA след промиване с физиологичен разтвор.

2. Синтезирани са серия фосфати на калций от водни разтвори на  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , стерилизирани чрез автоклавиране. При проведените опити с различни начални отношения  $\text{Ca}:\text{P}$  продуктът преди нагряване винаги е брушит, който след автоклавиране се трансформира в смес от нанокристален апатит и микрокристален монетит. Изследвана е способността на тези смеси да адсорбират HSA. Установено е, че възпроизводимостта на адсорбционните свойства на получените суспензии е ниска, а като вероятна основна причина за това се счита липсата на разбъркване при автоклавирането. Друг важен фактор изглежда е достигнатият етап на стареене на брушита в момента на подлагането му на топлинна обработка.

3. Разработен е двустадийен протокол за термична обработка, чийто първи етап е нагряване на кипяща водна баня, а втори – стерилизацията чрез автоклавиране. Установено е, че разбъркването по време на първата стъпка в значителна степен предотвратява образуването на нежелани големи (микрокристални) монетитни кристали, променя съотношението на размерите им и води до образуване на смеси от нанокристален апатит и монетит, чиито свойства за свойства за адсорбция на албумин са по-постоянни.

Установено е, че като междинен продукт при термичната трансформация се образува октакалциев фосфат. Показана е възможността характеристиките на нанокристалите и адсорбционната ефективност за моделен протеин да бъдат варирани чрез изменение на началното молно отношение Са:Р. Установено е, че добавянето на Tris буфер при адсорбционните експерименти влияе на резултатите както чрез стимулиране на допълнителна кристализация при по-богати на калций смеси с по-ниско рН, така и чрез промяна на дзета потенциала на частиците.

4. Синтезирани са серия проби чрез бързо смесване на водни разтвори на  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaOH}$  с различни отношения Са:Р:ОН, като с повишаване дела на фосфора е понижаван делът на прибавената основа. Установено е, че продуктите са стехиометричен хидроксилапатит и нестехиометричен (калций-дефицитен) апатит, с продълговати кристали с дължина няколко десетки нанометра и ширина около 10 nm. При отношение Са:Р:ОН = 5:3:4 апатитът е стехиометричен и кристалите са най-малки. Суспензиите са стерилизирани по два различни метода – чрез автоклавиране и облъчване с гама лъчи. Показано е, че автоклавирането води до слабо увеличаване на размерите на кристалите и повишаване на кристалността им, както и до понижаване на рН на суспензията. Ненагряваните и облъчените проби показват много висока ефективност при адсорбцията на HSA – между 89 и 99%, докато при автоклавирането тя възлиза на 60 – 75%. Установено е, че адсорбираният протеин е здраво свързан с наночастиците, като при десетократно разреждане на суспензиите с адсорбиран албумин само около 5-6% от албумина се освобождава за период от 20 h.

## 8. Приноси

1. Разработен е нов метод за синтез на наночастици от магнезиев уитлокит, състоящ се от утаяване при стайна температура и последваща топлинна обработка чрез автоклавиране при меки условия или нагряване на кипяща водна баня. Установено е, че времетраенето и температурата, при която се провежда процесът, имат съществен ефект върху кристалността и морфологията на частиците. Докладваните в литературата процедури използват по-високи температури или по-дълги времена на автоклавиране, или много по-скъпи прекурсори.
2. Предложен е метод за синтез на стерилен аморфен калциево-магнезиев фосфат (АКМФ) чрез съутаяване на Ca(II) и Mg(II) с хидрогенфосфат при молно съотношение Ca:Mg = 25:75 и 50:50, и последващо автоклавиране при меки условия. Показано е, че автоклавирането не променя аморфния характер на материала.
3. За пръв път е използван двустадийен протокол за стерилизиране на суспензии от брусит и превръщането му в микрокристален монетит и нанокристален апатит, включващ нагряване на кипяща водна баня за 30 или 60 min и разбъркване, и последващо автоклавиране при меки условия. Този протокол позволява подобряване на възпроизводимостта и адсорбционните свойства на продукта.
4. Установено е, че Tris буферът влияе върху адсорбцията на албумин върху калциев фосфат чрез стимулиране на допълнителна *in situ* преципитация и чрез промяна на дзета потенциала на частиците.
5. Разработена е процедура за синтез на нанокристален хидроксилapatит и хидроксилapatити с дефицит на калций чрез използване на алкализирания разтвор на  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  с контролирано отношение Ca:P:OH. За пръв път е докладвано сравнение на адсорбционните свойства на необлъчен и облъчен с гама-лъчи апатит в суспензионна форма. Установено е, че стерилизирането с гама-лъчи запазва високия адсорбционен капацитет на термично необработените суспензии.

## Литература

- Berry, E. E. (1967). The structure and composition of some calcium-deficient apatites. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 29(2), 317–327. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(67\)80033-2](https://doi.org/10.1016/0022-1902(67)80033-2)
- Chen, X., Li, H., Ma, Y., & Jiang, Y. (2023). Calcium Phosphate-Based Nanomaterials: Preparation, Multifunction, and Application for Bone Tissue Engineering. *Molecules*, 28(12), 4790. <https://doi.org/10.3390/molecules28124790>
- Cheng, P.-T. (1989). Magnesium Inhibits Octacalcium Phosphate and Apatite but Promotes Whitlockite and Brushite Formation. B V. R. Walker, R. A. L. Sutton, E. C. B. Cameron, C. Y. C. Pak, & W. G. Robertson (Ред.Кол.), *Urolithiasis* (стр. 225–226). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0873-5\\_65](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0873-5_65)
- Di Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F., & Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: From 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
- Dorozhkin, S. V. (2009). Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, 2(2), 399–498. <https://doi.org/10.3390/ma2020399>
- Drouet, C. (2013). Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds. *BioMed Research International*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/490946>
- Elliot, J. S., Sharp, R. F., & Lewis, L. (1959). Summary of the Effect of the Molar Ca/P Ratio upon the Crystallization of Brushite and Apatite. *The Journal of Physical Chemistry*, 63(5), 725–726. <https://doi.org/10.1021/j150575a020>
- Grunenwald, A., Keyser, C., Sautereau, A. M., Crubézy, E., Ludes, B., & Drouet, C. (2014). Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: A validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*, 49, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.05.004>
- Hajiali, H., Ouyang, L., Llopis-Hernandez, V., Dobre, O., & Rose, F. R. A. J. (2021). Review of emerging nanotechnology in bone regeneration: Progress, challenges, and perspectives. *Nanoscale*, 13(23), 10266–10280. <https://doi.org/10.1039/D1NR01371H>
- Hem, S. L., & HogenEsch, H. (2007). Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 685–698. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.685>
- Ishikawa, K. (2010). Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution-Precipitation Reactions. *Materials*, 3(2), 1138–1155. <https://doi.org/10.3390/ma3021138>
- Jensen-Jarolim, E., Roth-Walter, F., Jordakieva, G., & Pali-Schöll, I. (2021). Allergens and Adjuvants in Allergen Immunotherapy for Immune Activation, Tolerance, and Resilience. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(5), 1780–1789. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.12.008>
- Khalifehzadeh, R., & Arami, H. (2020). Biodegradable calcium phosphate nanoparticles for cancer therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 279, 102157. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102157>
- Lin, Y.-J., Zimmermann, J., & Schülke, S. (2024). Novel adjuvants in allergen-specific immunotherapy: Where do we stand? *Frontiers in Immunology*, 15, 1348305. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1348305>

- Madupalli, H., Pavan, B., & Tecklenburg, M. M. J. (2017). Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *Journal of Solid State Chemistry*, 255, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>
- Maiti, G. C., & Freund, F. (1981). Incorporation of chlorine into hydroxy-apatite. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 43(11), 2633–2637. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(81\)80589-1](https://doi.org/10.1016/0022-1902(81)80589-1)
- Masson, J.-D., Thibaudon, M., Bélec, L., & Crépeaux, G. (2017). Calcium phosphate: A substitute for aluminum adjuvants? *Expert Review of Vaccines*, 16(3), 289–299. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1244484>
- Maughan, C. N., Preston, S. G., & Williams, G. R. (2015). Particulate inorganic adjuvants: Recent developments and future outlook. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 426–449. <https://doi.org/10.1111/jphp.12352>
- Morefield, G. L., Sokolovska, A., Jiang, D., HogenEsch, H., Robinson, J. P., & Hem, S. L. (2005). Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*, 23(13), 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.050>
- Paneque-Quevedo, A. A. (2013). Inorganic compounds as vaccine adjuvants. *Biotecnología Aplicada*, 30(4), 250–256.
- Pourpoint, F., Gervais, C., Bonhomme-Coury, L., Azaïs, T., Coelho, C., Mauri, F., Alonso, B., Babonneau, F., & Bonhomme, C. (2007). Calcium Phosphates and Hydroxy-apatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations. *Applied Magnetic Resonance*, 32(4), 435–457. <https://doi.org/10.1007/s00723-007-0040-1>
- Qi, C., Chen, F., Wu, J., Zhu, Y.-J., Hao, C.-N., & Duan, J.-L. (2016). Magnesium whitlockite hollow microspheres: A comparison of microwave-hydrothermal and conventional hydrothermal syntheses using fructose 1,6-bisphosphate, and application in protein adsorption. *RSC Advances*, 6(40), 33393–33402. <https://doi.org/10.1039/C6RA00775A>
- Qi, C., Zhu, Y.-J., Chen, F., & Wu, J. (2015). Porous microspheres of magnesium whitlockite and amorphous calcium magnesium phosphate: Microwave-assisted rapid synthesis using creatine phosphate, and application in drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(39), 7775–7786. <https://doi.org/10.1039/C5TB01106J>
- Ramya, J. R., Arul, K. T., Sathiamurthi, P., Asokan, K., & Kalkura, S. N. (2016). Novel gamma irradiated agarose-gelatin-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for skin tissue regeneration. *Ceramics International*, 42(9), 11045–11054. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.001>
- Reyes-Gasga, J., Martínez-Piñero, E. L., Rodríguez-Álvarez, G., Tiznado-Orozco, G. E., García-García, R., & Brès, E. F. (2013). XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering: C*, 33(8), 4568–4574. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>
- Rowles, S. (1968). The precipitation of whitlockite from aqueous solutions. *Bulletin de la Société Chimique de France*, 1797–1802.
- Ryan, L. M., Cheung, H. S., LeGeros, R. Z., Kurup, I. V., Toth, J., Westfall, P. R., & McCarthy, G. M. (1999). Cellular Responses to Whitlockite. *Calcified Tissue International*, 65(5), 374–377. <https://doi.org/10.1007/s002239900716>
- Sahadat Hossain, Md., Shaikh, Md. A. A., Jahan, S. A., Mahmud, M., Bin Mobarak, M., Rahaman, Md. S., Uddin, Md. N., & Ahmed, S. (2023). Exploring the biomedical

- competency of gamma-radiation aided hydroxyapatite and its composite fabricated with nano-cellulose and chitosan. *RSC Advances*, 13(14), 9654–9664.  
<https://doi.org/10.1039/D3RA00476G>
- Salimi, M. H., Heughebaert, J. C., & Nancollas, G. H. (1985). Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions. *Langmuir*, 1(1), 119–122.  
<https://doi.org/10.1021/la00061a019>
- Shahabi, S., Najafi, F., Majdabadi, A., Hooshmand, T., Haghbin Nazarpak, M., Karimi, B., & Fatemi, S. M. (2014). Effect of Gamma Irradiation on Structural and Biological Properties of a PLGA-PEG-Hydroxyapatite Composite. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/420616>
- Sun, Z., Li, W., Lenzo, J. C., Holden, J. A., McCullough, M. J., O'Connor, A. J., & O'Brien-Simpson, N. M. (2021). The Potential of Calcium Phosphate Nanoparticles as Adjuvants and Vaccine Delivery Vehicles. *Frontiers in Materials*, 8, 788373. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.788373>
- Tas, A. C. (2016). Transformation of Brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) to Whitlockite ( $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$ ) or Other CaPs in Physiologically Relevant Solutions. *Journal of the American Ceramic Society*, 99(4), 1200–1206.  
<https://doi.org/10.1111/jace.14069>
- Vandecandelaere, N., Rey, C., & Drouet, C. (2012). Biomimetic apatite-based biomaterials: On the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(11), 2593–2606.  
<https://doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>

## Научни публикации

в които са представени резултати от дисертационния труд

1. Angelova, N., Koleva, S., Kostadinov, M., Yordanov, G. (2022). Preparation, characterization and protein adsorption properties of nanostructured magnesium whitlockite. *Journal of Materials Science*, 57, 21571–21582. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-08011-z>
2. Kostadinov, M., Angelova, N., Yordanov, G. (2025). Characteristics and protein adsorption properties of calcium phosphate suspensions obtained by heat-induced transformations of brushite adjuvant at variable precursors molar ratio. *Journal of Materials Science*, 60, 15551–15566. <https://doi.org/10.1007/s10853-025-11423-2>

## Участия в научни конференции

на които са представени резултати от дисертационния труд

1. М. Костадинов, Н. Ангелова, Г. Йорданов, Protein adsorption of newly formulated potential vaccine adjuvants of mixed calcium-magnesium hydroxyphosphates, Младешка научна конференция „Климентови дни“, 8 ноември 2019 г., София, България (постер).
2. М. Костадинов, Г. Йорданов, Суспензии от нано-апатит и монетит за доставяне на протеини, Конференция „135 години университетско образование по неорганична химия“, 30-31 октомври 2024 г., София, България (постер).
3. М. Костадинов, Н. Ангелова, Г. Йорданов, Получаване на аморфен и нано-апатит като носител/адсорбент за протеини, Научна сесия на ФХФ в рамките на честванията на Климентовите дни, 21 ноември 2024 г., София, България (постер).

## Забелязани цитати

(Справка в ResearchGate, 05.09.2025)

Angelova, N., Koleva, S., Kostadinov, M., Yordanov, G. (2022). Preparation, characterization and protein adsorption properties of nanostructured magnesium whitlockite. *Journal of Materials Science*, 57, 21571–21582.

1. Raiseliene, R., Linkaite, G., Ezerskyte, A., & Grigoraviciute, I. (2025). Tailored Morphology and Phase Evolution of Magnesium Whitlockite Granules via a Dissolution–Precipitation Approach. *Applied Sciences*, 15(13), 7221. <https://doi.org/10.3390/app15137221>
2. Chandramouli, A., Rajendran, A. K., Hwang, N. S., & Rangasamy, J. (2026). Whitlockite nanoparticles: A multifaceted magnesium calcium phosphate ceramic. *Bio-materials Advances*, 178, 214476. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214476>