



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο
Πατρών



Πανεπιστήμιο
Κρήτης



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Συνδυαστική χρήση βιοφυσικών και βιοχημικών μεθόδων για τον δομικό χαρακτηρισμό φαρμακευτικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων

Μάριος Κωνσταντόπουλος (Α.Μ.: 59)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ. 2025



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο
Πατρών



Πανεπιστήμιο
Κρήτης



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Συνδυαστική χρήση βιοφυσικών και βιοχημικών μεθόδων για τον δομικό χαρακτηρισμό φαρμακευτικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων

Μάριος Κωνσταντόπουλος (Α.Μ.: 59)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ. 2025

Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

του κ. Μάριου Κωνσταντόπουλου

Επιβλέπων: Δρ. Ειρήνη Μαργιωλάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών

Θέμα: «Συνδυαστική χρήση βιοφυσικών και βιοχημικών μεθόδων για τον δομικό χαρακτηρισμό φαρμακευτικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων»

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από την Επιτροπή Προγράμματος Σπουδών (ΕΠΣ)::.....^A/...-...-....

1. Δρ. Ειρήνη Μαργιωλάκη, Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών
2. Δρ. Θεοχάρης Σταματάτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών
3. Δρ. Σπυρίδων Περλεπές, Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις _____

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.
Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού

Ο/Η Γραμματέας

諦めないで

akira · me · na · i · de

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στην ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας Ακτίνων-Χ, του Τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Πατρών.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην Δρ. Ειρήνη Μαργιωλάκη, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Π.Π. Η κ. Μαργιωλάκη είναι ένας επιστήμονας, ο οποίος με χαρά με υποδέχτηκε στην ερευνητική ομάδα, με καθοδήγησε, μου έμαθε να σκέφτομαι επιστημονικά και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την μελέτη μου στα πλαίσια ενός τόσο ενδιαφέροντος επιστημονικού αντικειμένου. Η προτροπή της να παρουσιάζω την δουλειά μου στην επιστημονική κοινότητα με βοήθησε να συνειδητοποιήσω πως στο τέλος της ημέρας αυτό που μετράει είναι η σύνδεση με άλλους επιστήμονες και ο διαμοιρασμός της γνώσης. Όμως δεν θα ήθελα να σταθώ μόνο στον επιστήμονα αλλά να μιλήσω και για τον άνθρωπο. Ένας άνθρωπος, ο οποίος είναι εκεί να ακούσει οποιοδήποτε πρόβλημα των φοιτητών του, μελών ή μη της ομάδας, ένας άνθρωπος που παλεύει για τα δικαιώματά μας και μας μαθαίνει να παλεύουμε και εμείς για αυτά που αξίζουμε και τέλος ένας άνθρωπος που τους προσεγγίζει όλους με καλή διάθεση, ευγένεια και νοιάξιμο. Την ευχαριστώ πάρα πολύ από καρδιάς.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους του Δι-ιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ανόργανη Βιολογική Χημεία», του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο Δρ. Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Π.Ι., με καλωσόρισε και δέχτηκε με θέρμη να σπουδάσω στο συγκεκριμένο ΠΜΣ. Τον ευχαριστώ πάρα πολύ για αυτήν την ευκαιρία να έρθω σε επαφή και με άλλα ερευνητικά αντικείμενα, τα οποία δεν είχα διδαχτεί καν σε προπτυχιακό επίπεδο και μου φάνηκαν πολύ ενδιαφέροντα. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι το συγκεκριμένο ΠΜΣ είναι ο ορισμός της σύνδεσης της επιστημονικής κοινότητας, και για αυτόν τον λόγο θα ήθελα να του δώσω και εγώ τα δικά μου συγχαρητήρια για όλο τον συντονισμό που έχει γίνει πίσω από αυτό. Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω την Δρ. Χριστίνα Μπαντή, συνάδελφο Βιολόγο και μέλος του εργαστηρίου Ανόργανης Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Π.Ι., η οποία και ως διδάσκουσά μου, αλλά και ως συντονίστρια του μεταπτυχιακού ήταν εκεί πάντα άμεσα να δώσει διευκρινήσεις και να λύσει οποιαδήποτε απορία, ζήτημα ή πρόβλημα προέκυπτε κατά την διάρκεια της φοίτησής μου. Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλους τους διδάσκοντες του ΠΜΣ, για όλη την γνώση που έλαβα από αυτούς.

Θερμές ευχαριστίες στους Δρ. Θεοχάρη Σταματάτο, Καθηγητή και Δρ. Σπυρίδων Περλεπέ, Ομότιμο Καθηγητή, του Τμήματος Χημείας του Π.Π., οι οποίοι με χαρά αποδέχτηκαν να είναι μέλη της Τριμελούς Επιτροπής αξιολόγησης της εργασίας μου.

Περνώντας στα νυν μέλη της ερευνητικής ομάδας, θα ήθελα να εκφράσω όλα τα θετικά συναισθήματα που νιώθω για τους συνοδοιπόρους μου τα τρία χρόνια που είμαι μέλος της ομάδας, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Σταματίνα Καφετζή και Δημήτρη Κούτουλα, για εμένα Ματινάκι και Μήτσο. Με τα παιδιά αυτά μοιραστήκαμε όλα τα καθημερινά μικρά και μεγάλα άγχη, εντός και εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος, αλληλοστηριχθήκαμε και δημιουργήσαμε μια τόσο δυνατή φιλία, με όλη την σημασία της λέξης. Τους ευχαριστώ άπειρα για την παρουσία τους και την συμβολή τους στο να κάνουν κάθε μέρα πιο εύκολη και βατή. Είμαι σίγουρος πως έχουμε ακόμα πολλές κοινές εμπειρίες για να περάσουμε μαζί και δεν μπορώ παρά να ανυπομονώ για την συνέχεια. Πάρα πολλές ευχαριστίες οφείλω στην Χριστίνα Παπαευθυμίου, υποψήφια διδάκτορα πλέον στο ESRF. Η Χριστίνα ήταν εκεί από την πρώτη στιγμή που πήγα στην ομάδα για να με βοηθήσει, να με καθοδηγήσει και να μου μάθει. Πολλές φορές την ένιωθα σαν μια ασπίδα γύρω μου, και δεν θα μπορούσα παρά να την περιγράψω σαν έναν εργαστηριακό φύλακα

άγγελο. Την ευχαριστώ για την φιλία της και θέλω να της ευχηθώ τα καλύτερα σε αυτό το επόμενο, μεγάλο βήμα που κάνει στην ακαδημαϊκή καριέρα της. Είμαι σίγουρος πως θα τα καταφέρει λόγω του πείσματος και της επιστημονικής ακεραιότητας που την διακατέχουν. Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τα νεότερα μέλη της ερευνητικής ομάδας Μαριάννα Λαμπροπούλου, Άρτεμις Καραπέτη, Νικόλαο Παγώνη και Μαρία Νεφέλη Καραγρηγορίου, τα εργαστηριακά μας νιάνιαρα, τα οποία με χιούμορ και καλή διάθεση συνέβαλαν στην διατήρηση ενός όμορφου εργαστηριακού κλίματος.

Από τα πρώην μέλη της ομάδας, θέλω να ευχαριστήσω πάρα πολύ τον Άγγελο Κονταρίνη. Με τον Άγγελο συμπορευθήκαμε στο εργαστήριο για δύο χρόνια και είναι ένας άνθρωπος γεμάτος χαρά, καλοσύνη, απίστευτες γνώσεις και ήταν πάντα εκεί να με βοηθήσει και να με συμβουλέψει. Μοιραστήκαμε άγχη, προβληματισμούς, αλλά και όμορφες στιγμές και θέλω να του ευχηθώ τα καλύτερα στην μετέπειτα πορεία του. Θερμές ευχαριστίες στην Δρ. Μαίρη Σπηλιοπούλου, για όλη την βοήθειά της και τις συμβουλές της πάνω στην παρούσα εργασία, καθώς και στον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Τριανταφυλλίδη, για την πολύτιμη βοήθεια του και το άκουσμα στο κάλεσμά μας για τον σχεδιασμό νέων δειγματοφορέων για τα *in situ* XRPD πειράματα σε συνθήκες μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας. Επίσης, ευχαριστώ τις Θεοδώρα Αλεξίου, Μαρία Αθανασιάδου, Μαρία Αλεβίζου και Ιωάννα Μπεκίρη, παλαιότερα μέλη της ομάδας με τα οποία έτυχε να συνυπάρξω και να έχω μια άψογη συνεργασία.

Σχετικά με συνεργάτες και ανθρώπους εκτός του Πανεπιστημίου Πατρών, οι οποίοι συνέβαλαν να έρθει εις πέρας η παρούσα εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Dr. Andrew Fitch και Dr. Catherine Dejoie, τους υπεύθυνους beamline scientists του ID22 στο ESRF, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή τους κατά τον χρόνο πειραμάτων περίθλασης τον Ιούλιο 2023 και τον Ιούλιο 2025. Ευχαριστώ πολύ την Dr. Isabel Bento, η οποία ως local contact στα πειράματα περίθλασης του Ιουνίου 2024 στον πειραματικό σταθμό P13 στο DESY, βοήθησε και συμβούλεψε ουσιαστικά κατά την συλλογή δεδομένων. Πολλές ευχαριστίες στον Dr. Max Nanao, υπεύθυνο beamline scientist του ID23-2 στο ESRF, και την Χριστίνα Παπαευθυμίου, υποψήφια διδάκτορα, η οποία εκτέλεσε αποκλειστικά την συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων SCXRD κατά τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εκεί τον Ιούνιο 2025. Θερμές ευχαριστίες στους Dr. Detlef Beckers και Dr. Thomas Degen από την Malvern PANalytical για όλη την υποστήριξή τους στα εργαστηριακά συστήματα περίθλασης. Πολλές ευχαριστίες στους Dr. Matthias Norrman και Dr. Gerd Shcluckebier από την Novo Nordisk για την παροχή ανθρώπινης ινσουλίνης και πρωτοκόλλων κρυστάλλωσής της, στα πλαίσια της πολυετούς συνεργασίας με την ομάδα. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την κ. Μαρίνα Μωραΐτη από την Alfatec, για την υλικοτεχνική υποστήριξη σχετικά με τον θάλαμο μεταβαλλόμενης σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας MHC-trans.

Εντός του Πανεπιστημίου Πατρών, ευχαριστώ το Τμήμα Βιολογίας, στο οποίο φοιτώ τα τελευταία έξι χρόνια και πάντα θα έχει μια θέση στην καρδιά μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλη την ερευνητική ομάδα Δομικής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας της Δρ. Μαρίας Δημαρόγκωνα, Επίκουρης Καθηγήτριας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών, και τα μέλη αυτής, τον Δρ. Χρήστο Κοσίνα και την υποψήφια διδάκτορα Παναγιώτα Καραμπά, για την συνεργασία μας κατά τα κοινά πειράματα περίθλασης SCXRD. Θερμές ευχαριστίες οφείλω ξεχωριστά στην Παναγιώτα Καραμπά, με την οποία είχαμε άριστη συνεργασία στα πλαίσια της διοργάνωσης της 5ης Συνάντησης των Νέων Ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών τον Οκτώβριο 2024. Επίσης ευχαριστώ τους Νικολίνα Χαραλάμπους και Γιώργο Καλαμαρά, υποψήφιους διδάκτορες και μέλη της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Στέφανου Νταϊλιάνη, Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος Βιολογίας, για το κέφι, το χιούμορ και τις όμορφες συζητήσεις μας.

Τέλος, θα ήθελα να κλείσω αυτόν τον απολογισμό ευχαριστώντας τους πιο γερούς υποστηρικτές μου, αυτούς που δεν φαίνονται, τους σιωπηλούς, αλλά η παρουσία τους είναι αισθητή. Μιλάω για την

οικογένεια και τους φίλους μου. Ευχαριστώ την Ρούλα, τον Κώστα και τον Βασίλη, για τον άνθρωπο που με έχουν διαμορφώσει να είμαι, για τις γερές βάσεις που μου έδωσαν και τις αξίες που μου έχουν μεταφέρει. Ελπίζω να είναι περήφανοι για εμένα και για τον άνθρωπο που έχουν βγάλει στην κοινωνία. Ξεχωριστή αναφορά θέλω να κάνω στην γιαγιά μου Ασπασία, την αδυναμία μου, την ασπίδα μου, η οποία σε μια τρυφερή ηλικία και κρίσιμη φάση της ζωής μου στάθηκε δίπλα μου σαν μάνα και πατέρα. Η ευγνωμοσύνη που αισθάνομαι για εκείνη είναι απεριόριστη, και ελπίζω να είναι περήφανη για εμένα. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου. Ξεχωριστή αναφορά θέλω να κάνω στις Άννα, Βάσια και Πέννυ, που γνωρίζω περισσότερο από την μισή ζωή μου και έχω δημιουργήσει μαζί τους άρρηκτους δεσμούς. Ευχαριστώ για όλη την αγάπη τους, την πίστη τους σε εμένα, την υπερηφάνεια τους και τις, πραγματικά, άπειρες ώρες ψυχολογικής υποστήριξης. Είναι οι άνθρωποι που με διαλέξανε και τους διάλεξα, και πλέον θεωρώ οικογένειά μου, γιατί οι φίλοι είναι η οικογένεια που εμείς διαλέγουμε.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΔΟΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΤΟ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	3
1.1. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών	3
1.1.1. Βιοχημικές & Φυσικοχημικές αρχές κρυστάλλωσης	4
1.1.2. Πυρήνωση & Ανάπτυξη κρυστάλλων – Διαγράμματα φάσης	5
1.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών	7
1.1.4. Μέθοδοι κρυστάλλωσης	9
1.2. Ακτίνες-X	11
1.2.1. Ιδιότητες ακτίνων-X	12
1.2.2. Παραγωγή ακτίνων-X	13
1.2.2.1. Ακτινοβολία πέδησης	13
1.2.2.2. Χαρακτηριστικές ακτίνες-X	14
1.2.3. Πηγές ακτίνων-X	15
1.2.3.1. Σωλήνες ακτίνων-X	15
1.2.3.2. Ακτινοβολία σύγχροτρον	16
1.3. Δομή & Συμμετρία κρυστάλλων	17
1.3.1. Κρυσταλλικό πλέγμα & Τύποι κέντρωσης	18
1.3.2. Κρυσταλλικά συστήματα & Πλέγματα Bravais	19
1.3.3. Διεργασίες συμμετρίας, Ομάδες συμμετρίας σημείου & Ομάδες συμμετρίας χώρου	21
1.3.4. Κρυσταλλογραφικά επίπεδα & Δείκτες Miller	24
1.4. Περίθλαση ακτίνων-X	25
1.4.1. Κυματική θεωρία & Συμβολή κυμάτων	26
1.4.2. Σκέδαση από σύστημα δύο ηλεκτρονίων	27
1.4.3. Σκέδαση από ένα άτομο	28
1.4.4. Σκέδαση από μία μοναδιαία κυψελίδα	29
1.4.5. Σκέδαση από έναν κρύσταλλο	30
1.4.6. Νόμος του Bragg	31
1.4.7. Αντίστροφος χώρος & Σφαίρα του Ewald	32
1.4.8. Υπολογισμός της ηλεκτρονιακής πυκνότητας	34
1.4.8.1. Επίλυση του προβλήματος φάσης	34
1.4.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της περιθλούσας ακτινοβολίας	35
1.4.10. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της περιθλούσας ακτινοβολίας	36
1.4.10.1. Περίθλαση ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο – SCXRD	36
1.4.10.2. Περίθλαση ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικό δείγμα – XRPD	37
2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ	40
2.1. Βιοσύνθεση & Έκκριση	40

2.2.	Μηχανισμός δράσης	42
2.3.	Δομή της ανθρώπινης ινσουλίνης	42
2.4.	Μοριακές διαμορφώσεις	44
2.5.	Κρυσταλλικός πολυμορφισμός	45
2.5.1.	Ρεσορσινόλη	47
2.5.2.	4-Χλωρορεσορσινόλη	47
2.6.	Σακχαρώδης διαβήτης	48
2.7.	Φαρμακευτικά σκευάσματα	49
3.	ΛΥΣΟΖΥΜΗ	51
3.1.	Βιοσύνθεση & Έκκριση	51
3.2.	Μηχανισμός δράσης	52
3.3.	Δομή της HEWL	52
3.4.	Μοριακός & Κρυσταλλικός πολυμορφισμός	53
3.5.	Λυσοζύμη & Παθοφυσιολογία	54
3.6.	Φαρμακευτικές & Βιομηχανικές εφαρμογές	54
4.	ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	56
5.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ	57
5.1.	Υλικά & Μέθοδοι	57
5.1.1.	Πειράματα κρυστάλλωσης	57
5.1.1.1.	Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο batch	57
5.1.1.2.	Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο διάχυσης ατμών	63
5.1.2.	Προετοιμασία δειγμάτων	66
5.1.2.1.	Προετοιμασία πολυκρυσταλλικών δειγμάτων	66
5.1.2.2.	Προετοιμασία δειγμάτων μονοκρυστάλλων	66
5.1.3.	Συλλογή δεδομένων περίθλασης	67
5.1.3.1.	Εργαστηριακό περιθλασίμετρο (X'Pert Pro, Malvern PANalytical)	67
5.1.3.2.	Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτρον – Πειραματικός σταθμός ID22	68
5.1.3.3.	Γερμανικό Σύγχροτρον (PETRA III – Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY) – Πειραματικός σταθμός P13	70
5.1.3.4.	Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτρον – Πειραματικός σταθμός ID23-2	70
5.1.4.	Επεξεργασία & Ανάλυση δεδομένων περίθλασης	71
5.2.	Αποτελέσματα	73
5.2.1.	Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη ρεσορσινόλη	73
5.2.2.	Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη	87
5.2.3.	Πρωταρχικά βήματα του δομικού χαρακτηρισμού του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης με σύγχροτρον δεδομένα XRPD	93
5.2.4.	Αποτελέσματα δεδομένων SCXRD – Το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(\gamma)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης	95

5.3.	Συμπεράσματα & Συζήτηση	96
6.	<i>IN SITU</i> XRPD ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΣΕ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	101
6.1.	Υλικά & Μέθοδοι	102
6.1.1.	Πειράματα κρυσταλλώσεων	102
6.1.1.1.	Κρυσταλλώσεις ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλης	102
6.1.1.2.	Κρυσταλλώσεις HEWL	103
6.1.2.	Προετοιμασία δειγμάτων	104
6.1.3.	Συλλογή δεδομένων περίθλασης	104
6.1.3.1.	Θάλαμος σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας (MHC-trans, Anton Paar)	104
6.1.3.2.	Πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων για το σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης	105
6.1.3.3.	Πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων για την HEWL	106
6.1.4.	Επεξεργασία & Ανάλυση δεδομένων περίθλασης	109
6.2.	Αποτελέσματα	109
6.2.1.	Επίδραση της σχετικής υγρασίας στο σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης	109
6.2.2.	Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην HEWL	117
6.3.	Συμπεράσματα & Συζήτηση	126
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	129
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	136

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, πραγματοποιείται κρυσταλλογραφική μελέτη της επίδρασης διάφορων φυσικοχημικών παραμέτρων στον μοριακό και κρυσταλλικό πολυμορφισμό της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία οργανικών προσδετών. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν *in situ* κρυσταλλογραφικές μελέτες της επίδρασης της σχετικής υγρασίας σε κρυστάλλους ανθρώπινης ινσουλίνης και λυσοζύμης από ασπράδι αυγού της όρνιθας.

Πιο συγκεκριμένα, στον πρώτο άξονα της εργασίας, μελετώνται σύμπλοκα της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία των οργανικών προσδετών ρεσορσινόλης και 4-χλωρορεσορσινόλης συναρτήσει του pH, καθώς και της συγκέντρωσης του προσδέτη στην περίπτωση της ρεσορσινόλης. Με σκοπό την δημιουργία πολυκρυσταλλικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλώσεις με την μέθοδο batch. Για την μελέτη αξιοποιήθηκε εκτενώς η τεχνική περίθλασης ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικά δείγματα (*X-Ray Powder Diffraction – XRPD*). Πειράματα περίθλασης που διεξάχθηκαν στον πειραματικό σταθμό ID22 της Ευρωπαϊκής Εγκατάστασης Ακτινοβολίας Σύγχροτρον (*European Synchrotron Radiation Facility – ESRF*), επέτρεψαν την συλλογή δεδομένων περίθλασης υψηλής ποιότητας. Μέσω ανάλυσης των δεδομένων XRPD ταυτοποιήθηκαν κρυσταλλικά πολύμορφα μονοκλινούς και ορθορομβικής συμμετρίας [$P2_{1(\alpha)}$, $C222_1$, $C2$, $P2_{1(\beta)}$] για τα σύμπλοκα ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης, ενώ για τα σύμπλοκα ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης ταυτοποιήθηκαν κρυσταλλικά πολύμορφα μονοκλινούς συμμετρίας [$P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\delta)}$, $C2$, $P2_{1(\beta)}$]. Εκτός των προαναφερθέντων, σημαντικό εύρημα ήταν η ταυτοποίηση του νέου μονοκλινούς πολυμορφισμού $P2_{1(\gamma)}$ στα σύμπλοκα με ρεσορσινόλη σε χαμηλά pH. Για την επαλήθευση του συγκεκριμένου ευρήματος πραγματοποιήθηκαν συγκρυσταλλώσεις ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης με την μέθοδο κρυστάλλωσης διάχυσης ατμών. Τα πειράματα περίθλασης διεξάχθηκαν στους πειραματικούς σταθμούς P13 του Γερμανικού Σύγχροτρον (*PETRA III - Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY*) και ID23-2 του ESRF με την αξιοποίηση της τεχνικής περίθλασης ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο (*Single Crystal X-Ray Diffraction – SCXRD*). Η πρωταρχική επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων SCXRD επιβεβαίωσε την ύπαρξη του συγκεκριμένου κρυσταλλικού πολυμόρφου με πλεγματικές σταθερές $a=46.151 \text{ \AA}$, $b=68.905 \text{ \AA}$, $c=81.861 \text{ \AA}$ και $\beta=104.704^\circ$ σε εύρος ευκρίνειας $79.18 - 2.5 \text{ \AA}$. Τέλος, παρουσιάζεται και η κοινή, ταυτόχρονη ανάλυση κατά Pawley δεδομένων XRPD, που προήλθαν από κρυστάλλους ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\beta)}$, η οποία αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο με σκοπό την επίλυση της συγκεκριμένης δομής μέσω δεδομένων XRPD.

Στο δεύτερο σκέλος της εργασίας, οι *in situ* XRPD κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο κρυσταλλικό σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\beta)}$ και σε κρυστάλλους λυσοζύμης τετραγωνικής συμμετρίας $P4_32_12$. Τα πειράματα περίθλασης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro (*Malvern PANalytical*), όπου και βρίσκεται εγκατεστημένος ο θάλαμος ελέγχου σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας MHC-trans (*Anton Paar*). Για την περίπτωση της ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις υπό συνθήκες ελεγχόμενων μεταβολών της σχετικής υγρασίας (*relative Humidity – rH*) μέσω διαδοχικών αφυδατώσεων και επανενυδατώσεων. Η ανάλυση των δεδομένων XRPD έδειξε αντοχή του συγκεκριμένου συμπλόκου μέχρι και rH 50% με σαφή υποβάθμιση της κρυσταλλικότητάς του, η οποία όμως επανέρχεται εν μέρει με την επανενυδάτωσή του. Υπάρχουν αλλαγές στις πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανισοτροπική μεταβολή των πλεγματικών σταθερών. Για την περίπτωση της τετραγωνικής λυσοζύμης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις υπό συνθήκες ελεγχόμενων μεταβολών της rH μέσω διαδοχικών αυξομειώσεων σε εύρος 95%-73%. Το πολύμορφο έδειξε μεγάλη ανθεκτικότητα, καθώς δεν παρατηρήθηκε αισθητή υποβάθμιση της κρυσταλλικότητάς του, και οι πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας μεταβάλλονται ανισοτροπικά. Και στις δύο περιπτώσεις της συγκεκριμένης μελέτης δεν παρατηρήθηκε μετάβαση κρυσταλλικής φάσης.

Η σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων συμβάλλει ουσιαστικά στην έρευνα του σχεδιασμού φαρμάκων βάσει δομής (*Structure-Based Drug Design - SBDD*). Η λεπτομερής χαρτογράφηση των διάφορων πολυμόρφων και της σταθερότητάς τους υπό μεταβαλλόμενες φυσικοχημικές και περιβαλλοντικές συνθήκες παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για την βελτιστοποίηση των συνθηκών αποθήκευσης και μεταφοράς φαρμακευτικών σκευασμάτων. Επιπλέον, η κατανόηση της δομικής συμπεριφοράς των πρωτεϊνικών μορίων σε σχέση με προσδέτες και παράγοντες όπως η υγρασία και το pH, μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων αναλόγων με βελτιωμένο προφίλ φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής. Η ενσωμάτωση τέτοιων δεδομένων στην αξιολόγηση παραμέτρων, όπως η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και η τοξικότητα (*ADME-Tox*) είναι καθοριστική για την επίτευξη φαρμακευτικών προϊόντων με αυξημένη αποτελεσματικότητα, σταθερότητα και ασφάλεια, υπογραμμίζοντας έτσι τον ρόλο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X ως εργαλείο αιχμής στην σύγχρονη Δομική Βιολογία και Βιοχημεία.

Abstract

In the present thesis, a crystallographic study is conducted on the effect of various physicochemical parameters on the molecular and crystalline polymorphism of human insulin in the presence of organic ligands. In addition, *in situ* crystallographic studies assessed the effect of relative humidity on crystals of human insulin and hen egg-white lysozyme.

More specifically, in the first part of the study, complexes of human insulin in the presence of the organic ligands resorcinol and 4-chlororesorcinol are studied as a function of pH, as well as ligand concentration in the case of resorcinol. Batch crystallization was performed in order to generate polycrystalline samples. The technique of X-Ray Powder Diffraction (XRPD) was extensively employed and diffraction experiments carried out at beamline ID22 of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) allowed the collection of high-quality diffraction data. Through analysis of the XRPD data, crystalline polymorphs of monoclinic and orthorhombic symmetry [$P2_{1(\alpha)}$, $C222_1$, $C2$, $P2_{1(\beta)}$] were identified for the human insulin & resorcinol complexes, while for the human insulin & 4-chlororesorcinol crystalline polymorphs of monoclinic symmetry [$P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\delta)}$, $C2$, $P2_{1(\beta)}$] were identified. Notably, a novel crystalline polymorph of monoclinic symmetry, $P2_{1(\gamma)}$, was identified in the case of insulin & resorcinol complexes at low pH values. To verify this finding, co-crystallizations of human insulin and resorcinol were performed using the vapor diffusion method. Diffraction experiments were conducted at beamline P13 of the German Synchrotron (DESY) and ID23-2 of the ESRF, utilizing the Single Crystal X-Ray Diffraction (SCXRD) technique. Preliminary processing and analysis of the SCXRD data confirmed the existence of this crystalline polymorph, with unit-cell parameters $a=46.151 \text{ \AA}$, $b=68.905 \text{ \AA}$, $c=81.861 \text{ \AA}$ and $\beta=104.704^\circ$ in a resolution range of $79.18 - 2.5 \text{ \AA}$. Finally, a combined Pawley refinement analysis of XRPD data obtained from insulin and resorcinol crystals of monoclinic symmetry $P2_{1(\beta)}$ is presented, constituting the initial stage towards the structure solution of the aforementioned polymorph via XRPD data.

In the second part of the work, *in situ* XRPD crystallographic studies were performed on the crystalline complex of human insulin and 4-chlororesorcinol of monoclinic symmetry $P2_{1(\beta)}$, as well as on tetragonal lysozyme crystals of symmetry $P4_32_12$. Diffraction experiments were carried out on the laboratory diffractometer X'Pert Pro (Malvern PANalytical) that is equipped with the MHC-trans (Anton Paar) relative humidity and temperature control chamber. For the human insulin and 4-chlororesorcinol complex, measurements were performed under controlled relative humidity (rH) variations through successive dehydration and rehydration cycles. Analysis of the XRPD data demonstrated the stability of this complex up to rH 50%, with a marked degradation of crystallinity that partially recovered upon rehydration. Changes in the unit-cell parameters were observed, with particular interest in the anisotropic variation of the lattice constants. For the tetragonal lysozyme, measurements under controlled non-gradual rH variations in the range of 95%-73% revealed high resilience, with no significant degradation of crystallinity. Anisotropic changes of the unit-cell parameters were observed too. In both cases of this study axis, no crystal phase transitions were detected.

The significance of these results contribute substantially to research in Structure-Based Drug Design (SBDD). The detailed mapping of various polymorphs and their stability under varying physicochemical and environmental conditions provides critical information for optimizing the storage and transport conditions of pharmaceutical formulations. Furthermore, understanding the structural behavior of protein molecules in relation to ligands and factors such as humidity or pH can be exploited for the development of new analogues with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. Considering such data for the evaluation of parameters such as absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADME-Tox) is crucial for the development of pharmaceutical products with enhanced efficacy, stability, and safety, thus underscoring the role of X-ray crystallography as a cutting-edge tool in modern Structural Biology and Biochemistry.

Λέξεις κλειδιά: Δομική Βιολογία & Βιοχημεία, Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών, Περίθλαση ακτίνων-X, Πολυκρυσταλλικά δείγματα, Ανθρώπινη ινσουλίνη, Λυσοζύμη, Ρεσορσινόλη, 4-Χλωρορεσορσινόλη, Πολυμορφισμός, Σχετική υγρασία, Σχεδιασμός φαρμάκων.

Key words: Structural Biology & Biochemistry, Protein Crystallography, X-ray Powder Diffraction, Human insulin, Lysozyme, Resorcinol, 4-Chlororesorcinol, Polymorphism, Relative humidity, Drug design.

1. Εισαγωγή στην Δομική Βιολογία & Βιοχημεία – Το κρυσταλλογραφικό πείραμα

Η **Δομική Βιολογία και Βιοχημεία** (*Structural Biology & Biochemistry*) αποτελεί έναν διεπιστημονικό κλάδο, ο οποίος συνδυάζει αρχές και τεχνικές από την Βιολογία, την Χημεία και την Φυσική, με σκοπό την κατανόηση της τρισδιάστατης οργάνωσης των βιολογικών μακρομορίων. Η γνώση αυτή είναι θεμελιώδης, καθώς στην επιστήμη της Βιολογίας ισχύει η θέση ότι η δομή ενός μακρομορίου καθορίζει και τη λειτουργία του. Οι πρωτεΐνες, ως κύριοι εκτελεστές βιολογικών διεργασιών, αποτελούν κεντρικό αντικείμενο μελέτης. Η λεπτομερής ανάλυση της διάταξης ενός βιομορίου στον χώρο σε ατομικό επίπεδο παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για την ερμηνεία βιολογικών μηχανισμών και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η **Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X** (*X-ray Crystallography*) αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές και ακριβείς μεθόδους για τον προσδιορισμό της δομής βιολογικών μακρομορίων, συμβάλλοντας καθοριστικά στην σύγχρονη Δομική Βιολογία και Βιοχημεία. Μέσω της περίθλασης ακτίνων-X από κρυστάλλους, καθίσταται δυνατή η απεικόνιση όλων των ατόμων ενός βιομορίου, επιτρέποντας την αποσαφήνιση της τρισδιάστατης δομής του.

Το κρυσταλλογραφικό πείραμα χαρακτηρίζεται από πολλά και απαιτητικά βήματα ώστε να έρθει με επιτυχία εις πέρας. Το υπό μελέτη βιομόριο υπόκειται σε διαδικασία κρυστάλλωσης, κατά την οποία τα μόρια οργανώνονται αυστηρά σε περιοδική διάταξη, με σκοπό τον σχηματισμό κρυστάλλων. Η επίτευξη δημιουργίας κρυστάλλων υψηλής ποιότητας απαιτεί αξιολόγηση και βελτιστοποίηση των παραμέτρων της κρυστάλλωσης, όπως είναι η συγκέντρωση του βιομορίου, η σύσταση του διαλύματος κρυστάλλωσης και η θερμοκρασία. Οι κρύσταλλοι που προκύπτουν εκτίθενται σε μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X, η οποία περιθλάται λόγω της περιοδικής οργάνωσης των μορίων και συνεπώς των ατόμων που τα απαρτίζουν. Από την διαδικασία αυτήν προκύπτει σήμα περίθλασης, το οποίο συλλέγεται με ανιχνευτές υψηλής ανάλυσης. Η μαθηματική επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης μέσω μετασχηματισμών Fourier, οδηγεί στην δημιουργία χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, από τον οποίο κατασκευάζεται και βελτιστοποιείται το δομικό μοντέλο του βιομορίου, παρέχοντας έτσι μια λεπτομερή εικόνα της τρισδιάστατης δομής του.

Η ακρίβεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έχει οδηγήσει στην συστηματική κατάθεση των τρισδιάστατων δομών σε διεθνείς βάσεις, όπως είναι η Protein Data Bank, γεγονός το οποίο έχει ενισχύσει την ανοιχτή διάχυση της γνώσης και υποστηρίξει την περαιτέρω έρευνα. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, συνδυασμένη με συμπληρωματικές τεχνικές και σύγχρονες βιοπληροφορικές προσεγγίσεις, συνεχίζει να αποτελεί βασικό πυλώνα της Δομικής Βιολογίας, με άμεσες εφαρμογές στην θεμελιώδη έρευνα και την ανάπτυξη φαρμάκων, καθώς λειτουργεί ως θεμέλιο για τον σχεδιασμό φαρμάκων βάσει δομής (*Structure-Based Drug Design, SBDD*) και την ερμηνεία βιολογικών μηχανισμών.

1.1. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Η **κρυστάλλωση** (*crystallization*) πρωτεϊνών αποτελεί το πιο κρίσιμο στάδιο στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής τους μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, καθώς χωρίς κατάλληλους κρυστάλλους δεν είναι δυνατή η συλλογή δεδομένων (McPherson, 1999; Rupp, 2010). Παρά την σημασία της, δεν υπάρχει κάποια καθολική θεωρία που να προβλέπει με ακρίβεια τις συνθήκες υπό τις οποίες μια πρωτεΐνη θα σχηματίσει κρυστάλλους, λόγω της πολυπλοκότητας των ασθενών αλληλεπιδράσεων που διέπουν την αυτοοργάνωση των μορίων (McPherson, 2004).

Πρόκειται για μια φυσικοχημική διαδικασία κατά την οποία τα μόρια της πρωτεΐνης μεταβαίνουν από μια κατάσταση όπου κινούνται ελεύθερα στο διάλυμα σε μια περιοδική, τρισδιάστατη διάταξη, σχηματίζοντας τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο (McPherson, 1991). Οι δομές αυτές συγκρατούνται από δεσμούς υδρογόνου και άλλες ασθενείς μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες προσδίδουν σταθερότητα στην στερεή φάση (Bergfors, 2021).

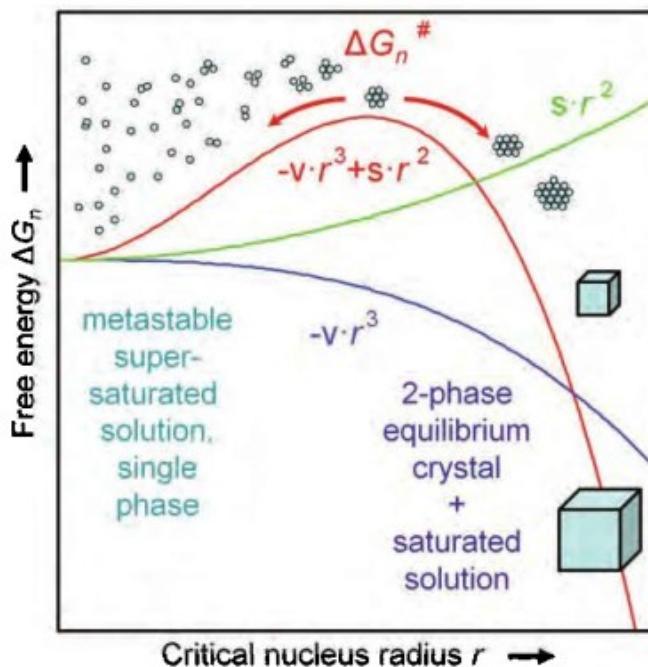
Για να ξεκινήσει η διαδικασία, το διάλυμα πρέπει να φτάσει σε **υπερκορεσμό** (*supersaturation*), δηλαδή η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να υπερβεί την κρίσιμη διαλυτότητά της S_0 (McPherson, 2004; Rupp, 2010). Στο σημείο αυτό, η πρωτεΐνη παύει να διαλύεται πλήρως και αρχίζει να απομακρύνεται από το διάλυμα σχηματίζοντας στερεή φάση. Η επίτευξη υπερκορεσμού γίνεται με προσθήκη **παραγόντων καθίζησης** (*precipitants*) που μειώνουν την διαλυτότητα, όπως είναι τα άλατα και τα πολυμερή ή με τροποποίηση παραμέτρων όπως το pH και η θερμοκρασία (McPherson, 2009; Saridakis & Chayen, 2009). Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια: την **πυρήνωση** (*nucleation*) και την **ανάπτυξη κρυστάλλων** (*crystal growth*) (Rupp, 2010). Στην πυρήνωση, σχηματίζονται μικρά συσσωματώματα πρωτεϊνών, επονομαζόμενα **πυρήνες** (*nuclei*), τα όποια πρόκεινται για πρόδρομες κρυσταλλικές διαμορφώσεις που λειτουργούν ως βάσεις για την προσθήκη περαιτέρω μορίων πρωτεΐνης. Η βέλτιστη ισορροπία μεταξύ των δύο σταδίων είναι καθοριστική για την παραγωγή καλώς διατεταγμένων κρυστάλλων.

Η επιλογή συνθηκών κρυστάλλωσης είναι κατά κύριο λόγο εμπειρική. Η συνήθης προσέγγιση ξεκινά με **διερεύνηση** (*screening*) ποικίλων συνδυασμών παραγόντων καθίζησης και συνθηκών, ακολουθούμενη από **βελτιστοποίηση** (*optimization*) για βελτίωση του μεγέθους και της ποιότητας των κρυστάλλων (Chayen et al., 1996). Οι παραλλαγές μπορεί να περιλαμβάνουν αλλαγές στην θερμοκρασία, στον ρυθμό εξάτμισης του διαλύτη ή την χρήση προσθέτων ουσιών.

Η ποιότητα των κρυστάλλων επηρεάζει άμεσα την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης. Κρύσταλλοι με υψηλή εσωτερική τάξη δίνουν καθαρά και ευκρινή πρότυπα περίθλασης, ενώ κρύσταλλοι με ατέλειες ή εσωτερική αταξία οδηγούν σε περιορισμένη ανάλυση και αυξημένο θόρυβο στα δεδομένα (McPherson, 2004; Rupp, 2010). Συνεπώς, η κρυστάλλωση δεν είναι απλώς ένα προπαρασκευαστικό στάδιο, αλλά ένα κρίσιμο σημείο του κρυσταλλογραφικού πειράματος που απαιτεί συνδυασμό θεωρητικής κατανόησης και πειραματικής δεξιότητας.

1.1.1. Βιοχημικές & Φυσικοχημικές αρχές κρυστάλλωσης

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών ερμηνεύεται μέσα από βασικές βιοχημικές και φυσικοχημικές αρχές που διέπουν τις μεταπτώσεις φάσεων. Σε ένα διάλυμα, η **διαλυτότητα** (*solubility, S_0*) μιας ουσίας ορίζεται ως η συγκέντρωσή της στην κατάσταση κορεσμού, όταν δηλαδή η διαλυτή και η στερεή φάση συνυπάρχουν σε ισορροπία. Σε αυτήν την κατάσταση, ο ρυθμός με τον οποίο τα μόρια εισέρχονται στη στερεή φάση είναι ίσος με τον ρυθμό με τον οποίο επιστρέφουν στη διαλυτή, και έτσι δεν υπάρχει καθαρή αύξηση του στερεού (McPherson, 2004). Επομένως, η ανάπτυξη κρυστάλλων δεν μπορεί να συμβεί σε συνθήκες απλού κορεσμού. Για να ξεκινήσει η κρυστάλλωση, το διάλυμα πρέπει να φτάσει σε **υπερκορεσμό** (*supersaturation*), κατάσταση στην οποία η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ξεπερνά το όριο της διαλυτότητας (**Εικόνα 1-1**). Η υπέρβαση αυτή ωθεί το σύστημα να επιστρέψει προς ισορροπία μέσω της απομάκρυνσης μορίων πρωτεΐνης από τα μόρια του διαλύτη, οδηγώντας στη δημιουργία στερεής φάσης. Η μετάβαση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, όπως μείωση της θερμοκρασίας, εξάτμιση του διαλύτη ή προσθήκη αντιδραστηρίων που μειώνουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης (McPherson, 1999).



Εικόνα 1-1. Διάγραμμα ενέργειας πυρήνωσης (Πηγή: Rupp, 2010).

Από θερμοδυναμική άποψη, η κρυστάλλωση υπακούει στην σχέση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Για να είναι αυθόρμητη η διαδικασία, η μεταβολή της ΔG πρέπει να είναι αρνητική. Αυτό συμβαίνει όταν η αύξηση της εντροπίας του συστήματος, δηλαδή της αταξίας, συνοδεύεται από την δημιουργία αλληλεπιδράσεων που μειώνουν την συνολική ενέργεια. Στην περίπτωση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων, οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κυρίως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις van der Waals, οι οποίες παρότι ασθενείς σε σύγκριση με ιοντικούς ή ομοιοπολικούς δεσμούς, επαρκούν για να σταθεροποιήσουν την τρισδιάστατη περιοδική διάταξη (McPherson, 2009; Nishinaga, 2016).

Επίσης, η κρυστάλλωση αποτελεί παράδειγμα μετάπτωσης φάσης. Οι πρωτεΐνες, που σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται σε διάλυμα, μεταβαίνουν από την υγρή φάση στη στερεή, οργανώνοντας τα μόριά τους σε περιοδικό πλέγμα. Η αλλαγή αυτή εξαρτάται από εξωτερικές παραμέτρους όπως η θερμοκρασία και η πίεση, και αποτυπώνεται σε διαγράμματα φάσης, τα οποία περιγράφουν σε ποιες συνθήκες είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή η δημιουργία κρυστάλλων (McPherson, 1999).

Σε αντίθεση με ανόργανους κρυστάλλους, οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευθραυστότητα και χαμηλότερη μηχανική αντοχή, λόγω της φύσης των δεσμών από τους οποίους συγκρατούνται. Αυτό τους καθιστά πιο επιρρεπείς σε φθορές και μερικές φορές περιορίζει την ποιότητα των δεδομένων που μπορούν να αποδώσουν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων-X.

1.1.2. Πυρήνωση & Ανάπτυξη κρυστάλλων – Διαγράμματα φάσης

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών αποτελείται, όπως προαναφέρθηκε, από δύο βασικά στάδια, την πυρήνωση και την ανάπτυξη κρυστάλλων. Το πρώτο στάδιο, αυτό της πυρήνωσης, είναι ιδιαίτερα κρίσιμο καθώς σηματοδοτεί την στιγμή όπου τα μόρια αφήνουν την άτακτη κατανομή τους και ξεκινούν να διατάσσονται σε πιο οργανωμένες δομές. Με άλλα λόγια, πρόκειται για την μετάβαση από μία κατάσταση αταξίας σε μια πρωταρχική μορφή τάξης, όπου σχηματίζονται μικρά συσσωματώματα μορίων που ονομάζονται πυρήνες (McPherson, 2004). Οι πυρήνες αυτοί δεν είναι εξ αρχής πλήρως σταθερές

δομές, δηλαδή αποτελούν ασταθή συσσωματώματα με περιορισμένη οργάνωση, τα οποία μπορούν εύκολα να διαταραχθούν. Η σταθεροποίησή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον βαθμό υπερκορεσμού του διαλύματος, καθώς όσο υψηλότερος είναι ο υπερκορεσμός τόσο πιο πιθανό είναι οι πυρήνες να διατηρηθούν και να εξελιχθούν σε κρυστάλλους.

Το στάδιο της πυρήνωσης είναι υψίστης σημασίας, διότι καθορίζει και την πορεία που θα ακολουθήσει το σύστημα στη συνέχεια. Αν η πυρήνωση πραγματοποιηθεί με ελεγχόμενο τρόπο και υπό τις κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία λίγων αλλά μεγάλων και καλοσχηματισμένων κρυστάλλων. Αντιθέτως, όταν οι συνθήκες ευνοούν τη δημιουργία μεγάλου αριθμού πυρήνων, το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή πολλών μικρών κρυστάλλων ή ακόμα και άμορφου ιζήματος (McPherson, 1999; Chayen, 2004). Επομένως, η κατανόηση και ο έλεγχος αυτού του σταδίου είναι το κλειδί για την επιτυχή κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

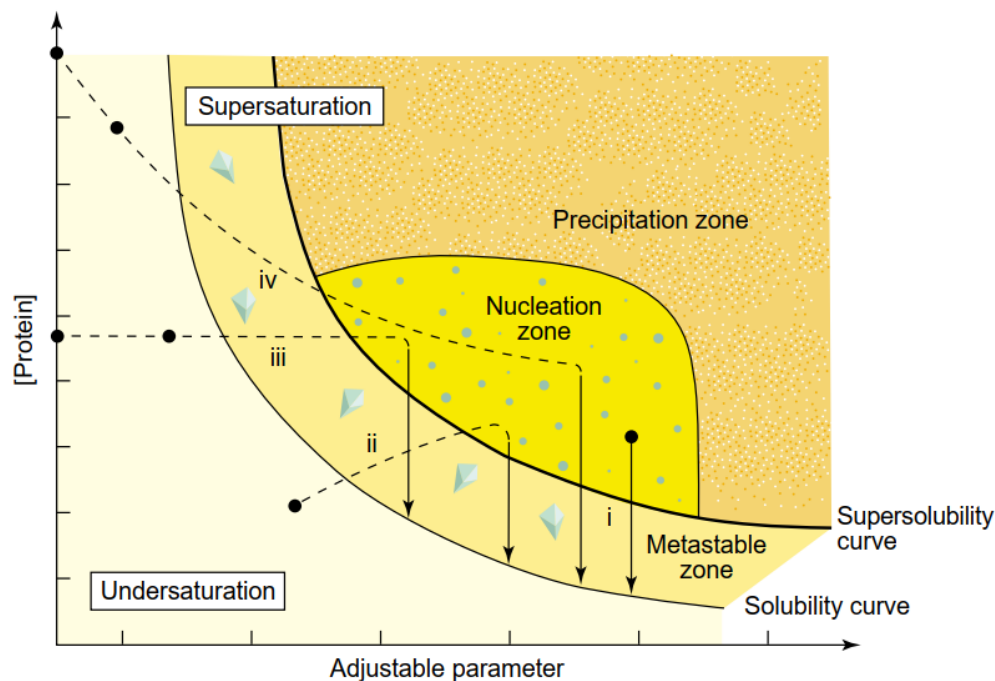
Από την στιγμή που σχηματίζονται οι πυρήνες, ακολουθεί το στάδιο της ανάπτυξης των κρυστάλλων. Σε αυτό το στάδιο, τα ελεύθερα μόρια της πρωτεΐνης που παραμένουν στο διάλυμα τείνουν να προσκολληθούν στους ήδη σχηματισμένους πυρήνες, αυξάνοντας το μέγεθός τους και σταδιακά οδηγώντας στον σχηματισμό ολοκληρωμένων κρυστάλλων.

Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει πιο κατανοητή αν ερμηνευτεί μέσα από το **διάγραμμα φάσης** (*phase diagram*). Το διάγραμμα φάσης αποτελεί ένα εργαλείο που απεικονίζει τις διαφορετικές καταστάσεις ισορροπίας που μπορεί να λάβει το σύστημα και είναι συνάρτηση δύο βασικών μεταβλητών, της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (κατακόρυφος άξονας) και ενός παράγοντα που επηρεάζει την διαλυτότητά της, όπως η συγκέντρωση κάποιου παράγοντα καθίζησης ή το pH (οριζόντιος άξονας) (Chayen & Saridakis, 2008). Το διάγραμμα φάσης περιλαμβάνει διάφορες ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιπροσωπεύει διαφορετική κατάσταση για το διάλυμα (**Εικόνα 1-2**).

Η πρώτη είναι η **υπόκορη ζώνη** (*undersaturated zone*). Σε αυτήν την περιοχή η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι χαμηλή, ενώ η διαλυτότητα υψηλή. Επομένως, στην υπόκορη ζώνη δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση, αφού όποια μόρια λάβουν τυχαία κάποιο είδος στερεής διάταξης θα διαλυθούν ξανά αυθόρμητα. Όταν οι συνθήκες μεταβληθούν και η συγκέντρωση ξεπεράσει το όριο διαλυτότητας, το σύστημα περνά στην περιοχή του υπερκορεσμού.

Η περιοχή υπερκορεσμού υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες, την ζώνη πυρήνωσης, την μετασταθή ζώνη και την ζώνη καθίζησης. Στην **ζώνη πυρήνωσης** (*nucleation zone*), η συγκέντρωση είναι τόσο υψηλή ώστε αυξάνεται η πιθανότητα αυθόρμητου σχηματισμού πυρήνων. Αντίθετα, στην **μετασταθή ζώνη** (*metastable zone*) δεν δημιουργούνται νέοι πυρήνες, αλλά οι ήδη υπάρχοντες μπορούν να μεγαλώσουν, γεγονός που ευνοεί και προάγει την ανάπτυξη των κρυστάλλων. Από την άλλη πλευρά, η **ζώνη καθίζησης** (*precipitation zone*) αντιστοιχεί σε πολύ υψηλά επίπεδα υπερκορεσμού, όπου το σύστημα χάνει την ικανότητα οργάνωσης και η πρωτεΐνη καθιζάνει άμορφα.

Κεντρικό ρόλο στα διαγράμματα φάσης παίζουν δύο καμπύλες, η **καμπύλη διαλυτότητας** (*solubility curve*) και η **καμπύλη υπερδιαλυτότητας** (*supersolubility curve*). Η καμπύλη διαλυτότητας αντιπροσωπεύει το όριο μεταξύ υπόκορης και υπέρκορης περιοχής, δηλαδή κάτω από αυτήν το διάλυμα είναι υπόκορο και δεν σχηματίζει κρυστάλλους, ενώ πάνω από αυτήν εισέρχεται στην περιοχή υπερκορεσμού. Η καμπύλη υπερδιαλυτότητας χωρίζει την ζώνη πυρήνωσης από την μετασταθή ζώνη, δηλαδή οριοθετεί την περιοχή στην οποία μπορούν να σχηματιστούν νέοι πυρήνες. Παρότι η θέση της καμπύλης αυτής δεν είναι απόλυτα καθορισμένη και εξαρτάται από την πιθανότητα αυθόρμητης πυρήνωσης, παρέχει μια χρήσιμη προσέγγιση για την κατανόηση της συμπεριφοράς του συστήματος (Chayen, 2004).



Εικόνα 1-2. Διάγραμμα φάσης. Στην εικόνα φαίνονται οι διαφορετικές διαδρομές που ακολουθεί το σύστημα, ανάλογα με την μέθοδο κρυστάλλωσης που χρησιμοποιείται: i) batch, ii) διάχυση ατμών, iii) διαπίδυση, iv) διάχυση ελεύθερης διεπαφής (Πηγή: Chayen, 2004).

Η στρατηγική που θα ακολουθήσει ο ερευνητής εξαρτάται από τον στόχο του πειράματος. Για την ανάπτυξη λίγων και μεγάλων κρυστάλλων, οι συνθήκες πρέπει να οδηγήσουν στο κατώτερο όριο της ζώνης πυρήνωσης. Έτσι, δημιουργούνται λίγοι μόνο πυρήνες, οι οποίοι στην συνέχεια αναπτύσσονται με όλα τα διαθέσιμα μόρια από το διάλυμα, με αποτέλεσμα την παραγωγή μονοκρυστάλλων υψηλής ποιότητας. Αντιθέτως, όταν στόχος είναι η δημιουργία πολλών μικρών κρυστάλλων ή πολυκρυσταλλικού ιζήματος, το σύστημα πρέπει να οδηγηθεί σε υψηλότερα επίπεδα υπερκορεσμού, στο ανώτερο όριο της ζώνης πυρήνωσης. Εκεί δημιουργούνται πολλοί πυρήνες, οι οποίοι στην συνέχεια αναπτύσσονται σε πολλούς μικρούς κρυστάλλους. Ωστόσο, πρέπει να αποφεύγεται η υπερβολική αύξηση του υπερκορεσμού, διότι τότε το σύστημα εισέρχεται στην ζώνη καθίζησης, όπου σχηματίζεται άμορφο ίζημα που δεν είναι αξιοποιήσιμο (McPherson, 1999).

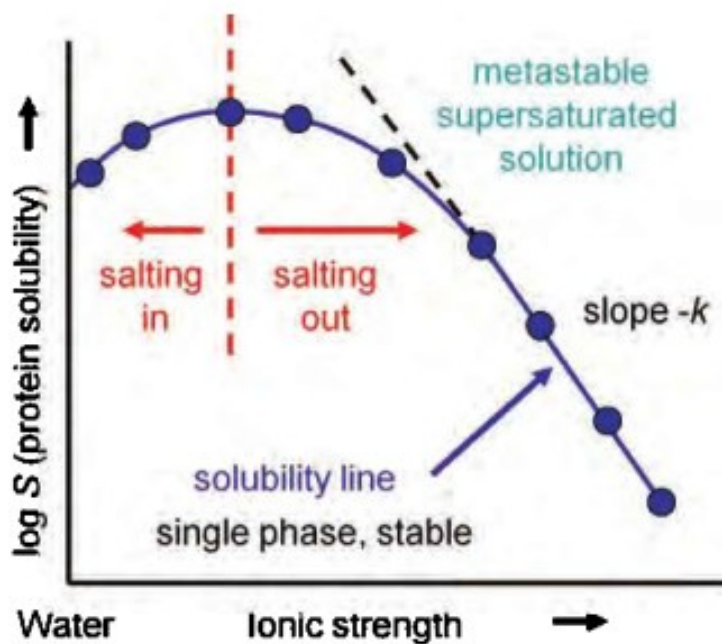
Συνολικά, τα διαγράμματα φάσης αποτελούν το βασικό εργαλείο για την κατανόηση της συμπεριφοράς των πρωτεϊνών κατά την κρυστάλλωση. Παρέχουν μια ποσοτική απεικόνιση των περιοχών στις οποίες το διάλυμα μπορεί να παραμείνει σταθερό, να σχηματίσει πυρήνες, να αναπτύξει κρυστάλλους ή να οδηγηθεί σε άμορφη καθίζηση. Η σωστή ερμηνεία τους δίνει στον ερευνητή την δυνατότητα να σχεδιάσει στρατηγικές που θα οδηγήσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα, είτε αυτό είναι η παραγωγή λίγων μεγάλων μονοκρυστάλλων είτε η δημιουργία πολλών μικρών κρυστάλλων.

1.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία υψηλής πολυπλοκότητας, η οποία επηρεάζεται από πλήθος φυσικοχημικών παραγόντων. Ο καθοριστικός ρόλος αυτών των παραγόντων έγκειται κυρίως στην διαμόρφωση των συνθηκών διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα, καθώς και στην δυνατότητα δημιουργίας υπερκορεσμένου διαλύματος (McPherson, 2004). Επειδή κάθε περίπτωση κρυστάλλωσης διαφέρει, δεν είναι δυνατόν η διαδικασία να προσεγγιστεί με έναν ενιαίο τρόπο, αλλά απαιτείται συστηματική διερεύνηση των επιμέρους παραμέτρων.

Ένας από τους πιο κρίσιμους παράγοντες είναι η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Η παρουσία προσμίξεων, όπως άλλες πρωτεΐνες, προϊόντα μετουσίωσης, θραύσματα πρωτεϊνών ή ακόμη και σωματίδια σκόνης, μπορούν να εμποδίσουν την πυρήνωση και να οδηγήσουν σε σχηματισμό άμορφων συσσωματωμάτων. Γι' αυτόν τον λόγο, η επιθυμητή καθαρότητα του δείγματος πρέπει να ξεπερνά το 99%, ώστε να διασφαλίζεται ότι οι κρύσταλλοι θα αποτελούνται αποκλειστικά από το υπό μελέτη μόριο.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αποτελεί παράμετρο άμεσα συνδεδεμένη με τον υπερκορεσμό. Η αύξηση της συγκέντρωσης μειώνει την διαλυτότητα και μπορεί να προωθήσει την δημιουργία πυρήνων. Ωστόσο, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις η διαδικασία δεν οδηγεί πάντα σε σχηματισμό κρυστάλλων, καθώς είναι πιθανή η εμφάνιση άμορφου ιζήματος (Chayen & Saridakis, 2008). Η ρύθμιση της συγκέντρωσης, επομένως, πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ισορροπία ανάμεσα στην τάση για υπερκορεσμό και στην αποφυγή ανεπιθύμητων συσσωματωμάτων.



Εικόνα 1-3. Διάγραμμα διαλυτότητας πρωτεΐνης σε ιοντικό διαλύτη: αύξηση διαλυτότητας με μικρές συγκεντρώσεις άλατος (salting-in) και μείωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (salting-out) (Πηγή: Rupp, 2010).

Το pH του διαλύματος είναι επίσης κρίσιμος παράγοντας, καθώς καθορίζει την ιονική κατάσταση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων και κατ' επέκταση το φορτίο των πρωτεϊνικών μορίων. Στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), όπου το συνολικό φορτίο ισούται με μηδέν, η διαλυτότητα τείνει να είναι ελάχιστη και το περιβάλλον ευνοεί την κρυστάλλωση. Εντούτοις, πολλές πρωτεΐνες παρουσιάζουν ικανότητα κρυστάλλωσης σε τιμές pH κοντά στο pI ή σε ουδέτερο περιβάλλον (~7,5), ενώ το pH επηρεάζει επίσης τον κρυσταλλικό πολυμορφισμό (Rupp, 2010).

Η χρήση παραγόντων καθίζησης είναι θεμελιώδης για την μείωση της διαλυτότητας. Οι παράγοντες αυτοί ταξινομούνται σε κατηγορίες όπως άλατα, πολυμερή, οργανικοί διαλύτες και μικρά οργανικά μόρια (McPherson, 2017). Τα άλατα επιδρούν μέσω δύο διαφορετικών φαινομένων. Στο salting-in, τα ιόντα συνδέονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, αυξάνοντας την υδρόφιλη φύση της και κατ' επέκταση τη διαλυτότητά της. Αντίθετα, στο salting-out, τα ιόντα ανταγωνίζονται τα πρωτεϊνικά μόρια για τα μόρια του νερού, προκαλώντας αφυδάτωση της πρωτεΐνης και μείωση της διαλυτότητας, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η πυρήνωση (Hoffmeister, 1888) (**Εικόνα 1-3**).

Τα πολυμερή, και ιδιαίτερα η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), αποτελούν τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους παράγοντες καθίζησης. Το PEG δημιουργεί φαινόμενα αποκλεισμού όγκου (*excluded volume*), δεσμεύοντας μόρια διαλύτη και αναγκάζοντας τα πρωτεϊνικά μόρια να έρθουν σε εγγύτητα, γεγονός που μειώνει την διαλυτότητά τους και διευκολύνει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων που οδηγούν σε πυρήνες. Η ιδιαιτερότητα του PEG είναι ότι κυκλοφορεί σε διαφορετικά μοριακά βάρη, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικά τον ρυθμό και την ποιότητα της κρυστάλλωσης.

Οι οργανικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη και η ακετόνη, μειώνουν την διηλεκτρική σταθερά του μέσου και αφαιρούν μόρια νερού, ενισχύοντας τις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν μετουσίωση, γι' αυτό χρησιμοποιούνται με προσοχή και σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες. Σημαντική συμβολή έχουν και οι προσδέτες, οργανικοί ή ανόργανοι, που συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις των πρωτεϊνών και επηρεάζουν την τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή τους.

Η θερμοκρασία είναι παράγοντας που επηρεάζει άμεσα την διαλυτότητα και τον ρυθμό κορεσμού. Σε γενικές γραμμές, η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την διαλυτότητα, περιορίζοντας την κρυστάλλωση. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι 4°C ή θερμοκρασία δωματίου (18–22°C), ώστε να αποφεύγεται η μετουσίωση (Rupp, 2010). Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της θερμοκρασίας μπορεί να διαφέρει από σύστημα σε σύστημα.

Η υγρασία έχει επίσης σημαντικό ρόλο. Η σχετική υγρασία που επικρατεί μπορεί να καθορίσει όχι μόνο τον σχηματισμό αλλά και την σταθερότητα των κρυστάλλων, ειδικά αυτών που βρίσκονται σε ένυδρη μορφή. Μεταβολές στην σχετική υγρασία μπορούν να οδηγήσουν σε δομικές αλλαγές μέσω επιρροής στους δεσμούς υδρογόνου, κάτι που αξιοποιείται και πειραματικά για τον έλεγχο της σταθερότητας και της ανθεκτικότητας.

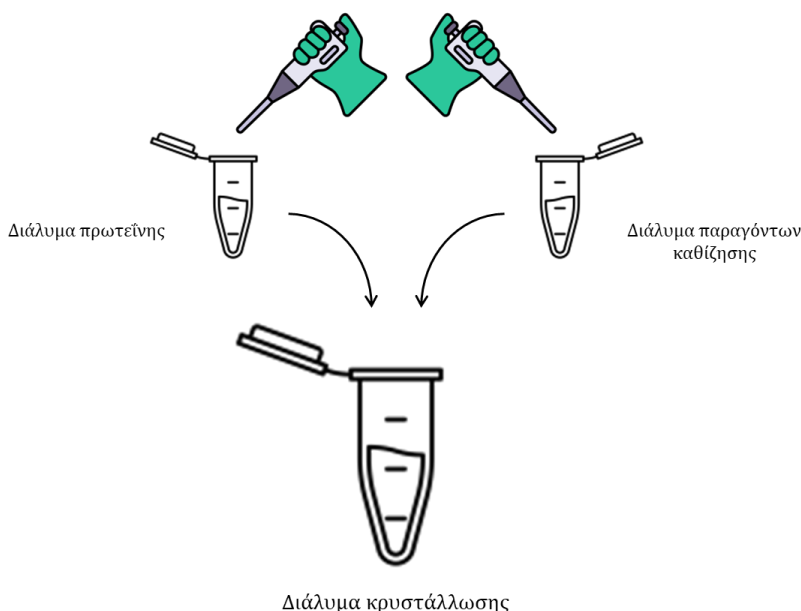
Τέλος, ο χρόνος είναι παράμετρος που επιδρά θετικά έως ένα σημείο, καθώς δίνει την δυνατότητα στα μόρια να οργανωθούν σε σταθερούς πυρήνες και οι κρύσταλλοι να αυξηθούν σταδιακά. Ωστόσο, εάν η διαδικασία παραταθεί υπερβολικά, μπορεί να υποβαθμιστεί η ποιότητα των κρυστάλλων. Η πολυπλοκότητα όλων αυτών των παραμέτρων εξηγεί γιατί η διαδικασία κρυστάλλωσης σπάνια είναι ευθύγραμμη και απαιτεί πολλαπλές επαναλήψεις με διαφοροποίηση συνθηκών. Το ζητούμενο σε κάθε περίπτωση είναι να επιτευχθεί η κατάλληλη υπερκορεσμένη κατάσταση με ελεγχόμενο ρυθμό, ώστε να παραχθούν κρύσταλλοι που να πληρούν τα κριτήρια για δομικό χαρακτηρισμό.

1.1.4. Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης πρωτεϊνών αναπτύχθηκαν με σκοπό να δημιουργηθούν οι συνθήκες υπερκορεσμού που θα επιτρέψουν τον σχηματισμό πυρήνων και την ανάπτυξη κρυστάλλων. Κάθε μέθοδος βασίζεται σε διαφορετικό μηχανισμό, ωστόσο όλες στοχεύουν στη σταδιακή μεταβολή των ιδιοτήτων το διαλύματος ώστε να μεταφερθεί το σύστημα από την κατάσταση ισορροπίας σε εκείνη της πυρήνωσης. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από την εκάστοτε πρωτεΐνη, την ποσότητα πρωτεΐνης που είναι διαθέσιμοι και τον σκοπό της μελέτης (Bergfors, 2021; McPherson & Gavira, 2014).

Η μέθοδος **άμεσης ανάμιξης** (*batch*) αποτελεί μία από τις παλαιότερες και απλούστερες τεχνικές κρυστάλλωσης (**Εικόνα 1-4**). Η αρχή της είναι ιδιαίτερα άμεση, καθώς το διάλυμα της πρωτεΐνης αναμειγνύεται κατευθείαν με το διάλυμα παραγόντων καθίζησης σε συγκεκριμένη αναλογία όγκων, συχνά 1:1. Το αποτέλεσμα είναι η απότομη υπέρβαση του ορίου διαλυτότητας, με το διάλυμα να οδηγείται κατευθείαν στην ζώνη πυρήνωσης. Η διαδικασία αυτή προκαλεί την γρήγορη εμφάνιση μεγάλου αριθμού πυρήνων, με συνέπεια την παραγωγή πολυκρυσταλλικού ιζήματος (Chayen & Saridakis, 2008). Αυτός ο αιφνίδιος χαρακτήρας της μεθόδου καθιστά την μέθοδο *batch* ιδιαίτερα χρήσιμη όταν ζητούμενο είναι η

παραγωγή μαζικών ποσοτήτων μικροκρυσταλλικού δείγματος, όπως απαιτείται για πειράματα περίθλασης ακτίνων-Χ από πολυκρυσταλλικό ίζημα (Margiolaki, 2019). Ωστόσο, μειονεκτεί όταν στόχος είναι η ανάπτυξη μονοκρυστάλλων υψηλής ποιότητας, καθώς η απότομη αλλαγή συνθηκών δεν ευνοεί τον σχηματισμό λίγων και σταθερών ευμεγεθών μονοκρυστάλλων (D'Arcy et al., 2004). Μία παραλλαγή της μεθόδου είναι η *microbatch* υπό έλαιο, η οποία περιορίζει την επαφή με το περιβάλλον καλύπτοντας μικρές σταγόνες διαλύματος με έλαιο, ώστε να αποτραπεί η εξάτμιση και να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη σταθερότητα.

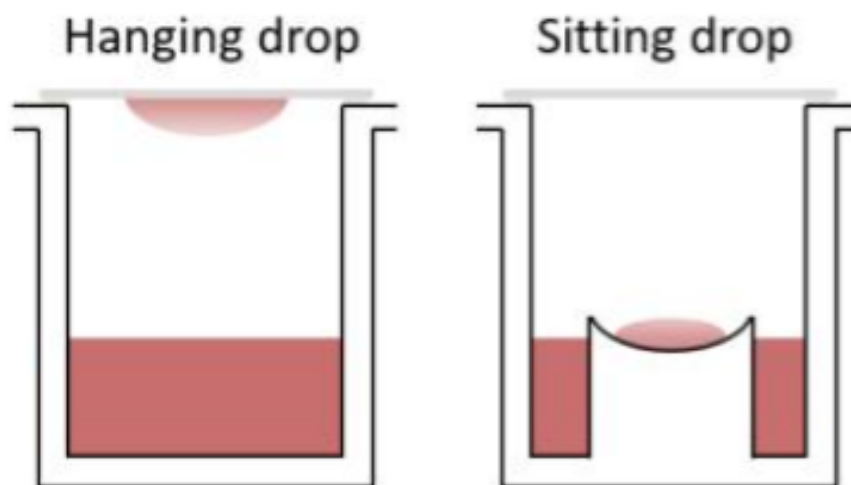


Εικόνα 1-4. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου κρυστάλλωσης άμεσης ανάμιξης.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ανάπτυξη μονοκρυστάλλων είναι η **διάχυση ατμών** (*vapor diffusion*). Σε αυτήν την μέθοδο, το διάλυμα της πρωτεΐνης αναμειγνύεται με το διάλυμα παραγόντων καθίζησης σε αναλογία συνήθως 1:1 και σχηματίζεται μια μικρή σταγόνα. Η σταγόνα αυτή τοποθετείται σε κλειστό σύστημα μαζί με μια δεξαμενή που περιέχει διάλυμα παραγόντων καθίζησης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η διαφορά συγκέντρωσης δρα ως κινητήρια δύναμη, καθώς μόρια νερού μεταφέρονται υπό τη μορφή υδρατμών από την σταγόνα προς την δεξαμενή, έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η σταγόνα συμπυκνώνεται, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται και το διάλυμα εισέρχεται σε υπερκορεσμένη κατάσταση, γεγονός που επιτρέπει την έναρξη της κρυστάλλωσης (McPherson & Gavira, 2014; Chayen & Saridakis, 2008).

Η μέθοδος διάχυσης ατμών εφαρμόζεται κυρίως με δύο διατάξεις, αυτήν της **κρεμάμενης σταγόνας** (*hanging drop*) και αυτήν της **καθήμενης σταγόνας** (*sitting drop*) (Εικόνα 1-5). Στην περίπτωση της κρεμάμενης σταγόνας, η σταγόνα τοποθετείται σε καλυπτρίδα που αναστρέφεται πάνω από την δεξαμενή, συγκρατούμενη στην θέση της λόγω επιφανειακής τάσης. Στην περίπτωση της καθήμενης σταγόνας, η σταγόνα με το διάλυμα κρυστάλλωσης τοποθετείται σε ειδική υποδοχή, η οποία είναι υπερυψωμένη πάνω από την δεξαμενή με το διάλυμα παραγόντων καθίζησης. Και οι δύο τεχνικές ακολουθούν τον ίδιο μηχανισμό διάχυσης ατμών, αλλά διαφοροποιούνται στον χειρισμό και στις λεπτομέρειες πρόσβασης στους σχηματιζόμενους κρυστάλλους. Η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας απαιτεί περισσότερη προετοιμασία αλλά διευκολύνει την απομόνωση κρυστάλλων, ενώ η καθήμενη σταγόνα είναι απλούστερη, και προσφέρεται και για *screening* μεγάλου αριθμού συνθηκών (Rupp, 2010). Ένα βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου διάχυσης ατμών είναι ότι η μετάβαση στην ζώνη πυρήνωσης

γίνεται αργά και ελεγχόμενα, γεγονός που επιτρέπει τον σχηματισμό λίγων πυρήνων και την ανάπτυξή τους σε μεγάλους, καλοσχηματισμένους μονοκρυστάλλους, κατάλληλους για πειράματα περίθλασης ακτίνων-X από μονοκρυστάλλους.



Εικόνα 1-5. Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών κρεμάμενης σταγόνας (αριστερά) και καθήμενης σταγόνας (δεξιά) της μεθόδου κρυστάλλωσης διάχυσης ατμών (Πηγή: [Crystal Growth | Biology Linac Coherent Light Source](#)).

Πέρα από τις δύο βασικές προσεγγίσεις, έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές με πιο εξειδικευμένες εφαρμογές. Στην μέθοδο *sandwich drop*, η σταγόνα εγκλωβίζεται ανάμεσα σε δύο στρώματα λαδιού ή ειδικά υποστρώματα, ώστε να εξασφαλιστεί ακόμη πιο ελεγχόμενος ρυθμός εξάτμισης. Η διαπίδυση (*dialysis*) βασίζεται στην χρήση μεμβράνης που επιτρέπει την αργή ανταλλαγή μικρών μορίων μεταξύ διαλυμάτων, ρυθμίζοντας με ακρίβεια τις συνθήκες κρυστάλλωσης. Αντίστοιχα η διάχυση ελεύθερης διεπαφής (*free interface diffusion*) στηρίζεται στην απευθείας επαφή δύο διαλυμάτων, αυτών της πρωτεΐνης και των παραγόντων καθίζησης, τα οποία έρχονται σε επαφή χωρίς ανάδευση, επιτρέποντας της σταδιακή δημιουργία περιοχής υπερκορεσμού στην διεπιφάνεια (McPherson, 2004; Bergfors, 2021).

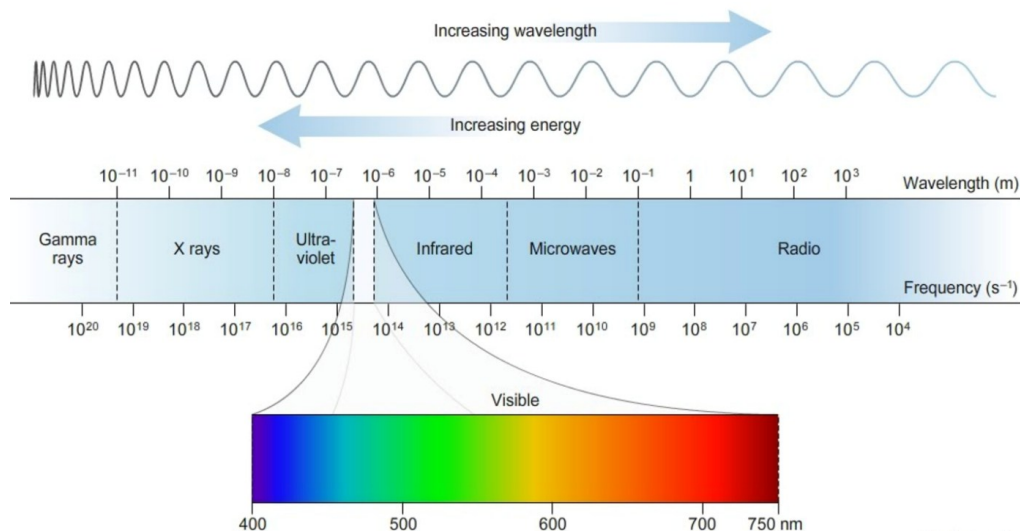
Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους, σε πολλές περιπτώσεις εφαρμόζεται η μέθοδος **σποράς** (*seeding*). Κατά αυτήν την τεχνική, μικροί κρύσταλλοι ή θραύσματά τους χρησιμοποιούνται ως «σπόροι» για να κατευθύνουν την ανάπτυξη νέων κρυστάλλων σε ελεγχόμενες συνθήκες υπερκορεσμού (Bergfors, 2003, McPherson & Gavira, 2014). Το seeding δεν αποτελεί αυτόνομη μέθοδο κρυστάλλωσης, αλλά μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ή την αναπαραγωγικότητα των κρυστάλλων, ιδιαίτερα όταν η αυθόρμητη πυρήνωση είναι δύσκολη.

1.2. Ακτίνες-X

Οι **ακτίνες-X** (*X-rays*) αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, με εύρος εφαρμογών που εκτείνεται από την ιατρική διάγνωση έως την έρευνα της δομής της ύλης. Ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Roentgen, ο οποίος παρατήρησε την ικανότητά τους να διαπερνούν υλικά που θεωρούνταν αδιαφανή στο φως και να αποτυπώνουν εικόνες σε φωτογραφικό φιλμ. Η πραγματική τους ταυτότητα διαπιστώθηκε το 1912, με την ανακάλυψη του φαινομένου της περίθλασης από κρυστάλλους από τον Laue και τους συνεργάτες του. Το πείραμα αυτό απέδειξε ότι οι ακτίνες-X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με κυματική φύση, παρόμοια με το ορατό φως, αλλά με πολύ μικρότερα μήκη κύματος (Βραβείο Νόμπελ Φυσικής 1914).

1.2.1. Ιδιότητες ακτίνων-X

Οι ακτίνες-X εντάσσονται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ανάμεσα στην υπεριώδη ακτινοβολία και τις ακτίνες-γ. Το μήκος κύματος τους κυμαίνεται τυπικά από 0,08 έως 10 nm (0.8–100 Å), ενώ η ενέργεια των φωτονίων τους βρίσκεται στο εύρος 125 eV έως 125 keV. Σε όρους συχνότητας, αντιστοιχούν στο διάστημα 3×10^{16} Hz έως 3×10^{19} Hz, τιμές που είναι αρκετές για να προσδώσουν στις ακτίνες-X την ιδιότητα της ιονίζουσας ακτινοβολίας (**Εικόνα 1-6**) (Cullity, 1956; Newman, 2013).



Εικόνα 1-6. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (Πηγή: [Electromagnetic Wave Theory - Chemistry, Class 11, Structure of Atom](#)).

Η ταξινόμησή τους γίνεται συνήθως σε δύο βασικές κατηγορίες, τις μαλακές και τις σκληρές ακτίνες-X. Οι **μαλακές ακτίνες-X** (*soft X-rays*) χαρακτηρίζονται από ενέργειες της τάξης 125 eV–5 keV και σχετικά μεγάλα μήκη κύματος, με συνέπεια να έχουν μικρή διεισδυτικότητα. Αντιθέτως, οι **σκληρές ακτίνες-X** (*hard x-rays*), με ενέργειες 5–125 keV και μικρότερα μήκη κύματος, διαθέτουν υψηλή διεισδυτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για ιατρικές απεικονίσεις, βιομηχανικούς ελέγχους και στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Newman, 2013).

Στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών και γενικότερα στην μελέτη βιολογικών μακρομορίων, προτιμώνται οι σκληρές ακτίνες-X με μήκη κύματος 0.8–1.5 Å. Το εύρος αυτό είναι ιδανικό επειδή είναι συγκρίσιμο με την διάμετρο του ατόμου του υδρογόνου, που είναι το μικρότερο στην φύση. Έτσι επιτυγχάνεται η συλλογή δεδομένων περίθλασης με υψηλή διακριτική ικανότητα και η ακριβής τοποθέτηση των ατόμων στο τρισδιάστατο μόριο (Cullity, 1956; Newman, 2013).

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των ακτίνων-X είναι η διττή φύση τους. Όπως όλα τα είδη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, μπορούν να περιγραφούν είτε ως κύματα με συγκεκριμένο μήκος κύματος και συχνότητα, είτε ως σωματίδια (φωτόνια) που φέρουν ενέργεια ίση με $E = h\nu$, όπου h είναι η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα (Willmott et al., 2013). Η διπλή αυτή περιγραφή είναι καθοριστική, αφού η κυματική φύση εξηγεί τα φαινόμενα περίθλασης και συμβολής, ενώ η σωματιδιακή φύση είναι κρίσιμη για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των ακτίνων-X με την ύλη.

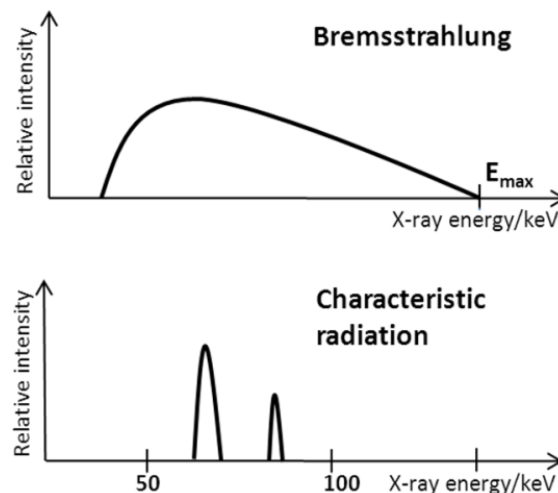
Η ένταση της ακτινοβολίας ακτίνων-X, όπως και κάθε μορφής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, περιγράφεται από τον ρυθμό μεταφοράς ενέργειας σε μια επιφάνεια και μετριέται σε $\text{J} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Η θεμελιώδης αυτή ιδέα εισήχθη από τον Royniting τον 19ο αιώνα (Royniting, 1884). Ωστόσο, για την περιγραφή και σύγκριση δεσμών ακτίνων-X έχουν καθιερωθεί πιο εξειδικευμένα μεγέθη. Η **ροή φωτονίων** (*photon flux*) εκφράζει τον αριθμό φωτονίων που διέρχονται από μια επιφάνεια ανά μονάδα χρόνου και φασματικού εύρους, ενώ η **λαμπρότητα** (*brilliance*) λαμβάνει υπόψη επιπλέον την διατομή

της δέσμης και την γωνιακή της απόκλιση, καθιστώντας την χρήσιμη για τον χαρακτηρισμό ακτινοβολιών όπως είναι η ακτινοβολία σύγχροτρον (Willmott et al., 2013; Fitch, 2019).

1.2.2. Παραγωγή ακτίνων-X

Η παραγωγή ακτίνων-X πραγματοποιείται μέσω της επιτάχυνσης ηλεκτρονίων και της πρόσκρουσής τους σε έναν στόχο αποτελούμενο από μεταλλικό υλικό με υψηλό ατομικό αριθμό (Cullity, 1956). Κατά την αλληλεπίδραση αυτήν, τα ηλεκτρόνια χάνουν μέρος της κινητικής τους ενέργειας. Η απώλεια αυτή εκδηλώνεται με δύο τρόπους, είτε με την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας υπό μορφή ακτίνων-X, είτε με την μεταφορά ενέργειας στα άτομα του στόχου, προκαλώντας διέγερση ή απομάκρυνση ηλεκτρονίων από τις εσωτερικές τους στοιβάδες. Τα κενά που δημιουργούνται συμπληρώνονται από ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακών στοιβάδων, και η μετάβαση αυτή συνοδεύεται από την εκπομπή φωτονίων με ενέργεια που αντιστοιχεί στην διαφορά ενέργειας των στοιβάδων. Αυτά τα φωτόνια έχουν την απαιτούμενη ενέργεια ώστε να χαρακτηριστούν ως ακτίνες-X.

Για την πληρέστερη κατανόηση του μηχανισμού δημιουργίας ακτίνων-X, είναι αναγκαίο να εξεταστούν δύο βασικές κατηγορίες ακτινοβολίας, η ακτινοβολία πέδησης και οι χαρακτηριστικές ακτίνες-X (Εικόνα 1-7).



Εικόνα 1-7. Αναπαράσταση του συνεχούς φάσματος ακτινοβολίας πέδησης (άνω) και του φάσματος χαρακτηριστικών ακτίνων-X (κάτω) (Πηγή: Flay & Leach, 2012).

1.2.2.1. Ακτινοβολία πέδησης

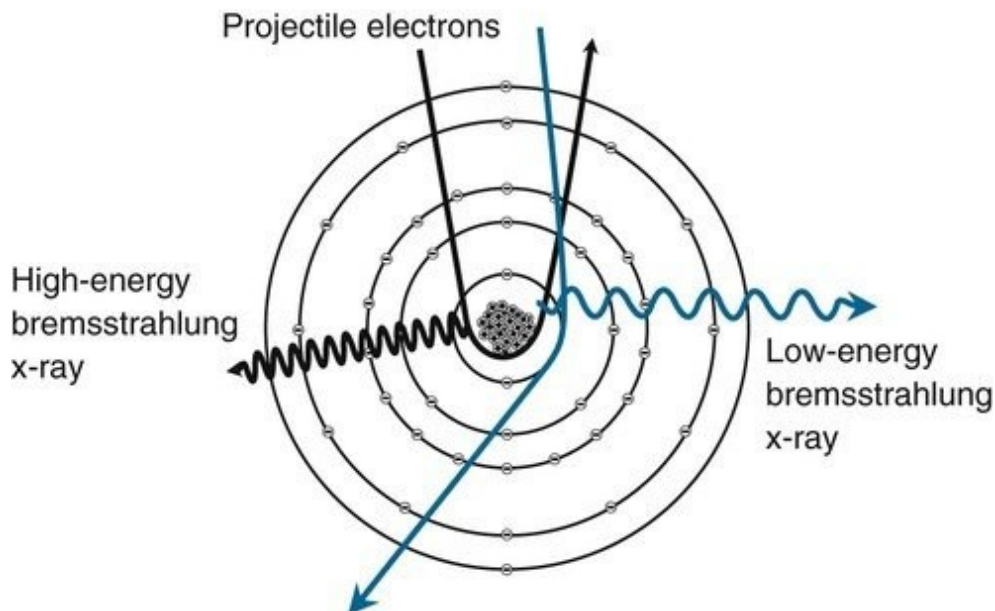
Η **ακτινοβολία πέδησης** (*Bremsstrahlung radiation*) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν φορτισμένα σωματίδια, όπως τα ηλεκτρόνια, επιβραδύνονται ή εκτρέπονται από το ηλεκτρικό πεδίο ενός ατομικού πυρήνα ή άλλου φορτισμένου σωματιδίου, με αποτέλεσμα να χάνεται ένα μέρος της κινητικής τους ενέργειας. Η χαμένη αυτή ενέργεια μετατρέπεται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, σύμφωνα με την αρχή της διατήρησης της ενέργειας, και αντιστοιχεί στα φωτόνια των εκπεμπόμενων ακτίνων-X (Εικόνα 1-8).

Η ένταση και η κατανομή της παραγόμενης ακτινοβολίας εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η ενέργεια των προσπιπτόντων ηλεκτρονίων, ο ατομικός αριθμός του υλικού στόχου, το πάχος του στόχου και η απόσταση του ηλεκτρονίου με τον πυρήνα. Όσο υψηλότερη είναι η ενέργεια των ηλεκτρονίων και όσο βαρύτερο το υλικό του στόχου, τόσο εντονότερη είναι η εκπεμπόμενη ακτινοβολία.

Ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του συνεχούς φάσματος που προκύπτει από το Bremsstrahlung είναι το ελάχιστο μήκος κύματος (*short-wavelength limit*, λ_{SWL}), το οποίο σχετίζεται άμεσα με την επιταχυντική τάση που εφαρμόζεται στον σωλήνα ακτίνων-X. Η σχέση δίνεται από τον τύπο:

$$\lambda_{SWL} = \frac{12400}{V}$$

Αυτό σημαίνει ότι με την αύξηση της τάσης, το φάσμα μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος, παρέχοντας φωτόνια υψηλότερης ενέργειας (Cullity, 1956).



Εικόνα 1-8. Σχηματική απεικόνιση παραγωγής ακτινοβολίας πέδησης διαφόρων ενεργειών (Πηγή: [Bremsstrahlung Radiation – PhysicsOpenLab](#)).

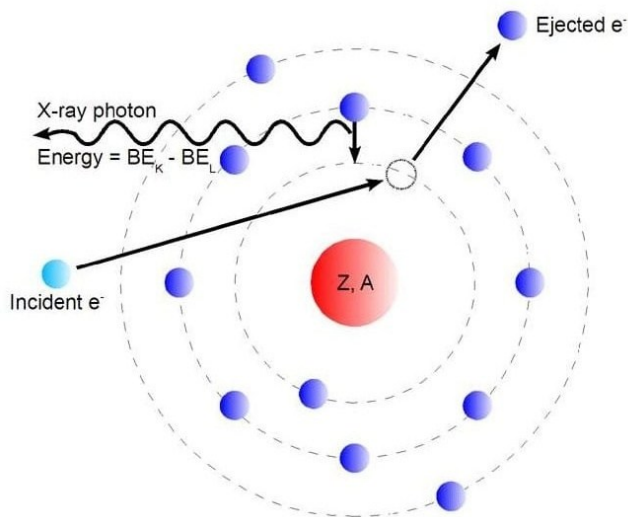
1.2.2.2. Χαρακτηριστικές ακτίνες-X

Πέρα από το συνεχές φάσμα, η αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων με τον στόχο οδηγεί και στην εκπομπή **χαρακτηριστικών ακτίνων-X** (*characteristic X-rays*). Όταν ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας απομακρύνει ένα ηλεκτρόνιο από τις εσωτερικές στοιβάδες ενός ατόμου, δημιουργείται κενό που στην συνέχεια πληρείται από ηλεκτρόνιο εξωτερικής στοιβάδας. Η μετάβαση αυτή συνοδεύεται από εκπομπή φωτονίου συγκεκριμένης ενέργειας, ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο τροχιακών (**Εικόνα 1-9**). Δεδομένου ότι οι ενεργειακές στάθμες είναι μοναδικές για κάθε στοιχείο, τα μήκη κύματος των χαρακτηριστικών ακτίνων-X αποτελούν ταυτότητα του υλικού στόχου (Willson, 2020).

Οι χαρακτηριστικές ακτίνες-X χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με τη στοιβάδα όπου δημιουργείται το κενό. Οι χαρακτηριστικές ακτίνες-X K (K_α και K_β) προκύπτουν από μεταβάσεις προς την εσωτερική στοιβάδα K ($n=1$) και διαθέτουν την υψηλότερη ενέργεια. Αντίστοιχα, μεταβάσεις προς τις στοιβάδες L ή M οδηγούν σε ακτινοβολίες χαμηλότερης ενέργειας, πάντοτε όμως χαρακτηριστικές του συγκεκριμένου υλικού (Cullity, 1956).

Η σημασία των χαρακτηριστικών ακτίνων-X στην κρυσταλλογραφία είναι καθοριστική. Η χρήση ακτινοβολίας γνωστής ενέργειας και συνεπώς γνωστού μήκους κύματος επιτρέπει υψηλή διακριτική ικανότητα στα πειράματα περίθλασης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση ανόδου χαλκού, η οποία εκπέμπει την χαρακτηριστική ακτινοβολία $K_{\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$. Το συγκεκριμένο μήκος κύματος θεωρείται ιδανικό για κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών, καθώς συνδυάζει επαρκή διείσδυση στο δείγμα με υψηλή ποιότητα δεδομένων, ενώ η μονοχρωματικότητα εξασφαλίζει ομοιογενή ακτινοβολία του

κρυσταλλικού δείγματος, γεγονός το οποίο βελτιώνει σημαντικά τα δεδομένα περίθλασης που λαμβάνονται.

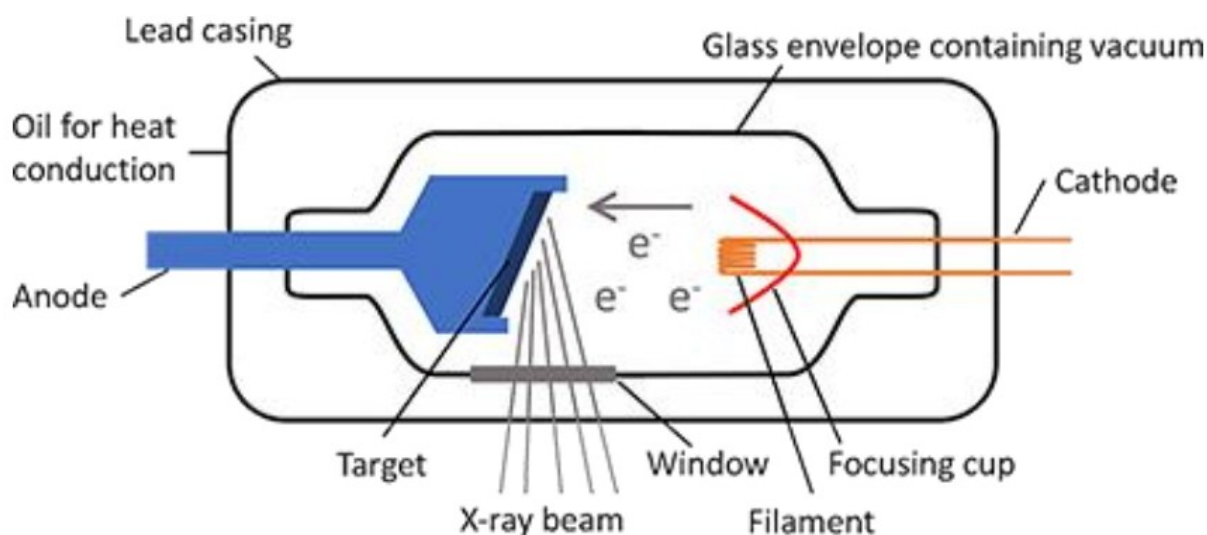


Εικόνα 1-9. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής χαρακτηριστικών ακτίνων-X (Πηγή: [Kilovoltage X-ray Generation | Oncology Medical Physics](#)).

1.2.3. Πηγές ακτίνων-X

1.2.3.1. Σωλήνες ακτίνων-X

Οι **σωλήνες ακτίνων-X** (*X-ray tubes*) αποτελούν τις βασικές εργαστηριακές πηγές για την παραγωγή ακτινοβολίας και η λειτουργία τους βασίζεται στην μετατροπή ηλεκτρικής ενέργειας σε φωτόνια ακτίνων-X. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικά αναποτελεσματική, καθώς λιγότερο από το 1% της συνολικής ηλεκτρικής ενέργειας μετατρέπεται σε ακτινοβολία, ενώ το υπόλοιπο 99% απελευθερώνεται ως θερμότητα. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την διαχείριση υψηλών θερμικών φορτίων, ώστε να εξασφαλίζεται η μακροχρόνια και ασφαλής λειτουργία του σωλήνα. Γι' αυτό ο σχεδιασμός και η σύνθεση των σωλήνων ακτίνων-X είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την ανάγκη ψύξης της ανόδου και την αντοχή των υλικών που χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 1-10. Σχηματική απεικόνιση ενός σωλήνα ακτίνων-X και των στοιχείων που τον απαρτίζουν (Πηγή: Basnet, 2023).

Ένας τυπικός σωλήνας ακτίνων-X περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στοιχεία, τα οποία είναι η άνοδος (*anode*), η κάθοδος (*cathode*), το περίβλημα του σωλήνα (*tube envelope*) και η θήκη (*tube housing*) που τον

περιβάλλει. Η κάθοδος είναι συνήθως ένα νήμα βολφραμίου, το οποίο θερμαίνεται με την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέρμανση προκαλεί θερμιονική εκπομπή (*thermionic emission*) ηλεκτρονίων, δηλαδή απελευθέρωση ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του μετάλλου λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Τα απελευθερωμένα ηλεκτρόνια έλκονται από την άνοδο, η οποία διατηρείται σε θετικό δυναμικό σε σχέση με την κάθοδο, και προσπίπτουν στον μεταλλικό στόχο που αυτή φέρει (συνήθως βολφράμιο, μολυβδαίνιο ή χαλκός) (**Εικόνα 1-10**) (Basnet, 2023). Η μέγιστη ενέργεια που αποκτούν τα ηλεκτρόνια καθορίζεται από την τάση του σωλήνα, η οποία είναι συνήθως της τάξης των 30–50 kV (Cullity, 1956; Zink, 1997).

Για την μείωση των ακτίνων-X χαμηλής ενέργειας, οι οποίες δεν είναι χρήσιμες για πειράματα περίθλασης και αυξάνουν τον θόρυβο, χρησιμοποιούνται ειδικά φίλτρα που τοποθετούνται στην έξοδο του σωλήνα. Το περίβλημα του σωλήνα απορροφά επίσης μέρος των ακτίνων χαμηλής ενέργειας, αφήνοντας να περάσουν οι πιο «καθαρές» συνιστώσες της δέσμης. Έτσι διαμορφώνεται ένα φάσμα με συνεχές υπόβαθρο και ευδιάκριτες κορυφές χαρακτηριστικών γραμμών, όπως φαίνεται σε τυπικά διαγράμματα έντασης-ενέργειας (Basnet, 2023; Willson, 2020).

1.2.3.2. Ακτινοβολία σύγχροτρον

Η **ακτινοβολία σύγχροτρον** (*synchrotron radiation*) αποτελεί μια ιδιαίτερη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που παράγεται όταν ηλεκτρόνια κινούνται με υψηλές ταχύτητες και εκτρέπονται από την ευθύγραμμη πορεία τους λόγω μαγνητικών πεδίων (Fitch, 2019). Το φαινόμενο αυτό έχει τεράστια σημασία στην επιστημονική έρευνα, καθώς η εκπεμπόμενη ακτινοβολία διαθέτει ιδιότητες που υπερβαίνουν κατά πολύ τις δυνατότητες των κλασικών εργαστηριακών πηγών ακτίνων-X.

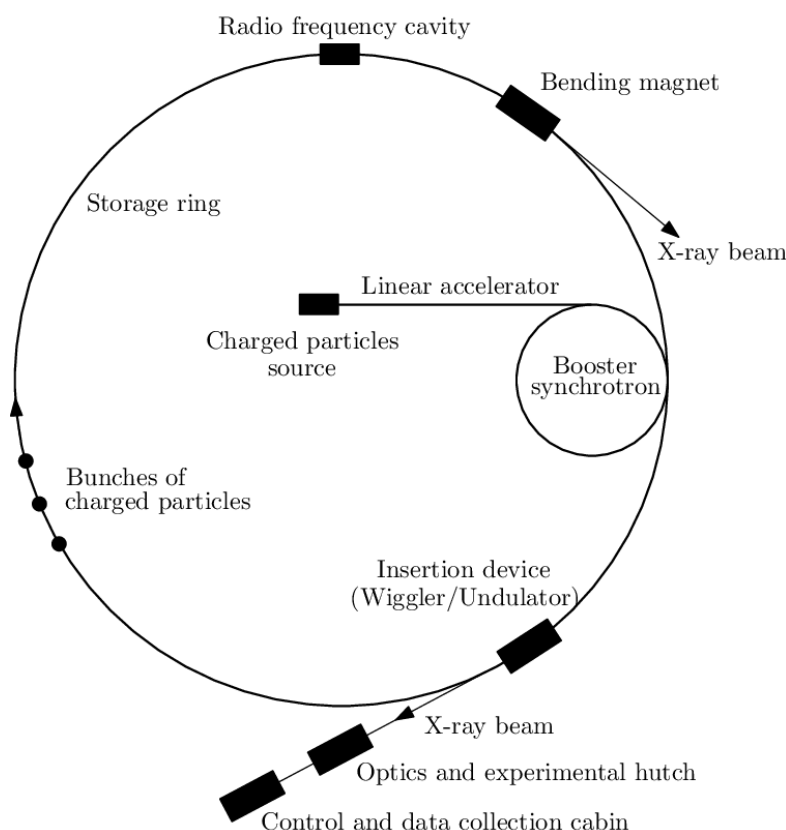
Η βασική αρχή ενός σύγχροτρον περιλαμβάνει την δημιουργία και επιτάχυνση ηλεκτρονίων. Η αρχική πηγή είναι ένα κανόνι ηλεκτρονίων (*electron gun*), το οποίο παράγει ηλεκτρόνια μέσω θερμιονικής εκπομπής. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται σε υψηλές ταχύτητες με τη βοήθεια ενός γραμμικού επιταχυντή (*linear accelerator*) και οδηγούνται σε έναν ενισχυτικό δακτύλιο (*booster ring*). Εκεί αυξάνεται περαιτέρω η ενέργειά τους μέχρι να αποκτήσουν τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται για να εισαχθούν στον αποθηκευτικό δακτύλιο (*storage ring*), ο οποίος αποτελεί τον πυρήνα κάθε εγκατάστασης σύγχροτρον (Bharti & Goyal, 2019).

Στον αποθηκευτικό δακτύλιο, τα ηλεκτρόνια διατηρούνται σε κυκλική τροχιά χάρη στη δράση ενός πλέγματος μαγνητών. Οι μαγνήτες κάμψης (*bending magnets*) αναγκάζουν τα ηλεκτρόνια να ακολουθήσουν την κυκλική διαδρομή, ενώ οι τετραπολικοί και εξαπολικοί μαγνήτες ελέγχουν και σταθεροποιούν τη δέσμη, ώστε να διατηρεί χαμηλή απόκλιση και υψηλή ευθυγράμμιση. Καθώς τα ηλεκτρόνια εκτρέπονται από τους μαγνήτες, εκπέμπουν ακτινοβολία σύγχροτρον που καλύπτει ένα πολύ ευρύ φάσμα ενεργειών, από το υπέρυθρο μέχρι τις σκληρές ακτίνες-X (Bharti & Goyal, 2019).

Η εκπεμπόμενη δέσμη οδηγείται στους πειραματικούς σταθμούς (*beamlines*) μέσω εξειδικευμένων συσκευών εισαγωγής (*insertion devices*), οι οποίες περιλαμβάνουν οπτικά στοιχεία όπως μονοχρωμάτορες, κάτοπτρα και φακούς εστίασης, που τα απαραίτητα χαρακτηριστικά στην δέσμη ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος (**Εικόνα 1-11**).

Η ακτινοβολία σύγχροτρον παρουσιάζει μια σειρά από ιδιαίτερα πλεονεκτήματα σε σχέση με την συμβατική ακτινοβολία ακτίνων-X από σωλήνες, τα οποία την καθιστούν εξαιρετικά χρήσιμη για εφαρμογές όπως η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών και η μελέτη πολύπλοκων υλικών. Το πρώτο και σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι η πολύ υψηλή ένταση (*intensity*) της δέσμης, που είναι κατά εκατοντάδες φορές μεγαλύτερη από αυτήν ενός σωλήνα ακτίνων-X, ενώ σε πιο εξελιγμένα συστήματα, όπως οι *undulators* και οι *wigglers*, η ένταση αυξάνεται ακόμη περισσότερο. Αυτό επιτρέπει την συλλογή

δεδομένων υψηλής ποιότητας σε μικρότερο χρόνο, ενώ η χαμηλή απόκλιση της δέσμης εξασφαλίζει πιο ευκρινή και καθαρά σήματα περίθλασης. Εξίσου σημαντική είναι η ρυθμισιμότητα (*tunability*) της ακτινοβολίας, καθώς με τη χρήση μονοχρωμάτορα μπορεί να επιλεγεί οποιοδήποτε μήκος κύματος εντός του φάσματος. Η δυνατότητα αυτή καθιστά εφικτές ειδικές τεχνικές, όπως η περίθλαση Laue, ενώ τα μικρότερα μήκη κύματος προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία στους ανιχνευτές, καθώς και μειωμένη απορρόφηση κατά την διέλευση της ακτινοβολίας τόσο από τον αέρα όσο και από τον ίδιο τον κρύσταλλο. Παράλληλα, η διάρκεια ζωής (*lifetime*) της δέσμης στον δακτύλιο αποθήκευσης είναι περιορισμένη, καθώς η ένταση μειώνεται προοδευτικά και απαιτείται νέα έγχυση μετά από κάποιο διάστημα. Στο ESRF, για παράδειγμα, η διάρκεια ζωής της δέσμης κυμαίνεται μεταξύ 50 και 80 ωρών, ανάλογα με το ρεύμα. Ένα άλλο κρίσιμο χαρακτηριστικό είναι η χρονική δομή (*time structure*) της ακτινοβολίας σύγχροτρον, η οποία δεν είναι συνεχής όπως στους σωλήνες ακτίνων-X, αλλά αποτελείται από παλμούς (*flashes*) εξαιρετικά μικρής διάρκειας (σε μεγέθη picosecond), που προέρχονται από τις κυκλοφορούσες δέσμες (*bunches*) φορτισμένων σωματιδίων. Έτσι, μπορούν να μελετηθούν δυναμικές διεργασίες και δομικές αλλαγές σε χρονικές κλίμακες nanosecond. Τέλος, ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό της ακτινοβολίας σύγχροτρον είναι η υψηλή λαμπρότητα (*brilliance*), δηλαδή ο συνδυασμός υψηλής έντασης, μικρής γωνιακής απόκλισης και μικρού μεγέθους δέσμης. Η υψηλή λαμπρότητα καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη απόκτηση μεγάλης ποσότητας και εξαιρετικά λεπτομερών δεδομένων, επιτρέποντας την μελέτη ακόμα και πολύ μικρών κρυστάλλων ή νανοκρυστάλλων με ιδιαίτερη ακρίβεια. (Drenth, 2007; Balerna & Mobilio, 2015).



Εικόνα 1-11. Σχηματική απεικόνιση ενός σύγχροτρον και των κύριων τμημάτων του (Πηγή: Sochi, 2010).

1.3. Δομή & Συμμετρία κρυστάλλων

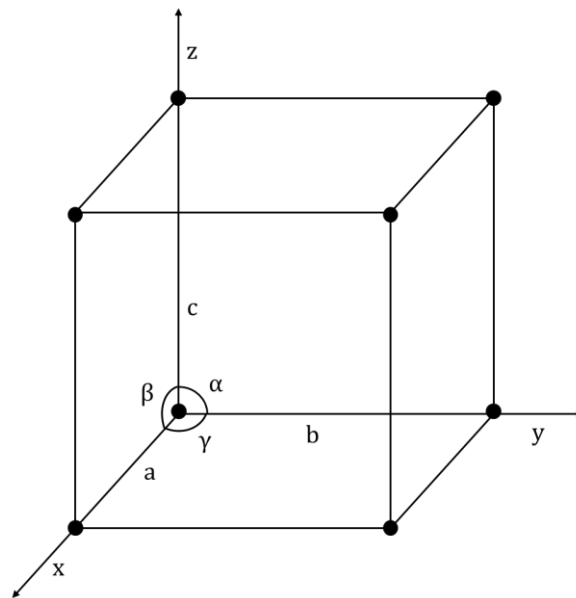
Για την εις βάθος κατανόηση των αρχών της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, είναι απαραίτητο να εξεταστούν τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά των κρυστάλλων. Η ικανότητά τους να περιθλούν ακτίνες-X απορρέει άμεσα από την εσωτερική τους δομή, η οποία χαρακτηρίζεται από περιοδική οργάνωση των

ατόμων στον χώρο. Η διερεύνηση της φύσης και της γεωμετρίας των κρυστάλλων, καθώς και των παραμέτρων που περιγράφουν τις ιδιότητές τους, αποτελεί αναγκαία βάση για την κατανόηση των φαινομένων περίθλασης και κατ' επέκταση για την εφαρμογή της κρυσταλλογραφικής μεθοδολογίας.

Ως **κρύσταλλος** (*crystal*) ορίζεται ένα στερεό, του οποίου τα άτομα, ιόντα ή μόρια οργανώνονται περιοδικά και με αυστηρή διάταξη στον χώρο, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η συνολική δυναμική ενέργεια του συστήματος. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα στερεά κρυσταλλικά, καθώς ορισμένα, όπως το γυαλί, είναι άμορφα και δεν εμφανίζουν καμία εσωτερική οργάνωση. Με άλλα λόγια, ένας κρύσταλλος είναι μια φάση της στερεής κατάστασης της ύλης. Η περιοδικότητα επαναλαμβάνεται στις τρεις διαστάσεις, προσδίδοντας έτσι στους κρυστάλλους χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες (Cullity, 1956; Chang & Thoman, 2021).

1.3.1. Κρυσταλλικό πλέγμα & Τύποι κέντρωσης

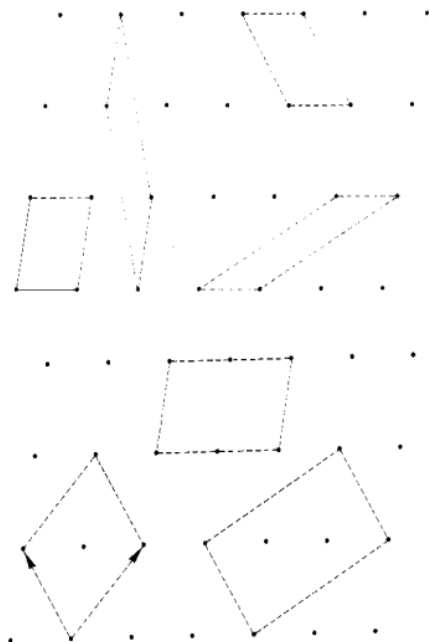
Το **κρυσταλλικό πλέγμα** (*crystal lattice*) αποτελεί μια τρισδιάστατη, περιοδική διάταξη σημείων, γνωστών ως **πλεγματικά σημεία** (*lattice points*), στην οποία το περιβάλλον κάθε πλεγματικού σημείου είναι πανομοιότυπο με εκείνου οποιουδήποτε άλλου πλεγματικού σημείου. Σε κάθε πλεγματικό σημείο αντιστοιχεί μια **δομική μονάδα** (*motif*), δηλαδή μία ή περισσότερες ατομικές, ιοντικές ή μοριακές ομάδες διατεταγμένες με συγκεκριμένη γεωμετρία (Giacovazzo et al., 1992; Askeland et al., 2010). Ένα πλέγμα μπορεί να είναι μονοδιάστατο, δισδιάστατο ή τρισδιάστατο, με την τελευταία μορφή να χαρακτηρίζει τα περισσότερα κρυσταλλικά στερεά. Γεωμετρικά, το τρισδιάστατο πλέγμα μπορεί να θεωρηθεί ως μία μαθηματική κατασκευή που επεκτείνεται επ' άπειρον και καθορίζεται από τρία μη ομοεπίπεδα διανύσματα μεταφοράς $\vec{a}$, $\vec{b}$ και $\vec{c}$, τα οποία ορίζουν τις κατευθύνσεις των κρυσταλλογραφικών αξόνων x , y και z αντίστοιχα.



Εικόνα 1-12. Σχηματική απεικόνιση της μοναδιαίας κυψελίδας στον τρισδιάστατο χώρο. Φαίνονται οι συμβολισμοί των αξόνων και πλεγματικών παραμέτρων που την ορίζουν.

Αυτά τα διανύσματα σχηματίζουν ένα παραλληλεπίπεδο, την **μοναδιαία κυψελίδα** (*unit cell*), η οποία αποτελεί την μικρότερη δυνατή δομική μονάδα του κρυστάλλου που με απλή μετατόπιση χωρίς περιστροφή στις τρεις διαστάσεις του χώρου μπορεί να αναπαράξει ολόκληρο τον κρύσταλλο. Η γεωμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζεται από έξι παραμέτρους, οι οποίες είναι οι πλευρές a , b και

c και οι γωνίες α , β και γ , όπου α είναι η γωνία μεταξύ των $\vec{b}$ και $\vec{c}$, β είναι η γωνία μεταξύ των $\vec{a}$ και $\vec{c}$ και γ είναι η γωνία μεταξύ των $\vec{a}$ και $\vec{b}$ (**Εικόνα 1-12**) (Giacovazzo et al., 1992; Ameh, 2019).



Εικόνα 1-13. Απλές και κεντρωμένες μοναδιαίες κυψελίδες στον δισδιάστατο χώρο (Πηγή: Giacovazzo et al., 1992).

Η επιλογή μιας μοναδιαίας κυψελίδας δεν είναι μοναδική, ωστόσο συνηθίζεται να επιλέγεται η μοναδιαία κυψελίδα με τον μικρότερο δυνατό όγκο και την μέγιστη συμμετρία, με σκοπό να απλοποιείται η περιγραφή της δομής. Οι μοναδιαίες κυψελίδες διακρίνονται σε **πρωτογενείς ή απλές** (*primitive unit cells*), όταν περιλαμβάνουν πλεγματικά σημεία μόνο στις κορυφές τους, και σε **μη πρωτογενείς ή κεντρωμένες** (*centered unit cells*), όταν εκτός από τις κορυφές περιέχουν πλεγματικά σημεία και σε θέσεις υψηλής συμμετρίας, όπως στις έδρες τους ή στο κέντρο τους (**Εικόνα 1-13**). Η τοποθέτηση αυτή των πρόσθετων πλεγματικών σημείων ονομάζεται **κέντρωση** (*centering*), και στις τρεις διαστάσεις διακρίνονται επτά καθορισμένοι τύποι κέντρωσης, οι οποίοι περιγράφουν τις διαφορετικές δυνατές θέσεις των πλεγματικών σημείων (**Πίνακας 1-1**) (Giacovazzo et al., 1992; Askeland et al., 2010).

Πίνακας 1-1. Οι επτά τύποι κέντρωσης (Πηγή: Giacovazzo et al., 1992).

Σύμβολο	Τύπος	Θέσεις πρόσθετων πλεγματικών σημείων	Αριθμός πλεγματικών σημείων ανά κυψελίδα
P	Απλή	-	1
I	Ενδοκέντρωση	(1/2, 1/2, 1/2)	2
A	A εδρική κέντρωση	(0, 1/2, 1/2)	2
B	B εδρική κέντρωση	(1/2, 0, 1/2)	2
C	C εδρική κέντρωση	(1/2, 1/2, 0)	2
F	Ολοεδρική κέντρωση	(0, 1/2, 1/2) (1/2, 0, 1/2) (1/2, 1/2, 0)	4
R	Ρομβοεδρική κέντρωση	(1/3, 2/3, 2/3) (2/3, 1/3, 1/3)	3

1.3.2. Κρυσταλλικά συστήματα & Πλέγματα Bravais

Η μορφή και οι διαστάσεις μιας μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζονται από τις **πλεγματικές σταθερές** (*unit cell parameters*), δηλαδή τα μήκη των πλευρών a , b και c και των μεταξύ τους γωνιών α , β και γ .

Ανάλογα με τις σχέσεις μεταξύ αυτών, η μοναδιαία κυψελίδα κατατάσσεται σε ένα από τα επτά **κρυσταλλικά συστήματα** (*crystal systems*): Κυβικό, Τετραγωνικό, Εξαγωνικό, Τριγωνικό/Ρομβοεδρικό, Ορθορομβικό, Μονοκλινές και Τρικλινές. Κάθε κρυσταλλικό σύστημα χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες αναλογίες πλευρών και γωνιών, οι οποίες καθορίζουν την συμμετρία και την γεωμετρία του πλέγματος (**Πίνακας 1-2**). Μαθηματικά έχει αποδειχθεί ότι δεν υπάρχουν άλλες δυνατές κατηγορίες πέρα αυτών των επτά, λόγω περιορισμών που τίθενται εξαιτίας της συμμετρίας.

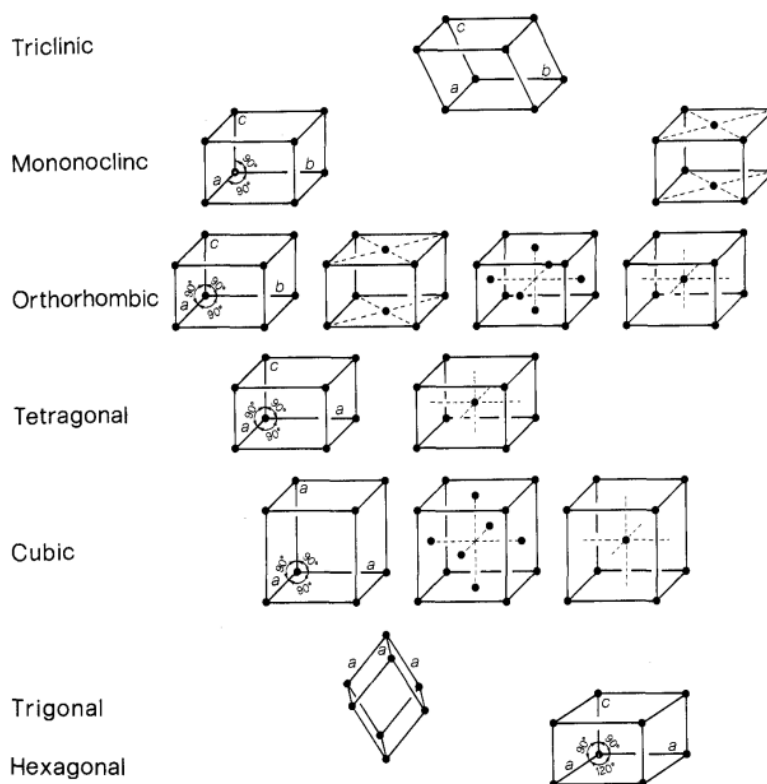
Πίνακας 1-2. Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και οι σχέσεις που διέπουν τις πλεγματικές σταθερές τους (Πηγή: Chang & Thoman, 2021).

Κρυσταλλικό Σύστημα	Πλευρές	Γωνίες
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Εξαγωνικό	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Τετραγωνικό	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ρομβοεδρικό ή Τριγωνικό	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Κυβικό	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Ο Γάλλος φυσικός και κρυσταλλογράφος Auguste Bravais (1811–1863) ερεύνησε συστηματικά τους δυνατούς τρόπους με τους οποίους μπορεί να κατασκευαστεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα. Μέχρι τότε ήταν γνωστό ότι η εσωτερική διάταξη των κρυστάλλων ακολουθεί αυστηρούς γεωμετρικούς κανόνες, ωστόσο δεν είχε προσδιοριστεί πλήρως πόσοι διαφορετικοί τύποι πλεγμάτων είναι δυνατοί. Ο Bravais απέδειξε ότι, αν ληφθούν υπόψη οι διαφορετικοί τύποι κέντρωσης (δηλαδή η παρουσία πρόσθετων πλεγματικών σημείων στο κέντρο ή στις έδρες της μοναδιαίας κυψελίδας), τότε ο συνολικός αριθμός διακριτών πλεγμάτων ανέρχεται σε 14. Τα πλέγματα αυτά, γνωστά ως **πλέγματα Bravais** (*Bravais lattices*), αποτελούν την θεμελιώδη βάση της κρυσταλλογραφικής γεωμετρίας (**Πίνακας 1-3** & **Εικόνα 1-14**) (Giacovazzo et al., 1992; Chang & Thoman, 2021).

Πίνακας 1-3. Τα δεκατέσσερα πλέγματα Bravais (Πηγή: Pierret, 2003).

Κρυσταλλικό Σύστημα	Πλέγμα Bravais	Σχέσεις μεταξύ πλευρών και γωνιών
Τρικλινές	Απλό (P)	$a \neq b \neq c$ & $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
Μονοκλινές	Απλό (P)	$a \neq b \neq c$ & $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
	Μονοεδρικά Κεντρωμένο (C)	
Ορθορομβικό	Απλό (P)	$a \neq b \neq c$ & $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Μονοεδρικά Κεντρωμένο (C)	
	Ενδοκεντρωμένο (I)	
Εξαγωνικό	Ολοεδρικά Κεντρωμένο (F)	$a = b \neq c$ & $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
	Απλό (P)	
Τετραγωνικό	Απλό (P)	$a = b \neq c$ & $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Ενδοκεντρωμένο (I)	
Ρομβοεδρικό ή Τριγωνικό	Απλό (P, R)	$a = b = c$ & $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
	Απλό (P)	
Κυβικό	Ενδοκεντρωμένο (I)	$a = b = c$ & $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Ολοεδρικά Κεντρωμένο (F)	



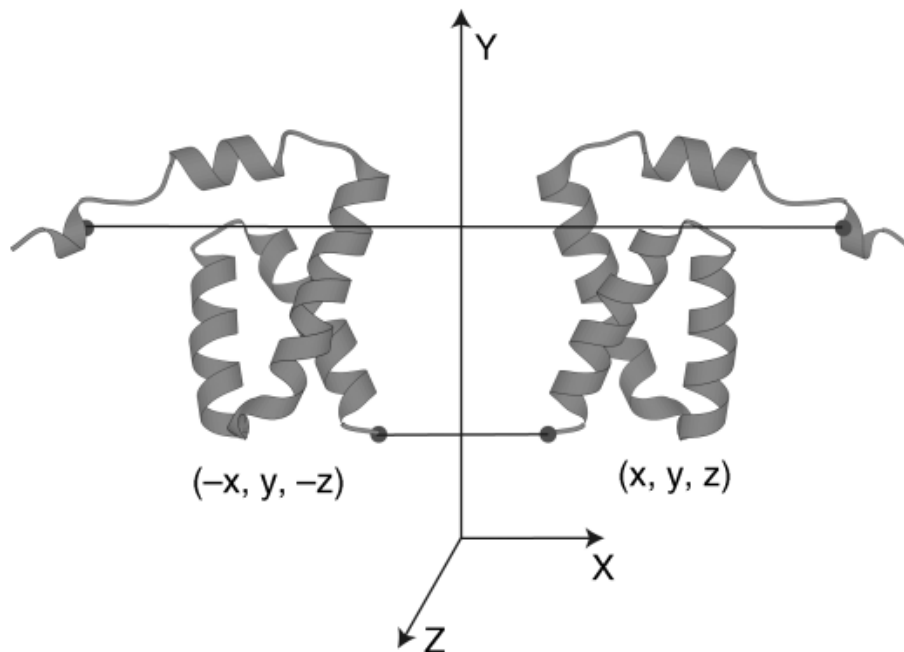
Εικόνα 1-14. Τα δεκατέσσερα τρισδιάστατα πλέγματα Bravais (Πηγή: Giacovazzo et al., 1992).

Η λογική της ταξινόμησης είναι η εξής, το σχήμα της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζεται πρωτίστως από το κρυσταλλικό σύστημα, που ορίζει τις σχέσεις πλευρών και γωνιών, και δευτερευόντως από τον τύπο κέντρωσης, δηλαδή τη θέση των πλεγματικών σημείων μέσα στην κυψελίδα. Αν και ο θεωρητικός συνδυασμός επτά κρυσταλλικών συστημάτων με επτά τύπους κέντρωσης θα έδινε 49 πιθανές μορφές πλεγμάτων, στην πράξη οι περιορισμοί συμμετρίας επιτρέπουν μόνο 14 δυνατούς συνδυασμούς. Αυτοί περιγράφουν όλους τους δυνατούς τρόπους με τους οποίους μπορεί να γεμίσει ο χώρος με την επαναλαμβανόμενη μετατόπιση μιας μοναδιαίας κυψελίδας χωρίς κενά ή επικαλύψεις.

Η πλήρης περιγραφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας απαιτεί να είναι γνωστές οι πλεγματικές σταθερές καθώς και το αντίστοιχο πλέγμα Bravais. Με αυτά τα δεδομένα, η γεωμετρία ολόκληρου του κρυστάλλου μπορεί να περιγραφεί και επομένως να αναπαραχθεί απλώς με επαναλαμβανόμενη μεταφορά της μοναδιαίας κυψελίδας στις τρεις διαστάσεις του χώρου.

1.3.3. Διεργασίες συμμετρίας, Ομάδες συμμετρίας σημείου & Ομάδες συμμετρίας χώρου

Η μελέτη της εσωτερικής δομής των κρυστάλλων βασίζεται στην έννοια της συμμετρίας. Ως **διεργασία συμμετρίας** (*symmetry operation*) ορίζεται η διαδικασία η οποία, όταν εφαρμοστεί σε ένα αντικείμενο, το φέρνει σε μία κατάσταση πανομοιότυπη με την αρχική του, χωρίς να μεταβληθεί η σχετική διάταξη των σημείων του. Κάθε διεργασία συμμετρίας εφαρμόζεται σε σχέση με ένα **στοιχείο συμμετρίας** (*symmetry element*), το οποίο μπορεί να είναι ένα σημείο (κέντρο συμμετρίας), μια ευθεία (άξονας συμμετρίας) ή ένα επίπεδο (επίπεδο συμμετρίας).



Εικόνα 1-15. Ένας άξονας περιστροφής 180 μοιρών κατά μήκος του άξονα y συσχετίζει δύο πανομοιότυπα μόρια πρωτεΐνης, δημιουργώντας πανομοιότυπες θέσεις (Πηγή: McPherson, 2008).

Ανάλογα με το αποτέλεσμα που παράγουν, οι διεργασίες συμμετρίας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- **Ευθέως ισοδύναμες**, οι οποίες δημιουργούν αντικείμενα που είναι ακριβώς όμοια και ταυτίζονται με το αρχικό. Περιλαμβάνουν:
 1. **Μετατόπιση** (*translation*): όλα τα σημεία μετακινούνται κατά ίση απόσταση και προς την ίδια κατεύθυνση.
 2. **Περιστροφή** (*rotation*): το αντικείμενο περιστρέφεται γύρω από άξονα κατά γωνία $2\pi/n$, όπου $n=1, 2, 3, 4$ ή 6 (Εικόνα 1-15).
 3. **Στροφομετατόπιση** (*rototranslation*) ή **κοχλίωση** (*screw*): ο συνδυασμός των δύο παραπάνω, δηλαδή περιστροφή γύρω από έναν άξονα και μετατόπιση κατά μήκος του.
- **Αντιθέτως ισοδύναμες**, οι οποίες δημιουργούν αντικείμενα που είναι εναντιόμορφα του αρχικού, δηλαδή κατοπτρικά είδωλά του. Περιλαμβάνουν:
 4. **Αναστροφή** (*inversion*) ως προς ένα σημείο αναφοράς.
 5. **Κατοπτρισμός** (*reflection*) ως προς ένα επίπεδο.
 6. **Στροφοαναστροφή** (*rotoinversion*), δηλαδή ο συνδυασμός της περιστροφής γύρω από έναν άξονα και της αναστροφής ως προς ένα σημείο του άξονα.
 7. **Ολίσθηση** (*glide*), δηλαδή κατοπτρισμός και μετατόπιση ως προς το επίπεδο κατοπτρισμού.
 8. **Στροφοκατοπτρισμός** (*rotoreflexion*), δηλαδή ο συνδυασμός της περιστροφής γύρω από έναν άξονα και του κατοπτρισμού ως προς ένα επίπεδο το οποίο είναι κάθετο στον άξονα.

Η ύπαρξη διεργασιών συμμετρίας στους κρυστάλλους περιορίζεται από την τρισδιάστατη γεωμετρία τους, και πιο συγκεκριμένα, οι γωνίες περιστροφής επιτρέπεται να είναι μόνο 180° , 120° και 60° , που αντιστοιχούν σε άξονες τάξης $n=2, 3, 4$ και 6 αντίστοιχα (Cullity, 1956; Rupp, 2010; Γλυκός, 2015).

Πίνακας 1-4. Ομάδες συμμετρίας χώρου που μπορούν να χαρακτηρίσουν την συμμετρία πρωτεϊνικών κρυστάλλων (Πηγή: Rupp, 2010).

Κρυσταλλικό Σύστημα	Πλέγμα Bravais	Ομάδες Συμμετρίας Χώρου
Τρικλινές	Απλό (P)	P1

Μονοκλινές	Απλό (P)	$P2, P2_1$
	Μονοεδρικά Κεντρωμένο (C)	$C2$
Ορθορομβικό	Απλό (P)	$P222, P222_1, P2_12_12, P2_12_12_1$
	Μονοεδρικά Κεντρωμένο (C)	$C222, C222_1$
	Ενδοκεντρωμένο (I)	$I222, I2_12_12_1$
	Ολοεδρικά Κεντρωμένο (F)	$F222$
Εξαγωνικό	Απλό (P)	$P6, P6_1, P6_5, P6_2, P6_4, P6_3, P622, P6_122, P6_522, P6_222, P6_422, P6_322,$
Τετραγωνικό	Απλό (P)	$P4, P4_1, P4_2, P4_3, P422, P4_212, P4_122, P4_12_12, P4_222, P4_22_12, P4_322, P4_32_12$
	Ενδοκεντρωμένο (I)	$I4, I4_1, I422, I4_122$
Ρομβοεδρικό ή Τριγωνικό	Απλό (P, R)	$P3, P3_1, P3_2, R3, P312, P321, P3_112, P3_121, P3_212, P3_221, R32$
	Απλό (P)	$P23, P2_13, P432, P4_232, P4_332, P4_132$
Κυβικό	Ενδοκεντρωμένο (I)	$I23, I2_13, I432, I4_132$
	Ολοεδρικά Κεντρωμένο (F)	$F23, F432, F4_132$

Στους κρυστάλλους, μπορούν να συνυπάρχουν περισσότερα από ένα στοιχεία συμμετρίας. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι όλοι οι συνδυασμοί επιτρεπτοί. Επιτρέπονται μόνο εκείνοι που, όταν εφαρμοστούν, αφήνουν τουλάχιστον ένα σημείο του χώρου αμετάβλητο και δεν περιλαμβάνουν καθαρή μετατόπιση ολόκληρης της δομής. Το πλήρες σύνολο αυτών των επιτρεπτών συνδυασμών στοιχείων συμμετρίας ονομάζεται **ομάδα συμμετρίας σημείου** (*point group*). Μαθηματικά, τα point groups αποτελούν κλειστές ομάδες, δηλαδή η διαδοχική εφαρμογή δύο διεργασιών συμμετρίας οδηγεί σε μια νέα διεργασία που επίσης ανήκει στην ίδια ομάδα. Συνολικά, υπάρχουν 32 point groups, κατανεμημένα έτσι ώστε να καλύπτουν όλα τα πιθανά στοιχεία συμμετρίας που μπορούν να εμφανιστούν στα επτά κρυσταλλικά συστήματα (Cullity, 1956; Giacovazzo et al., 1992; Rupp, 2010).

Επειδή οι πρωτεΐνες είναι **χειρόμορφα μόρια** (*chirality*), δηλαδή δεν ταυτίζονται με το κατοπτρικό τους είδωλο, δεν μπορούν να εμφανιστούν διεργασίες συμμετρίας που δημιουργούν αντιθέτως ισοδύναμα αντικείμενα, όπως ο κατοπτρισμός ή η αναστροφή. Σημαντική έννοια εδώ είναι η **ασύμμετρη μονάδα** (*asymmetric unit*). Πρόκειται για το μικρότερο τμήμα της μοναδιαίας κυψελίδας που, μέσω των διεργασιών συμμετρίας του point group, μπορεί να αναπαράγει ολόκληρη την μοναδιαία κυψελίδα. Με άλλα λόγια, αν είναι γνωστή η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας και οι διεργασίες συμμετρίας που εφαρμόζονται, είναι εφικτή η πλήρης αναδόμηση ολόκληρου του κρυστάλλου. Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι στις βάσεις δεδομένων που κατατίθενται επιλυμένες δομές μέσω της κρυσταλλογραφίας, όπως είναι η Protein Data Bank (PDB), αποθηκεύονται οι συντεταγμένες μόνο της ασύμμετρης μονάδας, μαζί με την περιγραφή της συμμετρίας που θα την αναπαράγει στον χώρο.

Ενώ τα point groups περιγράφουν την τοπική συμμετρία ενός κρυστάλλου, η πλήρης περιγραφή της συμμετρίας απαιτεί να ληφθεί υπόψιν και η τρισδιάστατη περιοδικότητα της δομής. Ο συνδυασμός των point groups και των πλεγμάτων Bravais οδηγεί στον ορισμό των **ομάδων συμμετρίας χώρου** (*space groups*). Ένα space group περιλαμβάνει το σύνολο όλων των διεργασιών συμμετρίας που αναπαράγουν την ασύμμετρη μονάδα σε όλο το τρισδιάστατο πλέγμα, χωρίς κενά ή επικαλύψεις. Ο συνδυασμός των 14 τύπων πλεγμάτων Bravais και των 32 point groups οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν ακριβώς 230 διαφορετικές space groups που καλύπτουν όλους τους δυνατούς τρόπους πλήρωσης του χώρου με μια επαναλαμβανόμενη μονάδα. Αυτές οι 230 περιπτώσεις εξαντλούν όλες τις γεωμετρικά δυνατές συνδυαστικές συμμετρίες (Giacovazzo et al., 1992; Γλυκός, 2015; Rupp, 2010). Ωστόσο, για τους

πρωτεϊνικούς κρυστάλλους επιτρέπονται μόνο τα space groups που δεν περιλαμβάνουν συμμετρίες που παράγουν εναντιόμορφα μόρια. Έτσι, από τα 230 μόνο 65 space groups παρατηρούνται σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους (Πίνακας 1-4).

Ο διεθνής συμβολισμός των space groups ακολουθεί τη σημειογραφία Hermann–Mauguin (Hermann, 1928; Mauguin, 1931). Σε αυτήν, το πρώτο κεφαλαίο γράμμα δηλώνει τον τύπο πλέγματος Bravais και ακολουθούν ένας έως τρεις χαρακτήρες που περιγράφουν τους κύριους άξονες συμμετρίας, βίδες ή επίπεδα ολίσθησης. Για παράδειγμα, το space group $P2_12_12_1$, υποδηλώνει απλό πλέγμα με τρεις άξονες βίδας δεύτερης τάξεως, ενώ το space group $C2$ υποδηλώνει πλευρικά κεντρωμένο πλέγμα με έναν άξονα περιστροφής δεύτερης τάξεως.

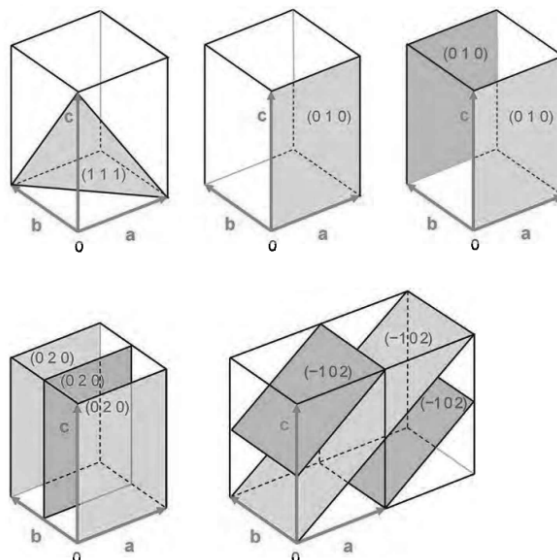
1.3.4. Κρυσταλλογραφικά επίπεδα & Δείκτες Miller

Τα **κρυσταλλογραφικά επίπεδα** (*crystallographic planes*) είναι νοητές, επίπεδες επιφάνειες, οι οποίες περνούν από πλεγματικά σημεία του κρυστάλλου και εκτείνονται άπειρα μέσα σε αυτόν (Εικόνα 1-16). Χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την διεύθυνση των ατόμων ή μορίων σε σχέση με τους άξονες της μοναδιαίας κυψελίδας. Για τον καθορισμό τους χρησιμοποιείται ένα σύστημα τριών ακέραιων αριθμών, οι **δείκτες Miller** (*Miller indices*), που ονομάστηκαν έτσι προς τιμήν του Βρετανού ορυκτολόγου William Miller (1801-1880), και συμβολίζονται ως (hkl).

Ο υπολογισμός των δεικτών Miller βασίζεται στις τομές των κρυσταλλογραφικών επιπέδων με τους άξονες a , b και c . Αν οι αποστάσεις αυτών των τομών από την αρχή των αξόνων είναι x , y και z αντίστοιχα, τότε οι δείκτες δίνονται από τις σχέσεις:

$$h = \frac{a}{x}, \quad k = \frac{b}{y}, \quad l = \frac{c}{z}$$

Οι τιμές αυτές μετατρέπονται στους μικρότερους δυνατούς ακέραιους αριθμούς, οι οποίοι να διατηρούν την αναλογία των δεικτών, καθώς οι δείκτες μπορούν να έχουν μόνο ακέραιες τιμές. Αν ένα κρυσταλλογραφικό επίπεδο είναι παράλληλο σε έναν άξονα, τότε η τομή του με αυτόν θεωρείται το άπειρο και ο αντίστοιχος δείκτης παίρνει την τιμή 0. Παραδείγματος χάρη, το επίπεδο (110) τέμνει τους άξονες a και b , αλλά είναι παράλληλο στον άξονα c .



Εικόνα 1-16. Διάφορες οικογένειες κρυσταλλογραφικών επιπέδων στον τρισδιάστατο χώρο (Πηγή: Rupp, 2010).

Πίνακας 1-5. Οι εξισώσεις Miller που υπολογίζουν τις αποστάσεις μεταξύ κρυσταλλογραφικών επιπέδων της ίδιας οικογένειας για κάθε κρυσταλλικό σύστημα (Πηγή: McPherson, 2008).

Κρυσταλλικό Σύστημα	Εξισώσεις Miller
Κυβικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2}$
Τετραγωνικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Ορθορομβικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Εξαγωνικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4(h^2 + hk + k^2)}{3a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Τριγωνικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4(h^2 + hk + k^2)}{3a^2} + \frac{l^2}{c^2}$
Ρομβοεδρικό	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{(1 + \cos \gamma)[(h^2 + k^2 + l^2) - (1 - \tan^2 \gamma/2)(hk + kl + hl)]}{a^2(1 + \cos \gamma - 2\cos^2 \gamma)}$
Μονοκλινές	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2(\sin^2 \beta)} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2(\sin^2 \beta)} - \frac{2hl(\cos \beta)}{ac(\sin^2 \beta)}$
Τρικλινές	$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{b^2 c^2 (\sin^2 \alpha) h^2 + a^2 c^2 (\sin^2 \beta) k^2 + a^2 b^2 (\sin^2 \gamma) l^2}{V^2} + \frac{2abc^2[(\cos \alpha)(\cos \beta) - \cos \gamma]hk + 2a^2 bc[(\cos \beta)(\cos \gamma) - \cos \alpha]kl + 2ab^2 c[(\cos \gamma)(\cos \alpha) - \cos \beta]lh}{V^2}$

Υπάρχουν τρία θεμελιώδη κρυσταλλογραφικά επίπεδα, τα (100), (010) και (001), τα οποία αντιστοιχούν στις έδρες A, B και C της μοναδιαίας κυψελίδας, είναι κάθετα στους άξονες a, b και c και ορίζονται από τους άλλους δύο άξονες αντίστοιχα και σε κάθε περίπτωση. Οι αρνητικοί δείκτες Miller δηλώνονται με μια παύλα πάνω από τον αριθμό και χρησιμοποιούνται για να δείξουν ότι το κρυσταλλογραφικό επίπεδο τέμνει τον άξονα στην αρνητική κατεύθυνση. Παραδείγματος χάρη, το κρυσταλλογραφικό επίπεδο με δείκτες Miller ($\bar{1}01$) σημαίνει ότι τέμνει τον άξονα a στην αρνητική κατεύθυνση, τον άξονα b στο άπειρο, δηλαδή είναι παράλληλο ως προς αυτόν, και τον άξονα c στην θετική πλευρά.

Τα επίπεδα με ίδιους δείκτες Miller σχηματίζουν μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων. Τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα της ίδιας οικογένειας είναι μεταξύ τους παράλληλα και ισαπέχοντα, με την απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών επιπέδων να συμβολίζεται ως d_{hkl} . Η τιμή της απόστασης d_{hkl} εξαρτάται από το κρυσταλλικό σύστημα και τις πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας (**Πίνακας 1-5**).

Συμβολικά, το {hkl} αναφέρεται σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, ενώ το {hkl} χρησιμοποιείται για να δηλώσει μια οικογένεια. Για τις κρυσταλλογραφικές διευθύνσεις χρησιμοποιείται ο συμβολισμός [hkl] (Cullity, 1956; Rupp, 2010; Chang & Thoman, 2021).

1.4. Περίθλαση ακτίνων-X

Η **περίθλαση** (*diffraction*) είναι ένα φυσικό φαινόμενο που προκύπτει όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με περιοδικά διατεταγμένα εμπόδια ή ανοίγματα, με αποτέλεσμα την διάδοσή της προς νέες κατευθύνσεις. Το φαινόμενο αυτό δεν μπορεί να ερμηνευθεί μόνο ως απλή σκέδαση, αλλά αποτελεί συνέπεια της συμβολής των κυμάτων που διασκορπίζονται. Όταν δύο ή περισσότερα κύματα συνδυάζονται, τα πλάτη τους μπορεί να προστεθούν (ενισχυτική συμβολή) ή να αλληλοαναιρεθούν (αποσβεστική συμβολή).

Στην περίπτωση των κρυστάλλων, όπου η ύλη διαθέτει τρισδιάστατη περιοδική διάταξη, η περίθλαση ακτίνων-X αξιοποιείται ως μέθοδος για την μελέτη της εσωτερικής δομής. Καθώς οι ακτίνες-X

διέρχονται μέσα από τον κρύσταλλο, αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια των ατόμων. Κάθε άτομο λειτουργεί ως κέντρο σκέδασης και εκπέμπει σφαιρικά κύματα προς όλες τις κατευθύνσεις. Η υπέρθεση των κυμάτων από όλα τα άτομα οδηγεί σε εκτεταμένη συμβολή.

Η ανάλυση των μοτίβων αυτών καθιστά δυνατή την ανασύσταση της εσωτερικής ατομικής διάταξης του κρυστάλλου στις τρεις διαστάσεις. Έτσι, η περίθλαση ακτίνων-Χ αποτελεί έναν από τους θεμελιώδεις πειραματικούς τρόπους προσδιορισμού της δομής της ύλης, παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για τις θέσεις, τις αποστάσεις και τις αλληλεπιδράσεις των ατόμων.

1.4.1. Κυματική θεωρία & Συμβολή κυμάτων

Η κυματική θεωρία περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα διαδίδονται και αλληλεπιδρούν. Ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα μπορεί να θεωρηθεί ότι ταξιδεύει με την μορφή ημιτονικής ή συνημιτονικής συνάρτησης, με χαρακτηριστικά μεγέθη το πλάτος A , το μήκος κύματος λ και την συχνότητα $\nu = \frac{c}{\lambda}$, όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός.

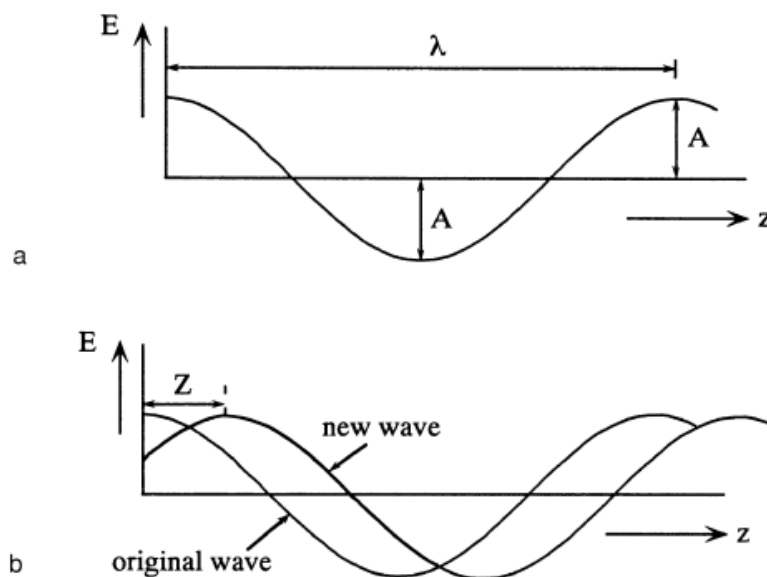
Η στιγμιαία τιμή του ηλεκτρικού πεδίου σε ένα σημείο z τη χρονική στιγμή t περιγράφεται από την σχέση:

$$E(t, z) = A \cos\left(2\pi\nu t - \frac{2\pi}{\lambda} z\right)$$

Η μορφή αυτή δείχνει ότι το κύμα επαναλαμβάνεται περιοδικά τόσο στον χώρο όσο και στον χρόνο. Όταν δύο κύματα με ίδιο μήκος κύματος και πλάτος φτάνουν στο ίδιο σημείο, η υπέρθεσή τους μπορεί να περιγραφεί με μια απλή μετατόπιση φάσης. Αν το δεύτερο κύμα είναι μετατοπισμένο κατά απόσταση Z , τότε εισάγεται μια γωνία φάσης $\alpha = \frac{2\pi Z}{\lambda}$ (Εικόνα 1-17). Έτσι, η συνάρτηση του νέου κύματος γίνεται:

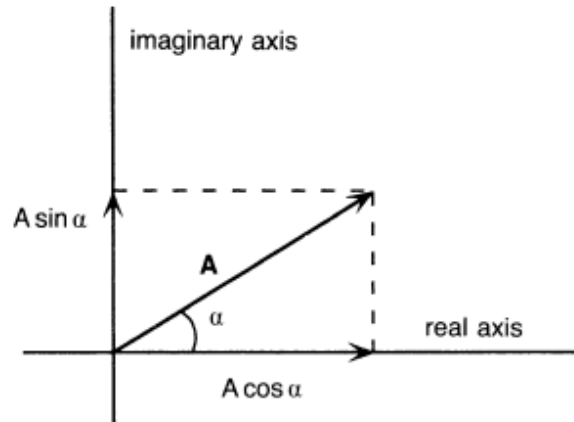
$$E_{new}(t) = A \cos(\omega t + \alpha)$$

Η παρουσία της φάσης α δείχνει ότι κάθε κύμα μπορεί να εκφραστεί ως συνδυασμός δύο συνιστωσών, μια συνημιτονικής και ($A\cos\alpha$) και μιας ημιτονικής ($A\sin\alpha$), οι οποίες βρίσκονται μεταξύ τους σε ορθή γωνία. Αυτή η διάσπαση επιτρέπει την γεωμετρική αναπαράσταση του κύματος σε ένα επίπεδο με δύο άξονες, στο οποίο το πραγματικό μέρος (*real axis*) αντιστοιχεί στην συνιστώσα $A\cos\alpha$, ενώ το φανταστικό μέρος (*imaginary axis*) αντιστοιχεί στην συνιστώσα $A\sin\alpha$ (Εικόνα 1-18).



Εικόνα 1-17. Απεικόνιση του ηλεκτρικού πεδίου ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος (a) και προσθήκη δεύτερου κύματος μετατοπισμένου κατά απόσταση Z (b) (Πηγή: Drenth, 2007).

Η πρόσθεση κυμάτων με διαφορετικές φάσεις απλοποιείται σημαντικά όταν τα διανύσματα που αντιστοιχούν στα κύματα αθροίζονται όπως τα γεωμετρικά διανύσματα. Το τελικό κύμα προκύπτει από το άθροισμα όλων των πραγματικών και φανταστικών συνιστωσών. Με αυτόν τον τρόπο, η πρόσθεση πολλών κυμάτων μετατρέπεται σε πρόβλημα διανυσματικής άλγεβρας.



Εικόνα 1-18. Η πραγματική συνιστώσα $A \cos \alpha$ και η φανταστική συνιστώσα $A \sin \alpha$ του κύματος A (Πηγή: Drenth, 2007).

Μια περαιτέρω απλοποίηση δίνεται μέσω της εκθετικής μορφής. Κάθε κύμα μπορεί να γραφεί ως:

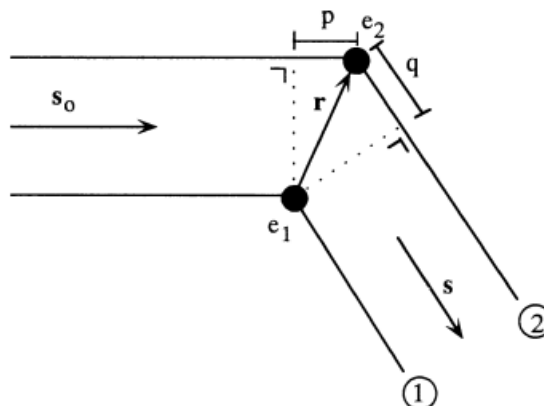
$$A \cos \alpha + iA \sin \alpha = Ae^{i\alpha}$$

όπου i είναι η φανταστική μονάδα. Η έκφραση αυτή επιτρέπει την χρήση των ιδιοτήτων των εκθετικών συναρτήσεων για την εύκολη περιγραφή των κυμάτων.

Η κυματική θεωρία παρέχει ένα ισχυρό μαθηματικό εργαλείο για την περιγραφή και την πρόσθεση κυμάτων. Η χρήση της αναπαράστασης σε πραγματικό και φανταστικό άξονα και η μετάβαση στην εκθετική μορφή απλοποιούν σημαντικά τον υπολογισμό της συνισταμένης πολλών κυμάτων με διαφορετικές φάσεις, διευκολύνοντας την ανάλυση του φαινομένου της συμβολής (Drenth, 2007; Rupp, 2010).

1.4.2. Σκέδαση από σύστημα δύο ηλεκτρονίων

Η μελέτη της σκέδασης ακτίνων-X μπορεί να ξεκινήσει από ένα απλό παράδειγμα συστήματος με δύο ηλεκτρόνια. Έστω ότι το πρώτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται στην θέση e_1 , ενώ το δεύτερο στην θέση e_2 απέχει απόσταση r σε σχέση με το πρώτο. Μια δέσμη ακτίνων-X με διάνυσμα κύματος s_0 προσπίπτει στο σύστημα και διαχέεται προς κατεύθυνση s , όπου τα διανύσματα s_0 και s έχουν μέτρο $1/\lambda$ (**Εικόνα 1-19**).



Εικόνα 1-19. Σύστημα δύο ηλεκτρονίων (e_1 και e_2) και διαφορά δρόμου $(p + q)$ μεταξύ των σκεδαζόμενων κυμάτων τους (Πηγή: Drenth, 2007).

Η δέσμη που σκεδάζεται από το ηλεκτρόνιο e_2 διανύει μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με εκείνη που σκεδάζεται από το e_1 . Η διαφορά μήκους διαδρομής είναι:

$$p + q = \lambda r \cdot (s_0 - s)$$

με αποτέλεσμα να προκύπτει και διαφορά φάσης μεταξύ των δύο κυμάτων. Η φάση του κύματος από το δεύτερο ηλεκτρόνιο είναι καθυστερημένη κατά

$$\Delta\varphi = 2\pi r \cdot S$$

όπου S το διάνυσμα σκέδασης που ορίζεται ως:

$$S = s - s_0$$

Το διάνυσμα S έχει ιδιαίτερη φυσική σημασία καθώς είναι κάθετο στο επίπεδο που μπορεί να θεωρηθεί ως το ανακλαστικό επίπεδο και η κατεύθυνση του συνδέεται άμεσα με την γωνία σκέδασης.

Για να περιγραφεί μαθηματικά το σύστημα, κάθε κύμα αναπαρίσταται στην μιγαδική μορφή $e^{i\varphi}$. Έτσι, τα δύο κύματα με πλάτος ίσο με τη μονάδα γράφονται ως:

$$T = e^{2\pi i R \cdot S} [1 + e^{2\pi i (r+R) \cdot S}]$$

όπου R είναι το διάνυσμα μετατόπισης της νέας αρχής. Σημαντικό είναι ότι αυτή η μεταφορά δεν αλλάζει το μέτρο του T , επομένως η ένταση, δηλαδή το μέγεθος του φαινομένου σκέδασης, παραμένει αμετάβλητη.

Το απλό σύστημα δύο ηλεκτρονίων δείχνει πως η διαφορά φάσης λόγω της απόστασης μεταξύ των σκεδαζόντων σωμάτων καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα της συμβολής. Η ανάλυση αυτή αποτελεί την βάση για πιο πολύπλοκα συστήματα, όπως ένα άτομο, ένα σύνολο ατόμων σε μια μοναδιαία κυψελίδα και τελικά ένας ολόκληρος κρύσταλλος (Drenth, 2007).

1.4.3. Σκέδαση από ένα άτομο

Η σκέδαση ακτίνων-Χ από ένα άτομο προκύπτει από την αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας δέσμης με το ηλεκτρονιακό νέφος του ατόμου. Καθώς τα ηλεκτρόνια είναι οι σκεδαστές, η ένταση και η φάση του σκεδαζόμενου κύματος εξαρτώνται από τον αριθμό ηλεκτρονίων και την κατανομή τους γύρω από τον πυρήνα.

Η **ηλεκτρονιακή πυκνότητα** (*electron density*) σε ένα σημείο r συμβολίζεται ως $\rho(r)$. Λόγω κεντροσυμμετρίας του ηλεκτρονιακού νέφους ισχύει $\rho(r) = \rho(-r)$. Το συνολικό σκεδαζόμενο κύμα από το άτομο περιγράφεται μέσω του **ατομικού παράγοντα σκέδασης** f (*atomic scattering factor*), ο οποίος ορίζεται από το ολοκλήρωμα:

$$f = \int \rho(r) e^{2\pi i r \cdot S} dr$$

όπου S είναι το διάνυσμα σκέδασης. Λαμβάνοντας υπόψη την κεντροσυμμετρία, το ολοκλήρωμα απλοποιείται:

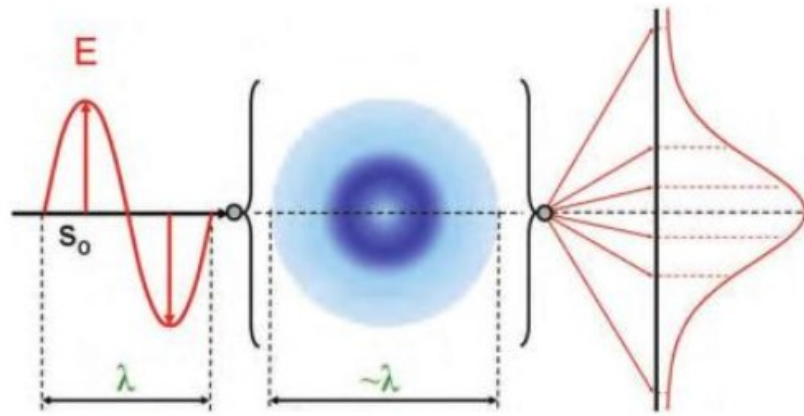
$$f = 2 \int \rho(r) \cos(2\pi r \cdot S) dr$$

Αυτό δείχνει ότι το σκεδαζόμενο κύμα είναι πάντοτε πραγματικό και επομένως η διεύθυνση του διανύσματος βρίσκεται στον πραγματικό άξονα (**Εικόνα 1-20**).

Στην κρυσταλλογραφική ανάλυση, γίνεται συχνά η παραδοχή ότι το ηλεκτρονιακό νέφος είναι όχι μόνο κεντροσυμμετρικό αλλά και σφαιρικά συμμετρικό. Έτσι ο ατομικός παράγοντας σκέδασης f εξαρτάται μόνο από το μέτρο του διανύσματος σκέδασης $|S|$ και όχι από την κατεύθυνσή του. Η σχέση είναι:

$$|S| = \frac{2 \sin \theta}{\lambda}$$

όπου θ είναι η γωνία σκέδασης και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.



Εικόνα 1-20. Σκέδαση από ένα άτομο. Δεξιά φαίνεται το σχήμα της συνάρτησης της ατομικής σκέδασης (Πηγή: Rupp, 2010).

Η φυσική σημασία του f είναι ότι εκφράζει πόσο ισχυρά σκεδάζει ένα άτομο τις ακτίνες-X. Για $\theta=0$, ο παράγοντας σκέδασης ισούται με τον αριθμό των ηλεκτρονίων του ατόμου. Σε μεγαλύτερες γωνίες, η τιμή του f μειώνεται καθώς οι επιμέρους συνεισφορές των ηλεκτρονίων ακυρώνονται μερικώς λόγω διαφορών στην φάση.

Η σκέδαση από ένα άτομο εξαρτάται αποκλειστικά από τη χωρική κατανομή του ηλεκτρονιακού του νέφους. Ο ατομικός παράγοντας σκέδασης f παρέχει το μέτρο αυτής της συνεισφοράς και αποτελεί το θεμέλιο για την κατανόηση πιο σύνθετων συστημάτων, όπως η μοναδιαία κυψελίδα (Drenth, 2007; Rupp, 2010).

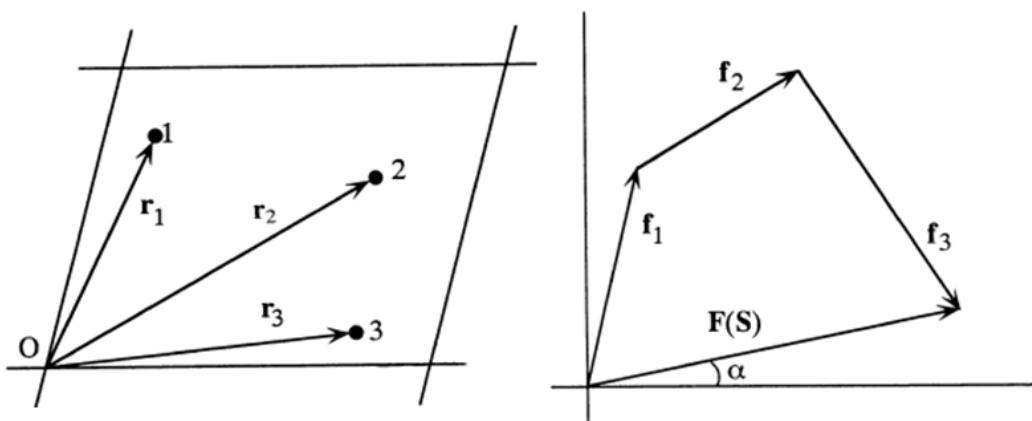
1.4.4. Σκέδαση από μία μοναδιαία κυψελίδα

Η μοναδιαία κυψελίδα αποτελεί το βασικό δομικό ενός κρυστάλλου και περιέχει n άτομα, το καθένα σε θέση r_j ($j = 1, 2, \dots, n$) σε σχέση με την αρχή της κυψελίδας. Κάθε άτομο σκεδάζει την ακτινοβολία σύμφωνα με τον αντίστοιχο ατομικό παράγοντα σκέδασης f_j .

Αν θεωρηθεί ότι το σημείο αναφοράς είναι η αρχή της μοναδιαίας κυψελίδας, τότε το σκεδαζόμενο κύμα από το άτομο στην θέση r_j γράφεται ως:

$$f_j e^{(2\pi i r_j \cdot S)}$$

όπου S είναι το διάνυσμα σκέδασης. Ο εκθετικός όρος εκφράζει την διαφορά φάσης που προκύπτει λόγω της θέσης του ατόμου μέσα στην μοναδιαία κυψελίδα.



Εικόνα 1-21. Αριστερά: Μία μοναδιαία κυψελίδα με τρία άτομα στις θέσεις r_1 , r_2 , r_3 . Δεξιά: Ο παράγοντας δομής $F(S)$ ως άθροισμα της σκέδασης από τα άτομα της μοναδιαίας κυψελίδας (Πηγή: Drenth, 2007).

Η συνολική σκέδαση από όλα τα άτομα της μοναδιαίας κυψελίδας είναι το άθροισμα των επιμέρους συνεισφορών:

$$F(S) = \sum_{j=1}^n f_j e^{(2\pi i r_j \cdot S)}$$

Το μέγεθος αυτό ονομάζεται **παράγοντας δομής** (*structure factor*), καθώς εξαρτάται από την δομή δηλαδή την διάταξη των ατόμων στην μοναδιαία κυψελίδα (**Εικόνα 1-21**).

Η σημασία του παράγοντα δομής είναι θεμελιώδης στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, καθώς καθορίζει ποιες ανακλάσεις (hkl) εμφανίζονται στο διάγραμμα περίθλασης με μεγάλη ή μικρή ένταση. Η διάταξη των ατόμων μέσα στην μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενίσχυση είτε σε απόσβεση των σκεδαζόμενων κυμάτων λόγω συμβολής, και έτσι το πειραματικό μοτίβο περίθλασης περιέχει άμεση πληροφορία για την κρυσταλλική δομή.

Η σκέδαση από μια μοναδιαία κυψελίδα είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής συμβολής όλων των ατόμων που την αποτελούν. Ο παράγοντας δομής $F(S)$ αποτελεί το μαθηματικό εργαλείο με το οποίο συνδέεται η κατανομή των ατόμων με το παρατηρούμενο μοτίβο περίθλασης. Έτσι, από το επίπεδο του ατόμου γίνεται η μετάβαση σε μια πιο σύνθετη μονάδα, η οποία αποτελεί το θεμέλιο για την περιγραφή ολόκληρου του κρυστάλλου (Drenth, 2007; Rupp, 2010).

1.4.5. Σκέδαση από έναν κρύσταλλο

Ένας κρύσταλλος αποτελείται από ένα μεγάλο πλήθος μοναδιαίων κυψελίδων, οι οποίες επαναλαμβάνονται περιοδικά στον χώρο. Έστω ότι οι κυψελίδες επαναλαμβάνονται κατά μήκος τριών διανυσμάτων μετατόπισης a , b και c , και έχουν πλήθος n_1 , n_2 και n_3 σε κάθε ένα από αυτά τα διανύσματα αντίστοιχα. Για να περιγραφεί η σκέδαση από ολόκληρο τον κρύσταλλο πρέπει να αθροιστεί η συμβολή όλων των μοναδιαίων κυψελίδων.

Η συμβολή μιας κυψελίδας στην θέση $ua + vb + wc$, όπου u , v και w ακέραιοι αριθμοί, δίνεται από την σχέση:

$$F(S) e^{[2\pi i(ua \cdot S + vb \cdot S + wc \cdot S)]}$$

όπου $F(S)$ είναι ο παράγοντας δομής της μοναδιαίας κυψελίδας.

Η συνολική σκέδαση από τον κρύσταλλο προκύπτει από το γινόμενο του παράγοντα δομής με τρία γεωμετρικά αθροίσματα:

$$K(S) = F(S) \left(\sum_{u=0}^{n_1} e^{2\pi i u a \cdot S} \right) \left(\sum_{v=0}^{n_2} e^{2\pi i v b \cdot S} \right) \left(\sum_{w=0}^{n_3} e^{2\pi i w c \cdot S} \right)$$

Επειδή ο αριθμός των μοναδιαίων κυψελίδων είναι πολύ μεγάλος, τα αθροίσματα αυτά μηδενίζονται σχεδόν πάντα, εκτός εάν ισχύουν οι ειδικές συνθήκες:

$$a \cdot S = h, \quad b \cdot S = k, \quad c \cdot S = l$$

όπου h , k και l είναι ακέραιοι αριθμοί. Οι συνθήκες αυτές είναι γνωστές ως **συνθήκες Laue** (*Laue conditions*) και καθορίζουν ποιες κατευθύνσεις σκέδασης (ή σε αυτό το σημείο περίθλασης) είναι επιτρεπτές. Μόνο όταν ικανοποιούνται αυτές οι συνθήκες, οι περιθλούσες ακτίνες συμβάλλουν ενισχυτικά και παράγουν τις χαρακτηριστικές κηλίδες ή κορυφές στο μοτίβο περίθλασης. Η ένταση της περίθλασης σε αυτές τις διευθύνσεις είναι ανάλογη τόσο με το μέτρο του παράγοντα δομής $F(S)$ όσο και με τον αριθμό των μοναδιαίων κυψελίδων στον κρύσταλλο.

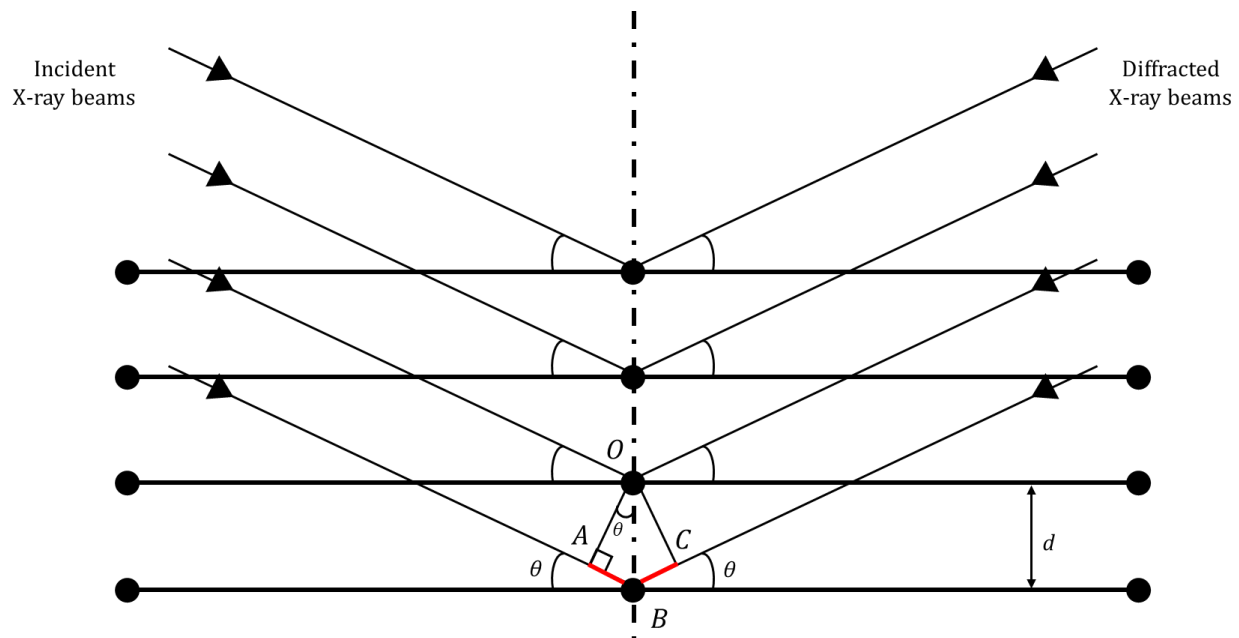
Ένας μεμονωμένος κρύσταλλος δεν περιθλά ομοιόμορφα τις ακτίνες X προς όλες τις κατευθύνσεις. Η περίθλαση συμβαίνει μόνο σε συγκεκριμένες διευθύνσεις που υπακούουν στις συνθήκες Laue, οι οποίες

συνδέονται άμεσα με την περιοδικότητα του κρυστάλλου. Η πειραματική καταγραφή αυτών των κατευθύνσεων αποτελεί τη βάση για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μέσω περίθλασης ακτίνων Χ.

1.4.6. Νόμος του Bragg

Η περίθλαση ακτίνων-Χ από έναν κρύσταλλο μπορεί να ερμηνευθεί ως ανακλάσεις από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του πλέγματος. Η περιγραφή αυτού του φαινομένου έγινε πιο συστηματική με το **Νόμο του Bragg** (*Bragg's Law*), που διατυπώθηκε το 1913 από τους W. L. Bragg και W. H. Bragg (Bragg & Bragg, 1913). Εξαιτίας της διεισδυτικής ικανότητας των ακτίνων-Χ η προσπίπτουσα ακτινοβολία μπορεί να αλληλεπιδράσει με άτομα σε διαδοχικές στοιβάδες. Η πρώτη στοιβάδα, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ένα κρυσταλλογραφικό επίπεδο μιας οικογένειας κρυσταλλογραφικών επιπέδων με δείκτες Miller (*hkl*), από το οποίο η δέσμη περιθλάται αφού έχει διανύσει λίγο μεγαλύτερο δρόμο. Για να υπάρξει ενισχυτική συμβολή των σκεδαζόμενων δεσμών ακτίνων-Χ, δηλαδή για να βρίσκονται τα κύματα σε φάση, πρέπει η διαφορά δρόμων τους να ισούται με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Έτσι προκύπτει η συνθήκη περίθλασης γνωστή και ως νόμος του Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$



Εικόνα 1-22. Σχηματική απεικόνιση περίθλασης ακτίνων-Χ από μία οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων.

Η παραπάνω συνθήκη μπορεί να αποδειχτεί και γεωμετρικά. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1-22**, η προσπίπτουσα δέσμη και περιθλούσα δέσμη του κατώτερου επιπέδου της εικόνας έχουν διανύσει μεγαλύτερη απόσταση από την προσπίπτουσα και την περιθλούσα δέσμη του άνωθεν επιπέδου. Για να ισχύει ότι θα υπάρχει ενισχυτική συμβολή από τις δέσμες, θα πρέπει η απόσταση αυτή να ισούται με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματός τους, δηλαδή:

$$n\lambda = AB + BC \quad (1.1)$$

Βάσει πυθαγορείου θεωρήματος:

Για το τρίγωνο OAB:

$$\sin \theta = \frac{AB}{OB} \quad (1.2)$$

Για το τρίγωνο OCB:

$$\sin \theta = \frac{BC}{OB} \quad (1.3)$$

Όμως όπως φαίνεται σχηματικά, η απόσταση OB ισούται με την κάθετη απόσταση μεταξύ των κρυσταλλογραφικών επιπέδων d_{hkl} . Επομένως οι **Σχέσεις (1.2) & (1.3)** μπορούν να ξαναγραφούν ως:

$$\sin \theta = \frac{AB}{d_{hkl}} \quad (1.2) \quad \sin \theta = \frac{BC}{d_{hkl}} \quad (1.3)$$

και αν λυθούν ως προς AB και BC:

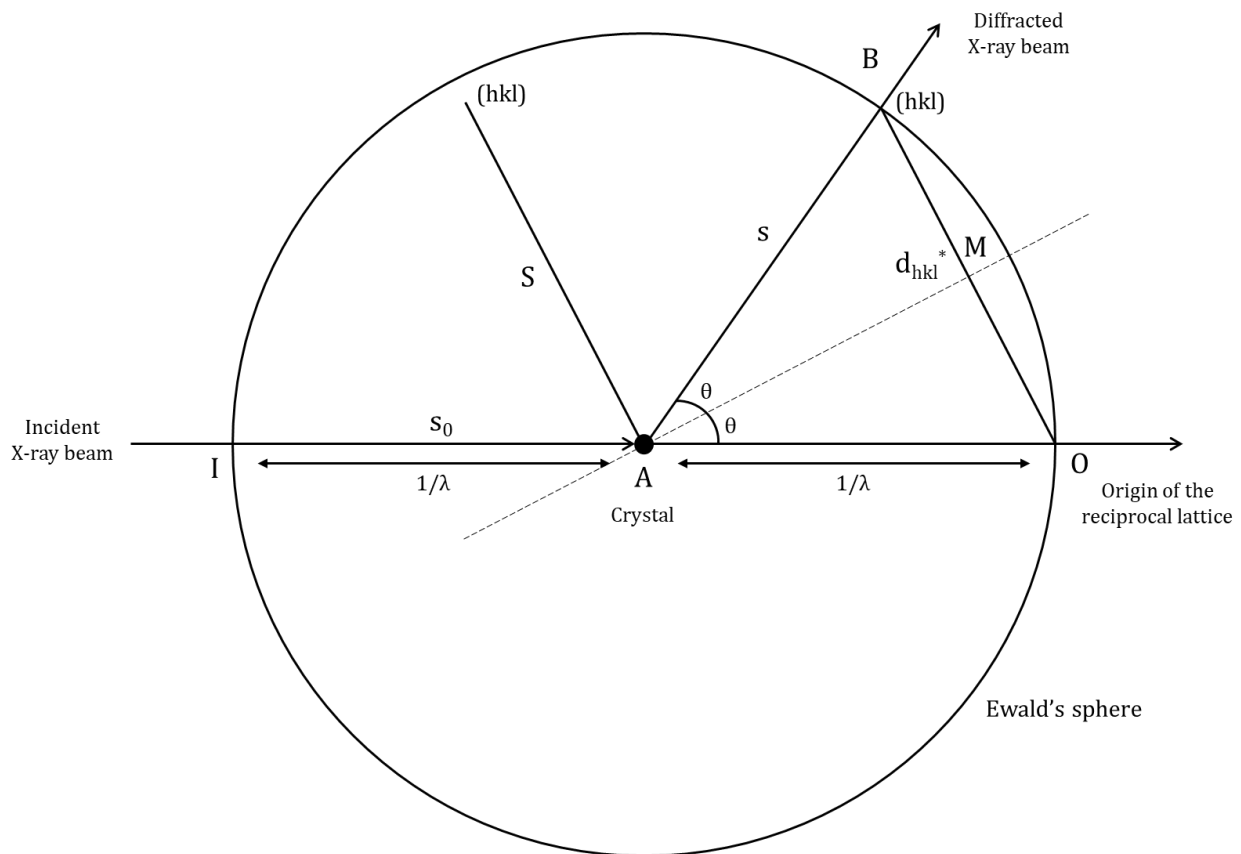
$$AB = d_{hkl} \sin \theta \quad (1.2) \quad BC = d_{hkl} \sin \theta \quad (1.3)$$

Αντικαθιστώντας στην **Σχέση (1.1)** τις **Σχέσεις (1.2) & (1.3)** προκύπτει:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

1.4.7. Αντίστροφος χώρος & Σφαίρα του Ewald

Ο **αντίστροφος χώρος** (*reciprocal space*) και η **σφαίρα του Ewald** (*Ewald's sphere*) αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα εργαλεία για την κατανόηση και ανάλυση της περίθλασης ακτίνων-X. Ο κρύσταλλος είναι ένα πραγματικό αντικείμενο με δομή που περιγράφεται στον τρισδιάστατο πραγματικό χώρο. Αντίθετα, ο αντίστροφος χώρος είναι μια αφηρημένη μαθηματική κατασκευή που διευκολύνει την περιγραφή των συνθηκών περίθλασης.



Εικόνα 1-23. Η σφαίρα του Ewald.

Η βασική ιδέα του αντίστροφου χώρου είναι ότι κάθε ανάκλαση που παρατηρείται σε ένα πείραμα περίθλασης αντιστοιχεί σε ένα σημείο με δείκτες Miller (hkl) του αντίστροφου χώρου. Το σύνολο των σημείων αυτών σχηματίζουν ένα κανονικό πλέγμα στον αντίστροφο χώρο, το οποίο κατασκευάζεται από τα διανύσματα a^* , b^* , c^* που είναι αντίστοιχα προς τα διανύσματα a , b , c του πραγματικού χώρου. Το κάθε διάνυσμα σκέδασης S μπορεί να γραφεί ως:

$$S = ha^* + kb^* + lc^*$$

Έτσι κάθε σημείο στο αντίστροφο πλέγμα αντιστοιχεί σε μία πιθανή ανάκλαση από μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων (hkl). Επίσης, ισχύει και ότι ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας στο αντίστροφο πλέγμα είναι το αντίστροφο του όγκου V της πραγματικής κυψελίδας, δηλαδή $V^* = \frac{1}{V}$.

Η σφαίρα του Ewald είναι ένα γεωμετρικό κατασκεύασμα που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των συνθηκών περίθλασης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1-23**, κέντρο της σφαίρας του Ewald θεωρείται ο κρύσταλλος, εν προκειμένω στο σημείο A, και η σφαίρα έχει ακτίνα ίση με $1/\lambda$, όπου λ το μήκος κύματος της δέσμης ακτίνων-X. Έστω ότι η δέσμη ξεκινά από το σημείο I και η προσπίπτουσα δέσμη χτυπά τον κρύσταλλο. Αυτή περιθλάται σε συγκεκριμένη γωνία 2θ και τέμνει την σφαίρα του Ewald στο σημείο B. Στο τρίγωνο AMO:

$$\sin \theta = \frac{OM}{AO} = \frac{OM}{\frac{1}{\lambda}} \Rightarrow OM = \frac{\sin \theta}{\lambda}$$

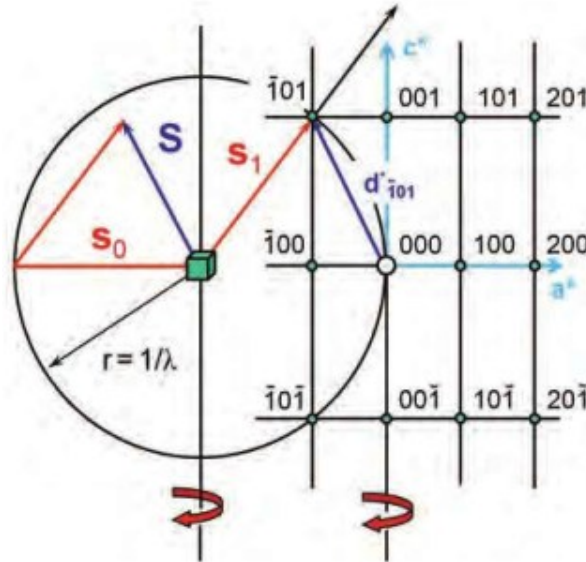
και στο τρίγωνο AMB:

$$\sin \theta = \frac{BM}{AB} = \frac{BM}{\frac{1}{\lambda}} \Rightarrow BM = \frac{\sin \theta}{\lambda}$$

Όμως:

$$OB = OM + MB = \frac{\sin \theta}{\lambda} + \frac{\sin \theta}{\lambda} = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} = |S| = d_{hkl}^* = \frac{1}{d_{hkl}} \Rightarrow \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta$$

Επομένως, η συνθήκη περίθλασης, δηλαδή ο νόμος του Bragg, ικανοποιείται μόνο όταν το σημείο του αντίστροφου πλέγματος, που αντιπροσωπεύει μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων (hkl), βρίσκεται στην περιφέρεια της σφαίρας του Ewald.



Εικόνα 1-24. Ο αντίστροφος χώρος και η σφαίρα του Ewald. Με την περιστροφή του κρυστάλλου περιστρέφεται και το αντίστροφο πλέγμα, φέρνοντας περισσότερα σημεία του να τέμνουν τη σφαίρα και να ικανοποιούν τις συνθήκες περίθλασης. (Πηγή: Rupp, 2010).

Σχηματικά, όλα τα σημεία του αντίστροφου πλέγματος που βρίσκονται στην επιφάνεια της σφαίρας του Ewald ικανοποιούν τον νόμο του Bragg και δίνουν σήμα περίθλασης. Παρ' όλα αυτά, μόνο λίγα από αυτά τα σημεία τέμνουν την επιφάνεια της σφαίρας για έναν δεδομένο προσανατολισμό του κρυστάλλου. Για τον λόγο αυτό, ο κρύσταλλος περιστρέφεται έτσι ώστε περισσότερα σημεία του αντίστροφου

πλέγματος να τέμνουν την σφαίρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού σημείων περίθλασης (**Εικόνα 1-24**).

1.4.8. Υπολογισμός της ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο παράγοντας δομής εξαρτάται από την κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην μοναδιαία κυψελίδα

$$F(S) = \sum_j f_j e^{(2\pi i r_j \cdot S)}$$

όπου το άθροισμα εκτείνεται σε όλα τα άτομα της κυψελίδας. Αντί να αθροιστούν ξεχωριστά, μπορούν να ολοκληρωθούν για όλη την ηλεκτρονιακή πυκνότητα $\rho(r)$ της κυψελίδας:

$$F(S) = \int_{cell} \rho(r) e^{(2\pi i r \cdot S)} dr$$

Επιλέγοντας κλασματικές συντεταγμένες x, y, z για την μοναδιαία κυψελίδα, η σχέση παίρνει την μορφή:

$$F(hkl) = V \int_0^1 \int_0^1 \int_0^1 \rho(x, y, z) e^{[2\pi i(hx+ky+lz)]} dx dy dz$$

όπου V είναι ο όγκος της κυψελίδας.

Αντίστροφα, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα μπορεί να εκφραστεί ως ανάπτυγμα Fourier με βάση τους παράγοντες δομής:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{[-2\pi i(hx+ky+lz)]}$$

Αυτό σημαίνει ότι το $\rho(x, y, z)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier του $F(hkl)$, ενώ το $F(hkl)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier του $\rho(x, y, z)$.

Στην πράξη, η διαδικασία έχει δυσκολία ότι οι μετρήσεις δίνουν μόνο την ένταση και άρα το $|F|$, όχι όμως τις φάσεις $\alpha(hkl)$. Έτσι γράφεται:

$$F = |F| e^{i\alpha}$$

και το πρόβλημα της εύρεσης της πυκνότητας ανάγεται στο **πρόβλημα φάσης** (*phase problem*).

1.4.8.1. Επίλυση του προβλήματος φάσης

Χωρίς τις φάσεις των $F(hkl)$ δεν μπορεί να υπολογιστεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα και συνεπώς ούτε η δομή του υπό μελέτη μορίου. Κύριες μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος φάσης είναι:

- **Ισόμορφη αντικατάσταση** (*Isomorphous replacement - IR*): η μέθοδος αυτή βασίζεται στην τροποποίηση του περιεχομένου της μοναδιαίας κυψελίδας με την εισαγωγή βαρέων ατόμων και στην καταγραφή του τρόπου με τον οποίο η παρουσία τους επηρεάζει το πειραματικό μοτίβο περίθλασης. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, ιόντα βαρέων μετάλλων ενσωματώνονται στον κρύσταλλο της πρωτεΐνης χωρίς να αλλοιώνεται η γενική του δομή. Κρίσιμο σημείο για την επιτυχία της διαδικασίας είναι η ισομορφία ανάμεσα στον αρχικό και τον τροποποιημένο κρύσταλλο, δηλαδή η διατήρηση της ίδιας κρυσταλλικής αρχιτεκτονικής με μοναδική διαφορά την παρουσία των βαρέων μετάλλων. Επειδή τα άτομα αυτά σκεδάζουν τις ακτίνες-X πολύ πιο έντονα από τα ελαφρά άτομα που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης, οι θέσεις τους μπορούν να προσδιοριστούν με ανεξάρτητες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την επίλυση φάσης μικρών μορίων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται η συμβολή των βαρέων ατόμων στη περίθλαση και κατόπιν συγκρίνονται τα μοτίβα περίθλασης των ισόμορφων κρυστάλλων, με και χωρίς βαρέα μέταλλα. Η ανάλυση αυτής της διαφοράς παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για την εκτίμηση των φάσεων και οδηγεί στην σταδιακή ανασύνθεση του ηλεκτρονιακού χάρτη της πρωτεΐνης.

- **Ανώμαλη σκέδαση ενός ή πολλαπλών μηκών κύματος** (*Single or Multi-wavelength anomalous dispersion - SAD/MAD*): μια σημαντική εναλλακτική της ισόμορφης αντικατάστασης, ιδιαίτερα μετά την ανάπτυξη πηγών σύγχροtron που επιτρέπουν τον ακριβή έλεγχο του μήκους κύματος. Σε γενικές γραμμές, η σκέδαση ακτίνων-X από ένα άτομο δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος. Παρ' όλα αυτά κάθε στοιχείο διαθέτει συγκεκριμένα όρια απορρόφησης, στα οποία η σκέδαση μεταβάλλεται απότομα τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς τη φάση. Εκμεταλλεύοντας αυτό το φαινόμενο, είναι δυνατό να ρυθμιστεί το μήκος κύματος των ακτίνων-X κοντά σε αυτά τα όρια, ώστε να ενισχυθεί ή να τροποποιηθεί η συμβολή των συγκεκριμένων ατόμων στην ολική σκέδαση. Όταν οι θέσεις αυτών των ατόμων, συνήθως βαρέων, είναι ήδη γνωστές μέσα στην δομή, η πληροφορία που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση των φάσεων. Η προσέγγιση αυτή είναι ανάλογη με εκείνη της ισόμορφης αντικατάστασης, αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι βασίζεται σε δεδομένα από ένα και μόνο κρύσταλλο και αποφεύγει την ανάγκη παρασκευής ισόμορφων παραγώγων.
- **Μοριακή αντικατάσταση** (*Molecular replacement - MR*): η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την επίλυση του προβλήματος φάσης στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. Η αντικατάσταση αφορά στην μετατόπιση και προσαρμογή ενός γνωστού δομικού μοντέλου μέσα στην μοναδιαία κυψελίδα της άγνωστης δομής. Το μοντέλο αυτό προέρχεται από μια συγγενική πρωτεΐνη με μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία αμινοξέων. Κατά την διαδικασία πραγματοποιούνται περιστροφή και μετατόπιση του γνωστού μοντέλου μέχρι να επιτευχθεί η καλύτερη συμφωνία ανάμεσα στα υπολογισμένα δεδομένα περίθλασης από το μοντέλο του ομόλογου μορίου και στα πειραματικά δεδομένα που προέρχονται από την υπό μελέτη πρωτεΐνη.
- **Άμεσες μέθοδοι**: βασίζονται σε στατιστικές σχέσεις ανάμεσα στις φάσεις και χρησιμοποιούνται κυρίως για μικρές μοριακές δομές.
- **Τροποποίηση χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας** (*Density modification*): εφαρμόζονται περιορισμοί (π.χ. επίπεδη πυκνότητα στις περιοχές διαλύτη, μη αρνητικές τιμές πυκνότητας) ώστε να βελτιωθούν οι αρχικές φάσεις (Drenth, 2007; Rupp, 2010).

1.4.9. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της περιθλούσας ακτινοβολίας

Η ένταση των ακτίνων-X που παρατηρείται σε ένα πείραμα περίθλασης δεν εξαρτάται μόνο από τη διάταξη των ατόμων μέσα στον κρύσταλλο, αλλά και από μια σειρά εξωτερικών παραγόντων που τροποποιούν την πραγματική τιμή που καταγράφεται.

Αρχικά, σημαντικό ρόλο έχει ο πολωτικός παράγοντας (*polarization factor*). Η ακτινοβολία που σκεδάζεται από τα ηλεκτρόνια εξαρτάται από την πόλωση του εισερχόμενου κύματος. Για μη πολωμένη δέσμη η ένταση μειώνεται με συντελεστή που σχετίζεται με το $\cos^2(2\theta)$, ενώ για πολωμένη η συμπεριφορά διαφέρει ανάλογα με τις συνιστώσες της δέσμης. Έπειτα, η απορρόφηση και η εξαφάνιση (*absorption and extinction*) περιορίζουν την παρατηρούμενη ένταση. Η απορρόφηση προέρχεται από την αλληλεπίδραση της δέσμης με τα άτομα του υλικού, ενώ η εξαφάνιση οφείλεται σε πολλαπλές ανακλάσεις και παρεμβολές μέσα στον ίδιο τον κρύσταλλο. Η σκέδαση από επίπεδα ατόμων (*scattering by planes*) δείχνει πώς οι φάσεις από διαφορετικές θέσεις οδηγούν σε ενίσχυση της περίθλασης μόνο σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις.

Επιπλέον, η επιλογή του μήκους κύματος επηρεάζει την ένταση, καθώς μεγαλύτερα λ δίνουν πιο ισχυρή περίθλαση αλλά και περισσότερη απορρόφηση, ενώ μικρότερα λ βελτιώνουν τη διακριτική ικανότητα. Για την πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία, συνήθως χρησιμοποιείται λ κοντά στο 1 Å. Το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας είναι επίσης καθοριστικό. Μεγάλες κυψελίδες συχνά οδηγούν σε πιο ασθενείς ανακλάσεις, επειδή τα άτομα κατανέμονται πιο αραιά, αν και ο συνολικός αριθμός τους μπορεί να αυξάνει το σήμα. Τέλος, για να ληφθούν αξιόπιστα αποτελέσματα εφαρμόζονται διορθώσεις έντασης, οι οποίες

λαμβάνουν υπόψη όλους τους παραπάνω παράγοντες. Έτσι μπορούν να συσχετιστούν οι μετρούμενες εντάσεις με την εσωτερική δομή του κρυστάλλου.

Ο παράγοντας δομής $F(hkl)$ εκφράζει το πλάτος του κύματος που προκύπτει από την συμβολή όλων των κυμάτων που σκεδάζονται από τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου. Η ένταση όμως ενός κύματος είναι πάντα ανάλογη με το τετράγωνο του πλάτους του. Επομένως, εφόσον το πλάτος της περίθλασης για μία ανάκλαση (hkl) δίνεται από το $F(hkl)$, η μετρούμενη ένταση είναι:

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2$$

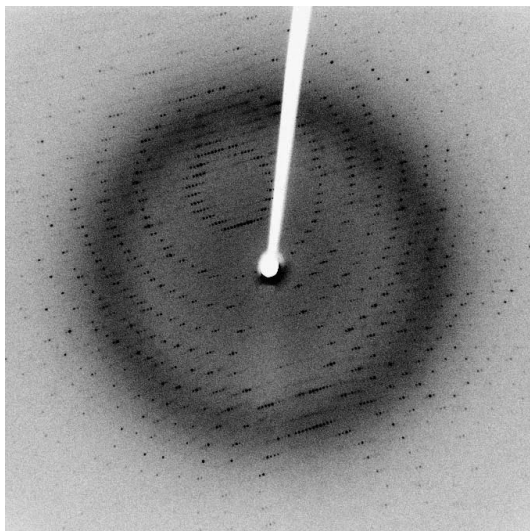
Αυτός είναι ο θεμελιώδης λόγος που η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής βασίζεται στην ποσοτική συσχέτιση των εντάσεων με το τετράγωνο του παράγοντα δομής (Drenth, 2007).

1.4.10. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της περιθλούσας ακτινοβολίας

1.4.10.1. Περίθλαση ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο – SCXRD

Η **περίθλαση ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο** (*Single Crystal X-Ray Diffraction – SCXRD*) αποτελεί μια από τις παλαιότερες και πιο καθιερωμένες τεχνικές στην μελέτη κρυσταλλικών δομών, έχοντας προσφέρει τον μεγαλύτερο όγκο δεδομένων στην κρυσταλλογραφία μέχρι σήμερα. Σε αντίθεση με την τεχνική XRPD, η SCXRD απαιτεί την αξιοποίηση ενός ευμεγέθους και καλής ποιότητας μονοκρυστάλλου, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα ως προς την ποιότητα των δεδομένων, αλλά και πρόκληση καθώς η κρυστάλλωση δεν είναι πάντοτε εύκολη διαδικασία ιδίως για τις πρωτεΐνες (Cullity, 1956).

Στην πράξη, ο μονοκρύσταλλος τοποθετείται σε ειδικό δειγματοφορέα, συγκεκριμένα μια θηλιά (*loop*), μπροστά από μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X. Κατά την διάρκεια του πειράματος, ο κρύσταλλος περιστρέφεται ώστε καταγραφούν ανακλάσεις από διαφορετικές οικογένειες κρυσταλλογραφικών επιπέδων, όσες περισσότερες είναι δυνατό. Κάθε φορά που ικανοποιείται ο νόμος του Bragg για μια οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων, δημιουργείται περιθλούσα δέσμη και καταγράφεται σήμα στον ανιχνευτή με μορφή κηλίδας. Η εμφάνιση των κηλίδων δεν είναι τυχαία, καθώς κάθε κηλίδα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο σημείο του αντίστροφου πλέγματος, το οποίο τέμνει την περιφέρεια της σφαίρας του Ewald, ενώ η διάταξη των κηλίδων αντικατοπτρίζει την συμμετρία του κρυστάλλου και η έντασή τους σχετίζεται με την θέση και το είδος των ατόμων στο εσωτερικό του (**Εικόνα 1-25**) (Rupp, 2010).



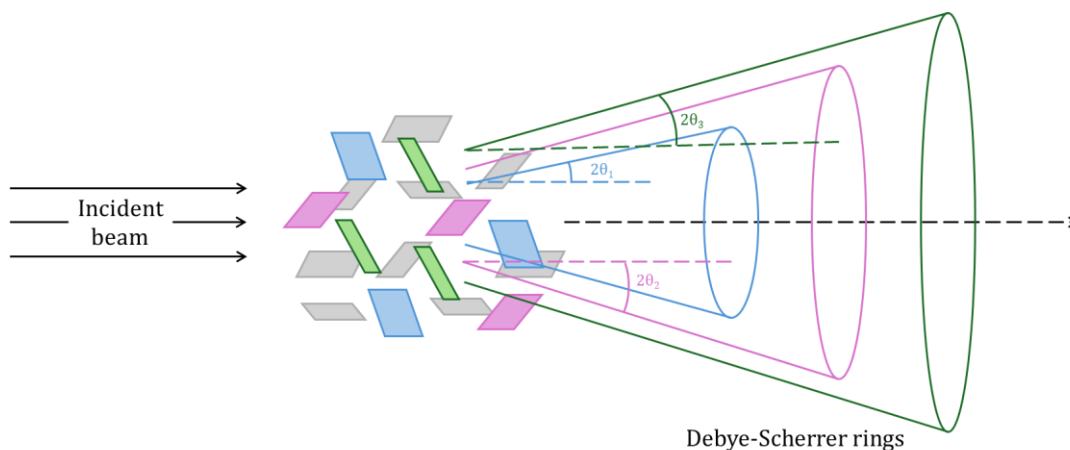
Εικόνα 1-25. Μοτίβο περίθλασης ακτίνων-X από μονοκρύσταλλο (Πηγή: [X-ray diffraction | Definition, Diagram, Equation, & Facts | Britannica](#)).

Για την συλλογή δεδομένων έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις. Η μέθοδος Laue χρησιμοποιεί πολυχρωματική ακτινοβολία και αφήνει τον κρύσταλλο σταθερό. Καθώς υπάρχουν πολλά μήκη κύματος, δημιουργούνται πολλαπλές σφαίρες Ewald, με αποτέλεσμα να καταγράφονται ανακλάσεις από διαφορετικά επίπεδα ταυτόχρονα (Laue, 1913). Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για μελέτες με συνεχή ακτινοβολία, αλλά λιγότερη συχνή στην σύγχρονη πρακτική. Η πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η μέθοδος περιστροφής (*rotation method*), η οποία περιγράφηκε παραπάνω και όπως φανερώνει το όνομά της ο κρύσταλλος περιστρέφεται.

Ένα διάγραμμα περίθλασης από μονοκρύσταλλο αποτελείται λοιπόν από πλήθος κηλίδων σε δύο διαστάσεις. Οι γωνίες στις οποίες εμφανίζονται σχετίζονται με το κρυσταλλικό πλέγμα και τις πλεγματικές σταθερές, ενώ η ένταση κάθε κηλίδας εξαρτάται από τις θέσεις και τα είδη των ατόμων που συνθέτουν τη μοναδιαία κυψελίδα (Rupp, 2010). Μέσω της ανάλυσης αυτών των δεδομένων είναι δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της κρυσταλλικής συμμετρίας, των διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας και τελικά της θέσης των ατόμων στον χώρο.

1.4.10.2. Περίθλαση ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικό δείγμα - XRPD

Τα πολυκρυσταλλικά δείγματα αποτελούνται από πλήθος μικροσκοπικών κρυστάλλων, οι οποίοι δεν έχουν έναν προσανατολισμό, αλλά, αντιθέτως, έχουν πολλούς διαφορετικούς μεταξύ τους. Παρά το ότι είναι μικροί σε μέγεθος, αν βρίσκονται σε επαρκή ποσότητα μπορούν να αλληλεπιδράσουν έντονα με την ακτινοβολία ακτίνων-X και να αποδώσουν σαφή φαινόμενα περίθλασης, αντίστοιχα με αυτά που παρατηρούνται από έναν μονοκρύσταλλο. Επομένως, για να είναι δυνατή η εφαρμογή της τεχνικής **περίθλασης ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικό δείγμα** (*X-Ray Powder Diffraction - XRPD*) και η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, βασική προϋπόθεση είναι το δείγμα να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό κρυστάλλων, ώστε η στατιστική τυχαιότητα στον προσανατολισμό τους να είναι εξασφαλισμένη (Margiolaki, 2019; Spiliopoulou, Triandafillidis et al., 2020).

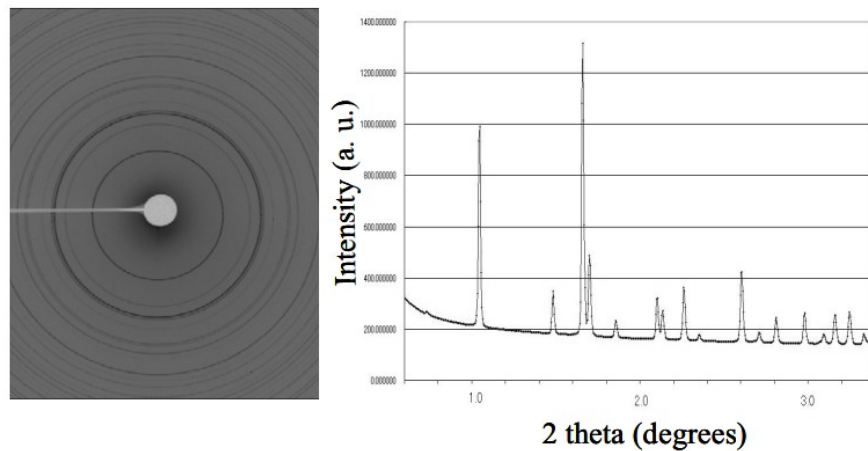


Εικόνα 1-26. Σχηματική αναπαράσταση της περίθλασης ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικό δείγμα, όπου προκύπτουν οι κώνοι Debye-Scherrer.

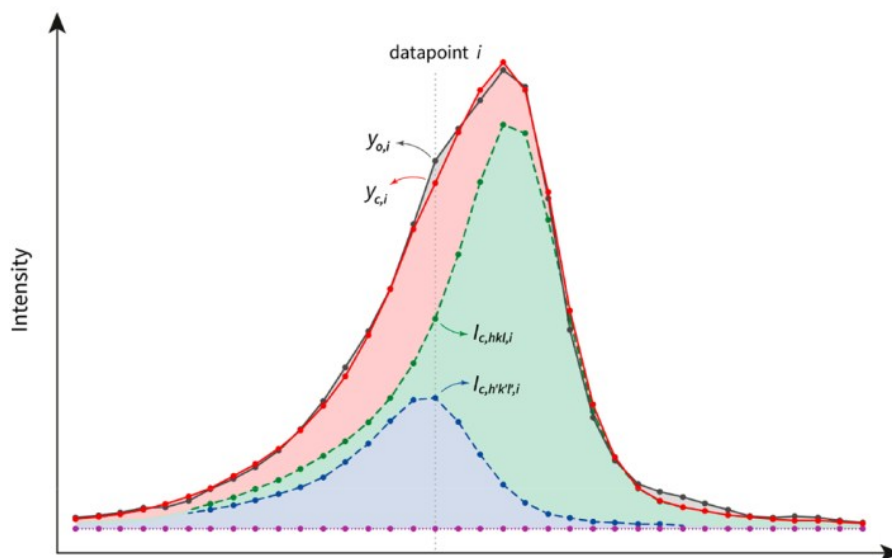
Το XRPD βασίζεται στο γεγονός ότι πολλές οικογένειες κρυσταλλογραφικών επιπέδων πολλών κρυστάλλων μπορούν ταυτόχρονα να περιθλούν την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η πολλαπλή αυτή αλληλεπίδραση δημιουργεί πληθώρα ανακλάσεων, οι οποίες αποτυπώνονται στο αντίστροφο πλέγμα σαν σύστημα ομόκεντρων κώνων. Όταν οι κώνοι αυτοί τέμνουν την σφαίρα του Ewald, εμφανίζονται κυκλικά μοτίβα γνωστά ως δακτύλιοι Debye-Scherrer (*Debye-Scherrer rings*) (**Εικόνα 1-26**). Για την πειραματική καταγραφή των δεδομένων χρησιμοποιείται ευρέως η μέθοδος Debye-Scherrer. Σε αυτήν την διάταξη, το δείγμα τοποθετείται μέσα σε λεπτό τριχοειδή σωλήνα μικρής διαμέτρου, ώστε να ακτινοβολείται από δέσμη ακτίνων-X με τέτοια διάμετρο ώστε να καλύπτει το σύνολο του δείγματος. Τα δεδομένα περίθλασης

συλλέγονται από μονοδιάστατο ανιχνευτή, ο οποίος κινείται σε κυκλική τροχιά γύρω από το δείγμα και έχει ως κέντρο αυτό. Η κυκλική τροχιά στην οποία κινείται ο ανιχνευτής ταυτίζεται με την γωνία περίθλασης 2θ και καταγράφει την ένταση σε όλο το εύρος της (Fitch, 2019).

Η κατανομή της έντασης των περιθλούσων ακτίνων-X εξαρτάται άμεσα από τα χαρακτηριστικά του πολυκρυσταλλικού δείγματος. Όταν το υλικό αποτελείται από μεγάλο πλήθος μικροσκοπικών κρυστάλλων με τυχαίο προσανατολισμό, η ένταση κατανέμεται ομοιόμορφα κατά μήκος κάθε δακτυλίου Debye-Scherrer. Στην περίπτωση όμως που η τυχειότητα αυτή απουσιάζει, οι δακτύλιοι εμφανίζουν ανομοιόμορφη κατανομή της έντασης, γεγονός που καθιστά τις μετρήσεις ενός μονοδιάστατου ανιχνευτή μη αντιπροσωπευτικές και ανεπαρκείς (*preferred orientation*). Για τέτοιου είδους δείγματα προτιμάται η χρήση δισδιάστατων ανιχνευτών, οι οποίοι επιτρέπουν την πλήρη αποτύπωση της έντασης των δακτυλίων (Fitch & Dejoie, 2021), με ταυτόχρονη περιστροφή των δειγμάτων κατά την διάρκεια της μέτρησης, η οποία αποσκοπεί στην εξασφάλιση μεγαλύτερης στατιστικής τυχειότητας. Το πρότυπο που καταγράφεται εμφανίζεται ως σειρά ομόκεντρων κύκλων, καθένας εκ των οποίων αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη τιμή d_{hkl} (Εικόνα 1-27).



Εικόνα 1-27. Ενδεικτική απεικόνιση δακτυλίων περίθλασης σε δισδιάστατη εικόνα και ολοκλήρωσή τους προς δημιουργία μοτίβου περίθλασης XRPD (Πηγή: Margiolaki et al., 2007).



Εικόνα 1-28. Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου αλληλοεπικάλυψης κορυφών. Οι μπλε και πράσινες καμπύλες αντιστοιχούν στις επιμέρους υπολογισμένες εντάσεις, οι οποίες συνθέτουν το συνολικό υπολογισμένο προφίλ (κόκκινο) (Πηγή: Spiliopoulou, Triandafillidis et al., 2020).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η ικανότητά της να μετρούνται δείγματα που δεν αποτελούνται από μία μόνο, αλλά από περισσότερες κρυσταλλικές φάσεις. Κάθε φάση μέσα στο δείγμα συνεισφέρει το δικό της ξεχωριστό διάγραμμα περίθλασης, ανεξάρτητα από την παρουσία των υπόλοιπων. Έτσι, η σύγκριση και ποσοτική ανάλυση των σχετικών εντάσεων των κορυφών που αντιστοιχούν σε καθεμία από αυτές τις φάσεις καθιστά εφικτό τον υπολογισμό της αναλογίας τους στο σύνθετο δείγμα. Σημαντική είναι και η αναφορά του XRPD ως τεχνική που δύναται για την επίλυση δομών βιολογικών μορίων. Οι πρώτες βελτιστοποιήσεις και επιλύσεις δομών έχουν αναφερθεί από τα τέλη του 20^{ου} αιώνα, όπως η βελτιστοποίηση της δομής της οξειδωμένης μορφής της μυοσφαιρίνης (Von Dreele, 1999) και η πρώτη επίλυση της δομής του T_3Rf_3 εξαμερούς της ανθρώπινης ινσουλίνης (Von Dreele et al., 2000), ενώ η χρήση της για τέτοιους σκοπούς έχει εδραιωθεί και τα τελευταία χρόνια με τις επιλύσεις των δομών του πεπτιδίου οκτρεοτίδη (Spiliouroulou et al., 2021) και της κυβικής ινσουλίνης (T_2) (Triandafillidis et al., 2023).

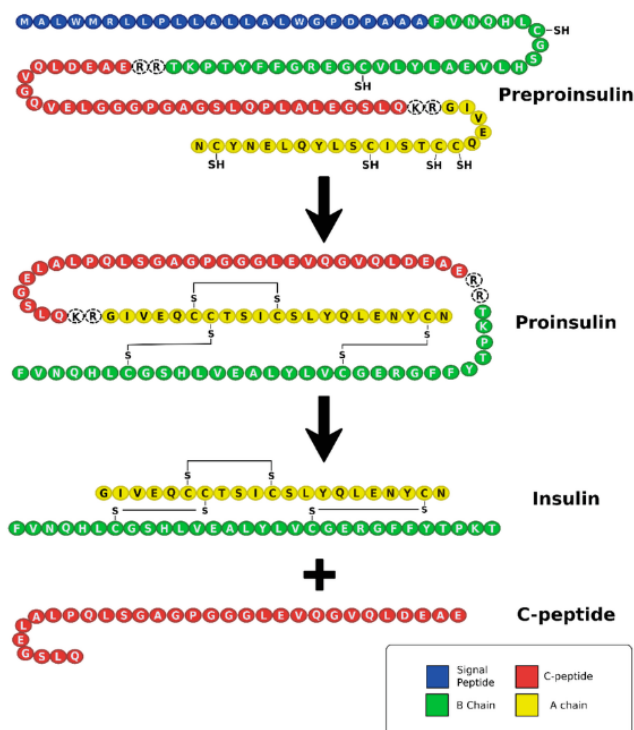
Ένα από τα πιο ουσιαστικά μειονεκτήματα της περίθλασης ακτίνων X σε πολυκρυσταλλικά δείγματα είναι το φαινόμενο της **αλληλοεπικάλυψης κορυφών** (*peak overlap*) (**Εικόνα 1-28**). Επειδή το τρισδιάστατο αντίστροφο πλέγμα απεικονίζεται μονοδιάστατα (περιθλασίγραμμα έντασης – γωνίας περίθλασης 2θ), πολλές διαφορετικές ανακλάσεις καταλήγουν να εντοπίζονται στην ίδια γωνία περίθλασης, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια πληροφορίας συγκριτικά με το SCXRD. Η αλληλοεπικάλυψη μπορεί να είναι δύο ειδών. Η απόλυτη αλληλοεπικάλυψη (*exact overlap*) προκύπτει όταν διαφορετικές ανακλάσεις έχουν την ίδια τιμή d_{hkl} . Εμφανίζεται κυρίως σε συστήματα υψηλής συμμετρίας, όπως το κυβικό, και σχετίζεται με τον παράγοντα πολλαπλότητας, δηλαδή τον αριθμό των ανακλάσεων που λόγω συμμετρίας συνεισφέρουν σε μια κορυφή. Η τυχαία αλληλοεπικάλυψη (*accidental overlap*) συμβαίνει όταν η διαφορά Δd_{hkl} δύο ανακλάσεων είναι μικρότερη από την ευκρίνεια του οργάνου. Το φαινόμενο αυτό είναι συχνότερο σε χαμηλής συμμετρίας κρυσταλλικά συστήματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από περισσότερες ανεξάρτητες ανακλάσεις. Η έκτασή του εξαρτάται άμεσα από τη **γωνιακή ευκρίνεια** (*angular resolution*) της διάταξης (Margiolaki et al., 2007; Margiolaki & Wright, 2008; Wright, Besnard et al., 2008; Margiolaki, 2019).

2. Ανθρώπινη Ινσουλίνη

Η **ινσουλίνη** (*insulin*) είναι μια ορμόνη, μοριακού βάρους 5.8 kDa, η οποία εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος και αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Ανακαλύφθηκε το 1921 από τους Banting και Best, γεγονός που αποτέλεσε σταθμό στην ιστορία της βιοϊατρικής έρευνας και της θεραπείας του σακχαρώδη διαβήτη (Beals et al., 2019). Η δράση της επικεντρώνεται στην μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, προάγοντας την απορρόφησή της από τους περιφερικούς ιστούς και διασφαλίζοντας την ενεργειακή ομοιόσταση του οργανισμού (Andrali et al., 2008). Όταν αυτή η λειτουργία διαταραχθεί, είτε λόγω ανεπαρκούς έκκρισης είτε λόγω αντίστασης των ιστών στη δράση της, προκύπτει υπεργλυκαιμία και ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη, μιας ομάδας χρόνιων μεταβολικών νοσημάτων (Brandenburg, 2008).

2.1. Βιοσύνθεση & Έκκριση

Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος και αποτελεί μια πολυσταδιακή διαδικασία που ξεκινά από τη μετάφραση του γονιδίου *INS*. Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης είναι η προ-προϊνσουλίνη, η οποία φέρει στο αμινοτελικό της άκρο ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 24 αμινοξέων που κατευθύνει το μόριο στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (Steiner, 2008). Εκεί, με την αποκοπή του σηματοδοτικού πεπτιδίου, σχηματίζεται η προϊνσουλίνη, ένα μόριο που αποτελείται από την Α-αλυσίδα, την Β-αλυσίδα και το ενδιάμεσο C-πεπτίδιο. Η προϊνσουλίνη αναδιπλώνεται σχηματίζοντας τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την σωστή λειτουργία της ώριμης ινσουλίνης.

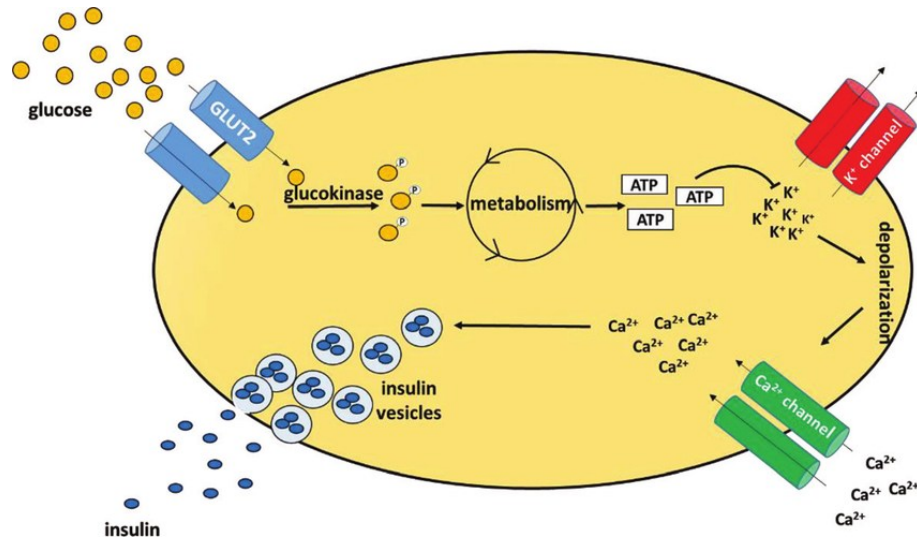


Εικόνα 2-1. Σχηματική αναπαράσταση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που οδηγούν από την προ-προϊνσουλίνη στην ινσουλίνη (Πηγή: Washburn, Mueller et al., 2021).

Στη συνέχεια, η προϊνσουλίνη μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου συσκευάζεται σε εκκριτικά κυστίδια παρουσία κατιόντων Zn^{2+} και Ca^{2+} . Υπό αυτές τις συνθήκες σχηματίζονται εξαμερή μόρια, τα οποία αποτελούν την ανενεργή, αποθηκευτική μορφή της ινσουλίνης (Dunn, 2005; Andrali et al., 2008). Η

ενεργοποίησή της ολοκληρώνεται εντός των εκκριτικών κοκκίων μέσω της δράσης ενδοπεπτιδασών, που απομακρύνουν το C-πεπτίδιο, αφήνοντας τις αλυσίδες Α και Β ενωμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ώριμη ινσουλίνη εκκρίνεται τελικά μαζί με το C-πεπτίδιο σε αναλογία 1:1, γεγονός που προσδίδει στο τελευταίο διαγνωστική αξία στην μελέτη της λειτουργικότητας των β-κυττάρων (**Εικόνα 2-1**) (Brandenburg, 2008).

Η έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος ελέγχεται μέσω ενός συστήματος άμεσης αρνητικής ανατροφοδότησης, το οποίο συνδέεται στενά με τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης αυξάνεται, όπως συμβαίνει μετά από ένα γεύμα, τα β-κύτταρα διεγείρονται με σκοπό να εκκρίνουν ινσουλίνη. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια νηστείας, όταν τα επίπεδα γλυκόζης πέφτουν κάτω από το φυσιολογικό, η έκκριση αναστέλλεται (Sherwood, 2016).



Εικόνα 2-2. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού έκκρισης ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα. Η γλυκόζη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω του GLUT-2 και μεταβολίζεται σε ATP, γεγονός που αυξάνει τον λόγο ATP/ADP. Η αύξηση αυτή οδηγεί στο κλείσιμο των ATP-εξαρτώμενων καναλιών K⁺, προκαλώντας αποπόλωση της μεμβράνης. Ακολουθεί άνοιγμα διαύλων Ca²⁺ και εισροή ιόντων ασβεστίου, η οποία ενεργοποιεί την εξωκυττάρωση των κυστιδίων που περιέχουν ινσουλίνη. (Πηγή: Świdarska et al., 2018).

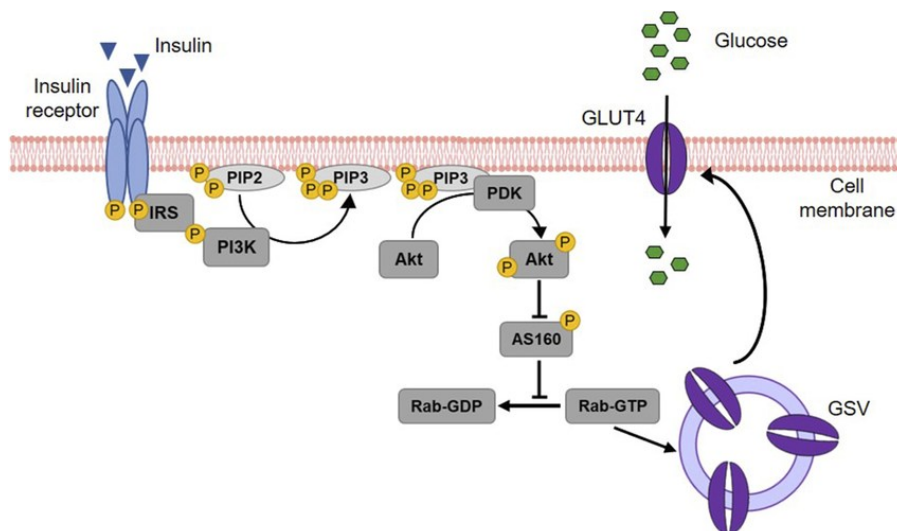
Η γλυκόζη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης μέσω ενός μηχανισμού σύζευξης διέγερσης-έκκρισης. Ειδικότερα, εισέρχεται στα β-κύτταρα μέσω του μεταφορέα GLUT-2, προκαλώντας μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης και ενεργοποιώντας μία αλληλουχία βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν στην απελευθέρωση της ινσουλίνης (**Εικόνα 2-2**) (Sherwood, 2016; Lemaire et al., 2009). Η διαδικασία αυτή σχετίζεται με την αποθήκευση της ινσουλίνης σε κυστίδια με τη μορφή εξαμερών κρυστάλλων που σταθεροποιούνται μέσω ιόντων ψευδαργύρου. Τα κυστίδια αυτά εκκρίνονται κατόπιν διέγερσης (Lemaire et al., 2009).

Μετά την απελευθέρωσή της, η ινσουλίνη δρα ως κύρια αναβολική ορμόνη του οργανισμού, προάγοντας την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς-στόχους, κυρίως τους μύες και τον λιπώδη ιστό, και αναστέλλοντας την ηπατική απελευθέρωση γλυκόζης (Brandenburg, 2008). Η πρόσληψη αυτή πραγματοποιείται μέσω μεμβρανικών μεταφορέων γλυκόζης, γνωστών ως GLUT. Ανάμεσα στους 14 τύπους που έχουν ταυτοποιηθεί, ο GLUT-4 αποτελεί τον βασικό μεταφορέα στα ινσουλινεξαρτώμενα κύτταρα. Σε κατάσταση έλλειψης ινσουλίνης, ο GLUT-4 παραμένει σε ενδοκυττάρια κυστίδια, ενώ μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα ινσουλίνης, ενεργοποιούνται σηματοδοτικές οδοί που οδηγούν στην μεταφορά και ενσωμάτωση του GLUT-4 στην πλασματική μεμβράνη, επιτρέποντας την ταχεία πρόσληψη γλυκόζης (Sherwood, 2016; Steiner, 2011).

2.2. Μηχανισμός δράσης

Η ινσουλίνη δρα μέσω της πρόσδεσής της σε εξειδικευμένους υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, κυρίως των μυϊκών κυττάρων, των λιποκυττάρων και των ηπατοκυττάρων. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο εξωκυτταρικές α-υπομονάδες, υπεύθυνες για τη δέσμευση της ινσουλίνης, και δύο β-υπομονάδες που διασχίζουν τη μεμβράνη και διαθέτουν δράση τυροσινικής κινάσης. Η δέσμευση της ινσουλίνης στις α-υπομονάδες προκαλεί διαρθρωτική αλλαγή, που ενεργοποιεί την κινάση τυροσίνης των β-υπομονάδων και πυροδοτεί μια σειρά ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών (Sherwood, 2016).

Κεντρική οδός στη δράση της ινσουλίνης είναι η ενεργοποίηση της φωσφατιδυλινοσιτιδικής-3 κινάσης (PI3K), η οποία οδηγεί σε μετατόπιση κυστιδίων που περιέχουν τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT-4 προς την κυτταρική μεμβράνη. Η σύντηξη των κυστιδίων αυτών με την μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των GLUT-4 στην επιφάνεια του κυττάρου, γεγονός που διευκολύνει την είσοδο γλυκόζης (**Εικόνα 2-3**) (Sherwood, 2016). Με τον τρόπο αυτό, η ινσουλίνη μειώνει άμεσα την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και προάγει την αποθήκευσή της υπό την μορφή γλυκογόνου ή την χρήση της για παραγωγή ενέργειας.



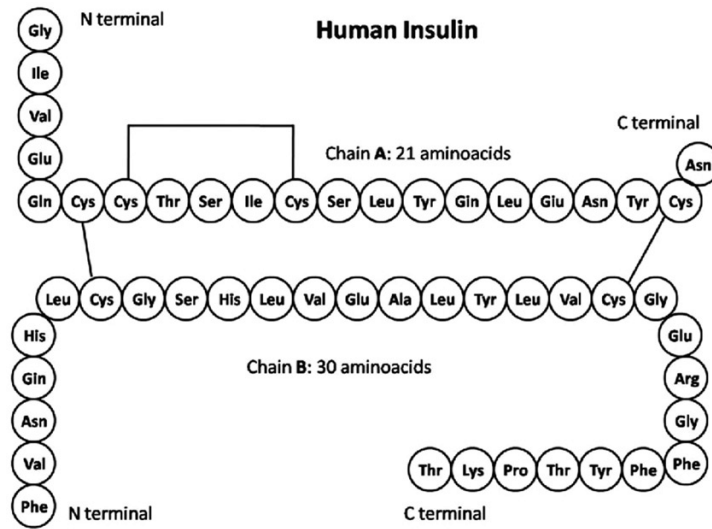
Εικόνα 2-3. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης της ινσουλίνης. Η πρόσδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω της φωσφατιδυλινοσιτιδικής-3 κινάσης (PI3K), η οποία οδηγεί στην μεταφορά των κυστιδίων που περιέχουν τον μεταφορέα γλυκόζης GLUT-4 προς την πλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα. (Πηγή: Bauer et al., 2024).

Επιπλέον, η ινσουλίνη ενεργοποιεί και άλλες σηματοδοτικές οδούς, όπως τις πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από μιτογόνα (MAPK). Μέσω αυτών, η ορμόνη ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και έκφραση γονιδίων, υπογραμμίζοντας τον ρόλο της πέρα από τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Ο συνολικός μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης αναδεικνύει τον διπλό της ρόλο, ο οποίος έγκειται αφενός στην διατήρηση της γλυκαιμικής ισορροπίας και αφετέρου στην προώθηση αναβολικών διεργασιών, όπως η λιπογένεση, η σύνθεση πρωτεϊνών και η αποθήκευση ενεργειακών υποστρωμάτων (Brandenburg, 2008; Steiner, 2011).

2.3. Δομή της ανθρώπινης ινσουλίνης

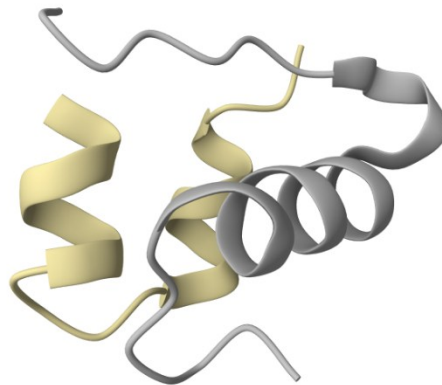
Το μόριο αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την Α-αλυσίδα μήκους 21 αμινοξέων, και την Β-αλυσίδα μήκους 30 αμινοξέων. Οι δύο αυτές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (CysA7-CysB7 και CysA20-CysB19), ενώ ένας τρίτος δισουλφιδικός δεσμός (CysA6-

Cys_{A11}) σταθεροποιεί την Α-αλυσίδα. Οι κυστεΐνες που σχηματίζουν αυτές τις γέφυρες είναι καθοριστικές για την αναδίπλωση και την σταθερότητα της ορμόνης, καθώς κάθε μεταβολή στην διάταξή της μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της ινσουλίνης να αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα της (**Εικόνα 2-4**) (Brange & Langkjøer, 1993; Dunn, 2005).



Εικόνα 2-4. Η πρωτοταγής δομή της ανθρώπινης ινσουλίνης (Πηγή: Harfenist & Craig, 1952).

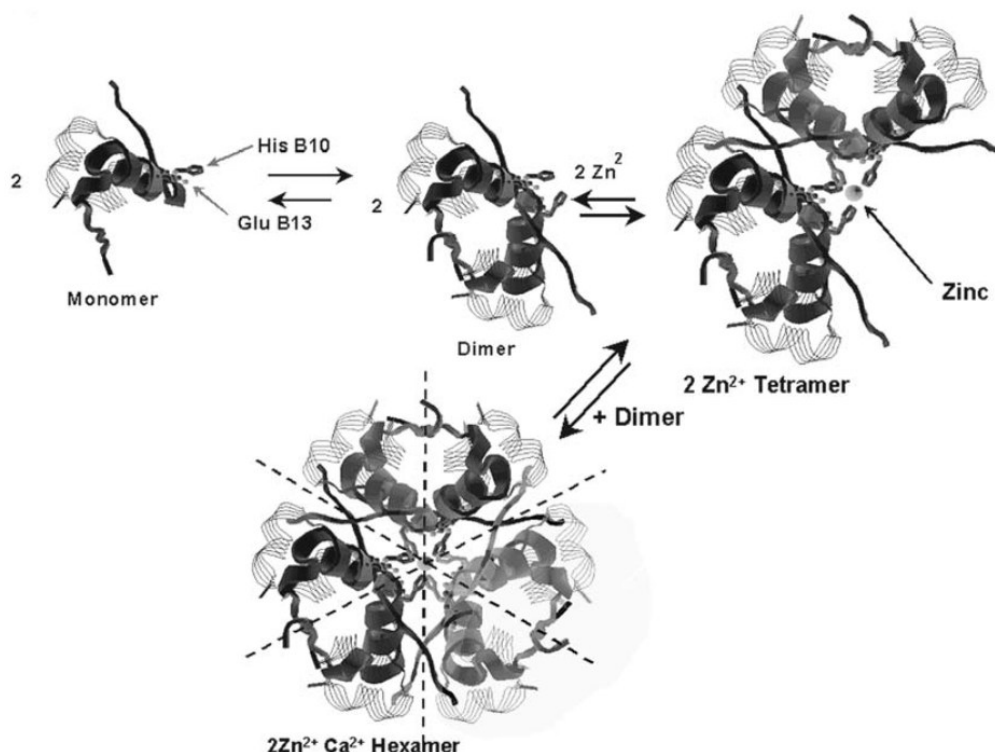
Η δευτεροταγής δομή της ινσουλίνης χαρακτηρίζεται από την παρουσία α-ελίκων και β-πτυχωτών επιφανειών. Η Α-αλυσίδα σχηματίζει δύο σχεδόν αντιπαράλληλες α-έλικες (A2–A8 και A13–A20), ενώ η Β-αλυσίδα διαθέτει μία α-έλικα (B9–B19), η οποία ακολουθείται από στροφή και μία β-πτυχωτή επιφάνεια στο καρβοξυτελικό άκρο (B21–B30) (**Εικόνα 2-5**). Η οργάνωση αυτή δημιουργεί έναν μη πολικό εσωτερικό πυρήνα και μία επιφάνεια με πολικά και μη πολικά τμήματα, που είναι κρίσιμα για την αναγνώριση του υποδοχέα ινσουλίνης και την βιολογική της δράση.



Εικόνα 2-5. Η δευτεροταγής δομή του μονομερούς της ανθρώπινης ινσουλίνης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται η (PDB ID: 3i40).

Η τριτοταγής δομή σταθεροποιείται τόσο από τους δισουλφιδικούς δεσμούς όσο και από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Έτσι το μόριο αποκτά μία συμπαγή και λειτουργική διαμόρφωση. Στην πραγματικότητα, η ινσουλίνη υπήρξε μία από τις πρώτες πρωτεΐνες που μελετήθηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, γεγονός που επέτρεψε την κατανόηση της τρισδιάστατης δομής της και οδήγησε σε επαναστατικές εξελίξεις στην βιοϊατρική έρευνα (Brandenburg, 2008).

Η τεταρτοταγής δομή της ινσουλίνης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ($<0.1 \mu\text{M}$) το μόριο βρίσκεται σε μορφή μονομερούς, το οποίο είναι και βιολογικά ενεργό. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σχηματίζονται διμερή μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυτελικών άκρων των Β-αλυσίδων. Όταν η συγκέντρωση υπερβαίνει τα 0.01 mM και υπάρχουν ιόντα ψευδαργύρου, τρία διμερή ενώνονται προς τον σχηματισμό εξαμερών. Αυτή η μορφή αποτελεί την αποθηκευτική μορφή της ορμόνης μέσα στα εκκριτικά κοκκία των β-κυττάρων (Brange & Langkjøer, 1993; Lemaire et al., 2009). Τα εξαμερή σταθεροποιούνται μέσω συντονισμού των ιόντων Zn^{2+} με τις πλευρικές ομάδες ιστιδίνης στις θέσεις B10 (His_{B10}), γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ανθεκτικότητα της ινσουλίνης (**Εικόνα 2-6**) (Dunn, 2005). Μετά την έκκριση στο αίμα, τα εξαμερή διασπώνται σε διμερή και τελικά σε μονομερή, τα οποία είναι αυτά που προσδένονται στον υποδοχέα της ινσουλίνης.



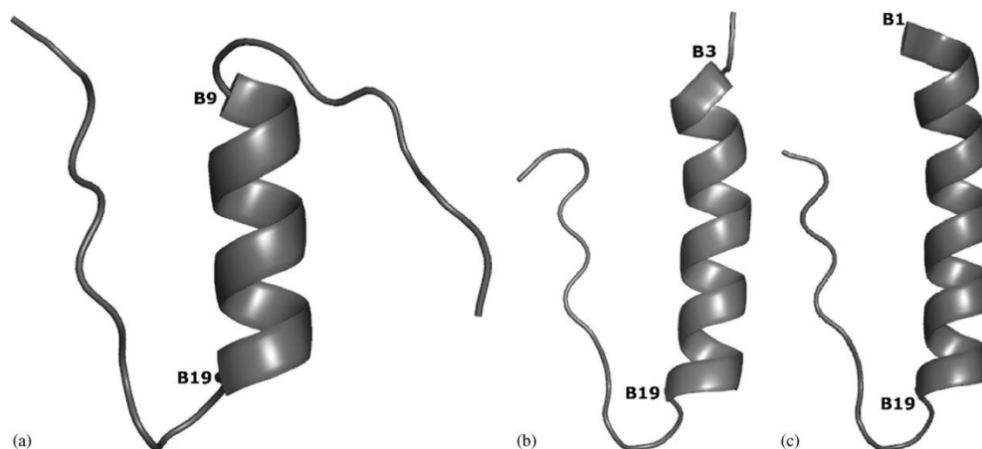
Εικόνα 2-6. Το μονοπάτι σύνθεσης του εξαμερούς της ινσουλίνης (Πηγή: Dunn, 2005).

2.4. Μοριακές διαμορφώσεις

Η ινσουλίνη, αν και είναι βιολογικά ενεργή στην μονομερή της μορφή, αποθηκεύεται και σταθεροποιείται στο πάγκρεας υπό τη μορφή εξαμερών, τα οποία αποτελούνται από τρία διμερή που οργανώνονται γύρω από έναν άξονα τριπλής συμμετρίας και συντονίζονται από κατιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) σε θέσεις His_{B10} . Το εξαμερές της ινσουλίνης παρουσιάζει έντονο μοριακό πολυμορφισμό, δηλαδή υιοθετεί διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το περιβάλλον, το pH, την παρουσία ιόντων και οργανικών προσδετών (Ciszak & Smith, 1994; Weiss, 2009).

Κρυσταλλογραφικές και βιοφυσικές μελέτες έχουν δείξει ότι το εξαμερές της ινσουλίνης εμφανίζεται σε τρεις κύριες αλλοστερικές καταστάσεις, τις T_6 , T_3R_3 και R_6 (**Εικόνα 2-7**) (Dunn, 2005). Στην διαμόρφωση T_6 όλα τα μονομερή βρίσκονται στην εκτεταμένη (*tensed*) κατάσταση. Τα αμινοξέα B1–B8 έχουν επιμηκυμένη διάταξη, τα ιόντα Zn^{2+} είναι εκτεθειμένα και συντονίζονται συνήθως με τρία μόρια νερού σε οκταεδρική διάταξη (Ciszak & Smith, 1994). Αυτή η μορφή είναι η λιγότερο σταθερή. Στη διαμόρφωση R_6 όλα τα μονομερή βρίσκονται στην χαλαρή (*relaxed*) διάταξη. Τα κατάλοιπα B1–B8

σχηματίζουν α-έλικα και η διαμόρφωση είναι πολύ πιο σταθερή (Weiss, 2009). Στην μορφή αυτή σχηματίζονται έξι φαινολικές θέσεις πρόσδεσης (*phenolic pockets*), στις οποίες προσδένονται φαινολικά παράγωγα, όπως η φαινόλη, η m-κρεσόλη και η ρεσορσινόλη, τα οποία συμβάλλουν στην σταθεροποίησή της. Τέλος, η διαμόρφωση $T_3R^f_3$ αποτελεί ενδιάμεση κατάσταση, στην οποία τρία μονομερή παραμένουν στην T μορφή και τα άλλα τρία υιοθετούν την R^f μορφή. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών φαινολικών θέσεων πρόσδεσης και ενός ανιονικού σημείου πρόσδεσης, ενώ το ένα από τα δύο ιόντα ψευδαργύρου μεταβαίνει από οκταεδρικό σε τετραεδρικό συντονισμό (Bhatnagar et al., 2006; Sreekanth et al., 2009).



Εικόνα 2-7. Οι τρεις μοριακές διαμορφώσεις της B-αλυσίδας της ινσουλίνης: a) T, b) R^f , c) R (Πηγή: Bhatnagar et al., 2006).

Η μετάβαση μεταξύ των τριών μορφών ρυθμίζεται από την παρουσία ανιόντων και φαινολικών παραγώγων. Τα μονοσθενή ανιόντα, όπως Cl^- , SCN^- , CN^- , OCN^- , N_3^- και NO_2^- , προσδένονται στον συντονισμό Zn^{2+} -His_{B10}, τροποποιώντας την γεωμετρία του και ευνοώντας την μετάβαση από την στερεοδιαμόρφωση T_6 στην στερεοδιαμόρφωση $T_3R^f_3$ (Dunn, 2005; Ciszak & Smith, 1994). Τα φαινολικά παράγωγα προσδένονται στις φαινολικές θέσεις πρόσδεσης και σταθεροποιούν την R_6 διαμόρφωση. Η ιδιότητα αυτή αξιοποιείται φαρμακοτεχνολογικά, καθώς οι φαινολικοί συντηρητικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα σκευάσματα ινσουλίνης βελτιώνουν την αποθήκευση και τροποποιούν την φαρμακοκινητική της (Weiss, 2009).

Η σταθερότητα των διαμορφώσεων ακολουθεί την σειρά $R_6 \gg T_3R^f_3 \gg T_6$ (Dunn, 2005). Στο βιολογικό περιβάλλον, τα εξαμερή δεν υφίστανται ως στατικές καταστάσεις αλλά βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία, με συνεχείς μεταβάσεις ανάλογα με το pH και την ιοντική ισχύ (Ciszak & Smith, 1994).

Ο πολυμορφισμός του εξαμερούς συνδέεται άμεσα με τη φυσιολογική αποθήκευση και απελευθέρωση της ινσουλίνης από τα εκκριτικά κοκκία των β-κυττάρων. Στο εσωτερικό των κοκκίων, όπου το pH είναι όξινο και η συγκέντρωση Zn^{2+} υψηλή, η ινσουλίνη αποθηκεύεται σε κρυσταλλική εξαμερή μορφή, όμως μετά την εξωκυττάρωση οι αλλαγές στο pH (από ~5.5 σε ~7.4) και στην διαθεσιμότητα ιόντων οδηγούν στην διάσπαση του εξαμερούς σε διμερή και τελικά μονομερή (Dunn, 2005).

2.5. Κρυσταλλικός πολυμορφισμός

Ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός της ινσουλίνης αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό φαινόμενο, καθώς δείχνει την ικανότητα του μορίου να σχηματίζει διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές ανάλογα με το pH, την συγκέντρωση ιόντων και την παρουσία οργανικών προσδετών. Ο πρώτος δομικός χαρακτηρισμός της ινσουλίνης πραγματοποιήθηκε από τους Adams et al., 1969, ενώ από τότε έχουν ακόμη

αναφερθεί μια πληθώρα κρυσταλλικών πολυμόρφων της ινσουλίνης. Τα διαφορετικά κρυσταλλικά πολύμορφα σχετίζονται άμεσα με την σταθερότητα και την φαρμακευτική αξιοποίηση της ορμόνης.

Σε ελαφρώς όξινο pH (περίπου 4.9–6.4), η ινσουλίνη κρυσταλλώνεται σε ρομβοεδρική συμμετρία (space group $R3$), υιοθετώντας την μοριακή διαμόρφωση T_6 . Σε ουδέτερο έως ελαφρώς βασικό pH (περίπου 6.9–7.7), παρατηρείται η ίδια ρομβοεδρική συμμετρία, αλλά με την $T_3R^f_3$ μοριακή διαμόρφωση. Στην περιοχή βασικού pH (7.9–8.6), η ινσουλίνη υιοθετεί κυβική συμμετρία (space group $I2_13$), με μοριακή διαμόρφωση T_2 (Triandafillidis et al., 2023). Συχνά, σε ενδιάμεσες τιμές pH καταγράφεται συνύπαρξη δύο φάσεων, γεγονός που καταδεικνύει τον δυναμικό χαρακτήρα του πολυμορφισμού.

Πίνακας 2-1. Διάφοροι φαινολικοί προσδέτες και τα διαφορετικά κρυσταλλικά πολύμορφα που εμφανίζουν σε εύρη pH. Η εξαγωγή πλεγματικών πραγματοποιήθηκε με την χρήση τεχνικής περίθλασης XRPD (Πηγή: Karavassili et al., 2017 - Τροποποιημένο).

Phenol Derivative	pH Range	Space Group	<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	β (°)	Resolution Range (Å)
phenol							
	5.47–5.70	$P2_1(\alpha)$	114.682 (6)	337.63 (2)	49.270 (4)	101.555 (6)	112.2–7.5
	5.93–6.54	$C222_1$	60.287 (1)	221.797 (6)	228.812 (5)	90	115–7.5
	6.70–6.75	$C2$	103.0115 (5)	61.3213 (2)	63.5783 (4)	117.2244 (5)	45.9–5.3
	7.01–8.25	$P2_1(\beta)$	61.0920 (4)	61.8279 (4)	47.9302 (4)	110.6253 (7)	45–4.4
resorcinol							
	5.29–5.46	$P2_1(\alpha)$	114.0228 (8)	335.430 (3)	49.211 (6)	101.531 (8)	112.2–7.5
	5.93–7.45	$C222_1$	60.5579 (7)	220.907 (3)	228.320 (3)	90	115–7.5
	7.53–8.22	$P2_1(\beta)$	61.0008 (4)	62.0040 (3)	47.8823 (3)	110.0465 (5)	45–4.4
m-cresol							
	4.50–6.70	$P2_1(\gamma)$	87.0749 (7)	70.1190 (5)	48.1679 (5)	106.7442 (8)	46.5–6.8
	6.70–8.60	$R3$ (R_6)	80.0644 (6)	80.0644 (6)	40.8396 (3)	90	40.5–3.7
4-nitrophenol							
	5.10–6.30	$P2_1(\gamma)$	87.118 (1)	70.9493 (9)	48.4967 (9)	106.653 (1)	46.5–6.8
	6.20–8.10	$R3$ ($T_3R^f_3$)	80.721 (1)	80.721 (1)	37.8039 (5)	90	40.5–3.6
4-ethylresorcinol							
	4.95–5.60	$P2_1(\gamma)$	87.132 (3)	70.294 (2)	48.064 (2)	106.259 (3)	47–6.5
	5.65–5.80	$P2_1(\alpha)$	114.130 (7)	336.086 (3)	48.987 (5)	101.935 (8)	112–12
	5.93–6.25	$C2$	103.0848 (4)	61.6636 (2)	63.5006 (4)	117.417 (5)	46–7
	6.73–8.05	$P2_1(\beta)$	62.8231 (7)	62.1078 (5)	47.8362 (6)	111.6913 (9)	45–6

Η παρουσία μικρών οργανικών προσδετών, όπως φαινόλης, m-κρεσόλης, ρεσορσινόλης, διαφοροποιεί σημαντικά την συμμετρία των κρυστάλλων της ινσουλίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί πολύμορφα με μονοκλινή συμμετρία ($P2_1$, $C2$) και ορθορομβική συμμετρία ($C222_1$). Συνολικά, έχουν καταγραφεί πολυάριθμα κρυσταλλικά πολύμορφα της ινσουλίνης, γεγονός που καταδεικνύει την μεγάλη ευελιξία της κρυσταλλικής οργάνωσης του μορίου (**Πίνακας 2-1**) (Karavassili et al., 2012; Fili et al., 2015; Valmas et al., 2015; Spiliopoulou et al., 2021).

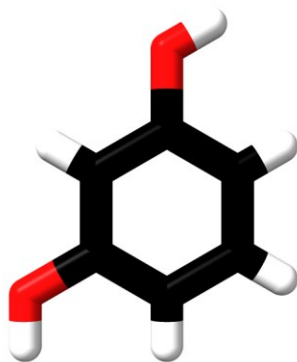
Οι κρυσταλλικές μορφές της ινσουλίνης καθορίζονται και από άλλους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση ψευδαργύρου, η παρουσία μονοσθενών ανιόντων και η θερμοκρασία. Τα ανιόντα χλωρίου και ψευδοαλογονιδίων μπορούν να επάγουν αλλαγές στις διαμορφώσεις, επηρεάζοντας την οργάνωση των μονομερών στο πλέγμα. Επιπλέον, η προσθήκη φαινολικών παραγώγων όχι μόνο επηρεάζει την

μοριακή διαμόρφωση, αλλά και οδηγεί στην σταθεροποίηση διαφορετικών τύπων συμμετρίας (Dunn, 2005; Norrman et al., 2007).

Η μελέτη του κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ινσουλίνης έχει ιδιαίτερη φαρμακευτική σημασία, καθώς πολλά θεραπευτικά σκευάσματα διατίθενται σε κρυσταλλική μορφή. Ο έλεγχος των κρυσταλλικών μορφών, μέσω της τροποποίησης παραμέτρων όπως το pH και οι οργανικοί προσδέτες, παρέχει την δυνατότητα σχεδιασμού σκευασμάτων με βελτιωμένη σταθερότητα, διαφορετικό ρυθμό απορρόφησης και παρατεταμένη διάρκεια δράσης.

2.5.1. Ρεσορσινόλη

Η ρεσορσινόλη είναι μια οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_6H_6O_2$ και μοριακό βάρος 110.11 g/mol (**Εικόνα 2-8**). Βρίσκεται σε κρυσταλλική μορφή και έχει λευκό χρώμα, πικρόγλυκη γεύση και ασθενή έως καθόλου οσμή. Είναι γνωστή επίσης με τις ονομασίες 1,3-διυδροξυβενζόλιο και m-βενζοδιόλη και δεν απαντάται στην φύση, αλλά απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1864 μέσω απόσταξης ρητίνης. Η ένωση απαντά σε δύο πολύμορφα, τα οποία ανήκουν στο space group $Pna2_1$ ορθορομβικής συμμετρίας (Schmiedel & Decker, 2011).



Εικόνα 2-8. Η δομή του μορίου της ρεσορσινόλης.

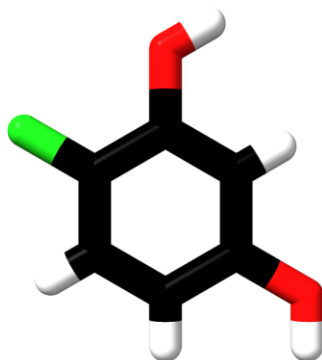
Η βιομηχανική παραγωγή της ξεπερνά τον αιώνα, με ετήσια παγκόσμια παραγωγή περίπου 50.000 τόνους, μεγάλο μέρος της οποίας κατευθύνεται στην βιομηχανία καουτσούκ και ρητινών. Χρησιμοποιείται επίσης στην παρασκευή ρητινών φορμαλδεΰδης, χρωστικών και φαρμακευτικών σκευασμάτων. Από φαρμακολογικής πλευράς, η ρεσορσινόλη παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω των κερατολυτικών και αντισηπτικών ιδιοτήτων της. Έχει χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα κατά της ακμής και της σημγματορροϊκής δερματίτιδας. Ιδιαίτερη σημασία έχει η αξιοποίησή της στην θεραπεία της διαφυητικής ιδρωταδενίτιδας (*hidradenitis suppurativa*), μιας χρόνιας φλεγμονώδους δερματοπάθειας που χαρακτηρίζεται από επώδυνες φλεγμονώδεις βλάβες σε περιοχές με ιδρωτοποιούς αδένες. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τοπική εφαρμογή 15% ρεσορσινόλης μειώνει τον πόνο και τη διάρκεια των αποστημάτων, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών (Boer & Jemec, 2008; Wipperman et al., 2019).

Τέλος, η ρεσορσινόλη παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα, συγκεκριμένα $LD_{50} = 301$ mg/kg έπειτα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους, η οποία είναι χαμηλότερη τοξικότητα από αυτήν την φαινόλης, καθιστώντας την έτσι έναν επίσης πολλά υποσχόμενο φαινολικό προσδέτη για φαρμακευτικά σκευάσματα ινσουλίνης (Schmiedel & Decker, 2011).

2.5.2. 4-Χλωρορεσορσινόλη

Η 4-χλωρορεσορσινόλη είναι μια οργανική ένωση και παράγωγο της ρεσορσινόλης, με μοριακό τύπο $C_6H_5ClO_2$ και μοριακό βάρος 144.56 g/mol (**Εικόνα 2-9**). Ο τέταρτο άνθρακας του δακτυλίου έχει

υποκατασταθεί με ένα άτομο χλωρίου, γεγονός το οποίο μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου. Βρίσκεται σε στερεά μορφή, έχει σημείο τήξεως τους 89-105 °C και έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό και στους οργανικούς διαλύτες (Andersen, 1996).



Εικόνα 2-9. Η δομή της 4-χλωρορεσορσινόλης.

Η 4-χλωρορεσορσινόλη έχει χρήση στην κοσμητολογία, καθώς εντοπίζεται σε βαφές μαλλιών σε συγκεντρώσεις <1 %, ενώ έχει αξιολογηθεί ως ασφαλής για τέτοια χρήση, χωρίς ενδείξεις καρκινογένεσης, μεταλλαξιογένεσης ή αναπαραγωγικής τοξικότητας. Παρουσιάζει επίσης αντισηπτική και μικροβιοκτόνο δράση, ενώ έχει διαπιστωθεί και η αποτελεσματικότητά σε θεραπείες έναντι της καταπολέμηση του διαβήτη και της παχυσαρκίας (Andersen, 1996; Durairaj, 2005).

2.6. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο **σακχαρώδης διαβήτης** (*diabetes mellitus*) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεταβολικές διαταραχές του σύγχρονου κόσμου, με κύριο χαρακτηριστικό την υπεργλυκαιμία, δηλαδή την παθολογική αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα τόσο σε κατάσταση νηστείας όσο και μετά τα γεύματα. Η λέξη «διαβήτης» προέρχεται από τα αρχαία ελληνικά και σημαίνει «περνάω» ή «σιφόνι», ενώ ο όρος «σακχαρώδης» υποδηλώνει την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων στα ούρα των πασχόντων. Η χρόνια υπεργλυκαιμία σχετίζεται με σοβαρές βλάβες και δυσλειτουργίες σε ζωτικά όργανα και ιστούς, όπως ο αμφιβληστροειδής, τα νεφρά, τα νεύρα, η καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία, καθιστώντας τον μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως.

Η παθοφυσιολογία της νόσου σχετίζεται άμεσα με την ινσουλίνη, καθώς η διαταραχή προκύπτει είτε λόγω απόλυτης έλλειψης της ορμόνης είτε λόγω μειωμένης βιολογικής της δράσης. Ανάλογα με τον βαθμό και τον μηχανισμό ανεπάρκειας της ινσουλίνης, ο σακχαρώδης διαβήτης ταξινομείται σε διαφορετικούς τύπους. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (*type I diabetes mellitus*) αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα και χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων, με συνέπεια την απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης. Εμφανίζεται συχνότερα σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες και απαιτεί εφ' όρου ζωής εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για την επιβίωση των ασθενών. Αν και τα ακριβή αίτια δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, αποδίδεται τόσο σε γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Bhatnagar et al., 2006).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (*type II diabetes mellitus*) είναι η πιο διαδεδομένη μορφή, αντιπροσωπεύοντας το 90–95% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται από συνδυασμό σχετικής ανεπάρκειας ινσουλίνης και αντίστασης των ιστών στην δράση της. Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, όπου η παραγωγή ινσουλίνης είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη, στον διαβήτη τύπου II η ορμόνη εκκρίνεται, αλλά τα κύτταρα-στόχοι παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση. Κύριοι παράγοντες κινδύνου αποτελούν η παχυσαρκία, η κακή διατροφή, η έλλειψη σωματικής άσκησης και η κληρονομικότητα. Παρά το γεγονός

ότι η αντιμετώπιση βασίζεται αρχικά σε αλλαγές τρόπου ζωής και φαρμακευτικές θεραπείες, σε προχωρημένα στάδια μπορεί να καταστεί αναγκαία και η χορήγηση ινσουλίνης (Alam et al., 2014).

Η σημασία της έγκαιρης διάγνωσης και αποτελεσματικής ρύθμισης του σακχαρώδη διαβήτη είναι ιδιαίτερα μεγάλη, δεδομένου ότι η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία οδηγεί σε μακροχρόνιες επιπλοκές, οι οποίες επιβαρύνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής και αυξάνουν την θνησιμότητα. Η συνεχής μελέτη της φυσιολογίας και των παθολογικών διαταραχών της ινσουλίνης και του ρόλου της στην ρύθμιση της γλυκόζης παραμένει θεμελιώδης για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών (Bhatnagar et al., 2006; Alam et al., 2014).

2.7. Φαρμακευτικά σκευάσματα

Η ανακάλυψη της ινσουλίνης το 1921 από τους Banting και Best αποτέλεσε κομβικό σημείο για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη, μετατρέποντάς τον από θανατηφόρο σε χρόνια διαχειρίσιμη ασθένεια. Τα πρώτα φαρμακευτικά σκευάσματα προέρχονταν από εκχυλίσματα παγκρέατος βοοειδών και χοίρων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για δεκαετίες μέχρι την ανάπτυξη της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ινσουλίνης τη δεκαετία του 1980. Η χρήση ανασυνδυασμένης τεχνολογίας DNA επέτρεψε την παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης σε βακτήρια ή ζυμομύκητες, εξαλείφοντας τα προβλήματα ανοσογονικότητας και ακαθαρσιών που σχετίζονταν με τα ζωικά εκχυλίσματα (Weiss, 2009).

Πίνακας 2-2. Ανάλογα ινσουλίνης σε σύγκριση με την ανθρώπινη ινσουλίνη (πρώτη σειρά) (Πηγή: Beals et al., 2019).

Species	A21	B3	B28	B29	B30	B31	B32
Human Insulin (Humulin®, Novolin®, Afrezza®)	Asn	Asn	Pro	Lys	Thr	-	-
Insulin Lispro (Humalog®, Liprolog®, Admelog®)	Asn	Asn	Lys	Pro	Thr	-	-
Insulin Aspart (NovoRapid®, NovoLog®)	Asn	Asn	Asp	Lys	Thr	-	-
Insulin Glulisine (Apidra®)	Asn	Lys	Pro	Glu	Thr	-	-
Insulin Glargine (Lantus®, Basaglar®, Toujeo®)	Gly	Asn	Pro	Lys	Thr	Arg	Arg
Insulin Detemir (Levemir®)	Asn	Asn	Pro	Lys-(N-tetradecanoyl)	-	-	-
Insulin Degludec (Tresiba®)	Asn	Asn	Pro	Lys-(Nε-hexadecandioyl-γ-Glu)	-	-	-

Η ανάπτυξη των αναλόγων ινσουλίνης (*insulin analogues*) έχει αποτελέσει σημαντική πρόοδο στην θεραπεία. Με μικρές τροποποιήσεις στην αμινοξική τους αλληλουχία, τα ανάλογα αυτά επιτρέπουν τον έλεγχο της φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής τους συμπεριφοράς, βελτιώνοντας την απορρόφηση, την σταθερότητα και την προβλεψιμότητα της δράσης τους (**Πίνακας 2-2**).

Τα φαρμακευτικά σκευάσματα ινσουλίνης χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση τη φαρμακοκινητική τους. Οι βασικές κατηγορίες είναι τα ταχείας και υπερταχείας δράσης, τα ενδιάμεσης διάρκειας και τα βραδείας και υπερβραδείας δράσης. Οι κατηγορίες αυτές καθορίζονται από τον ρυθμό απορρόφησης και την παραμονή της ινσουλίνης στο κυκλοφορικό σύστημα, ο οποίος με την σειρά του εξαρτάται από την μοριακή διαμόρφωση, τον σχηματισμό εξαμερών και τις αλληλεπιδράσεις με συντηρητικές ουσίες ή ιόντα (Sreekanth et al., 2009). Οι ινσουλίνες ταχείας δράσης χορηγούνται υποδορίως και αρχίζουν να δρουν εντός 30–60 λεπτών, με μέγιστη δράση στις 2–4 ώρες. Αποτελούν κρυσταλλικά σκευάσματα ινσουλίνης σε ελαφρώς όξινο pH, σταθεροποιημένα με Zn^{2+} και φαινολικά συντηρητικά. Παρόλα αυτά, η σχετικά αργή

τους έναρξη σε σχέση με την φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης οδήγησε στην ανάπτυξη των αναλόγων υπερταχείας δράσης (όπως η Lispro, Aspart και Glulisine). Αυτά τα ανάλογα φέρουν τροποποιήσεις στην Β-αλυσίδα που αποτρέπουν τον σχηματισμό εξαμερών και διμερών, επιτρέποντας την ταχεία απορρόφηση στο κυκλοφορικό ως μονομερή (Weiss, 2009; Sreekanth et al., 2009). Οι ινσουλίνες ενδιάμεσης δράσης, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την ινσουλίνη NPH (*Neutral Protamine Hagedorn insulin*), προκύπτουν από τον σχηματισμό συμπλόκου ινσουλίνης με πρωταμίνη και ψευδάργυρο. Το ίζημα που σχηματίζεται σε ουδέτερο pH καθυστερεί την απορρόφηση, παρέχοντας δράση διάρκειας 12–18 ωρών. Οι ινσουλίνες βραδείας και υπερβραδείας δράσης έχουν σχεδιαστεί ώστε να μιμούνται τα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ινσουλίνες Glargine, Detemir και Degludec.

Εκτός από τα κλασικά διαλύματα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μικροκρυσταλλικά σκευάσματα ινσουλίνης, τα οποία βασίζονται στη φυσική ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει κρυστάλλους. Τα σκευάσματα αυτά προσφέρουν αυξημένη σταθερότητα, μειωμένη ευαισθησία σε αποικοδόμηση και δυνατότητα ελεγχόμενης αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας, ανάλογα με το μέγεθος και την μορφή των κρυστάλλων. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται πιο προβλέψιμη φαρμακοκινητική συμπεριφορά και δυνατότητα σχεδιασμού σκευασμάτων που καλύπτουν διαφορετικές θεραπευτικές ανάγκες. Οι μικροκρυστάλλοι επιτρέπουν υψηλότερη συγκέντρωση ινσουλίνης σε μικρότερο όγκο διαλύματος, κάτι που μειώνει τον όγκο των δόσεων μετά από κάθε γεύμα. Παράλληλα τα φαινολικά παράγωγα, πέρα από την συντηρητική και αντιμικροβιακή τους δράση, λειτουργούν και ως μοριακοί σταθεροποιητές, εξασφαλίζοντας την διατήρηση της R₆ διαμόρφωσης. Αυτή η σταθερότητα επιτρέπει την μακροχρόνια αποθήκευση και την διατήρηση της βιολογικής δραστικότητας των σκευασμάτων.

Συνολικά, η εξέλιξη των φαρμακευτικών σκευασμάτων ινσουλίνης δείχνει την πρόοδο τόσο της βιοτεχνολογίας όσο και της φαρμακοτεχνολογίας. Η κατανόηση του μοριακού πολυμορφισμού, του κρυσταλλικού πακεταρίσματος και των αλληλεπιδράσεων με συντηρητικές ουσίες έχει επιτρέψει την δημιουργία σκευασμάτων με διαφορετική φαρμακοκινητική και προσαρμοσμένων στις ανάγκες των ασθενών. Παρά την τεράστια πρόοδο, η έρευνα συνεχίζεται με στόχο την δημιουργία σκευασμάτων που θα μιμούνται όσο το δυνατόν πιο πιστά την φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης και θα βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη.

3. Λυσοζύμη

Η **λυσοζύμη** (*lysozyme*) αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα ένζυμα στην βιοϊατρική έρευνα και έχει καθιερωθεί ως πρότυπο μόριο στην Βιολογία. Πρόκειται για μια μικρή υδρολάση (EC 3.2.1.17) με έντονη βακτηριολυτική δράση, η οποία ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1922 (Fleming, 1922) και έκτοτε έχει συνδεθεί στενά με τους μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας. Η σπουδαιότητά της έγκειται όχι μόνο στην φυσιολογική της λειτουργία ως αντιμικροβιακό ένζυμο σε ποικίλες εκκρίσεις (δάκρυα, σάλιο, βλέννα, μητρικό γάλα), αλλά και στον θεμελιώδη ρόλο που διαδραμάτισε στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας, καθώς η τρισδιάστατη δομή της **λυσοζύμης από ασπράδι αυγού της όρνιθας** (*Hen Egg-White Lysozyme – HEWL*) ήταν η δεύτερη δομή πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω της περίθλασης ακτίνων-X (Blake et al., 1965) μετά την μυοσφαιρίνη (Kendrew et al., 1958) (Νόμπελ Χημείας 1962), σηματοδοτώντας την απαρχή της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών. Έκτοτε, η λυσοζύμη χρησιμοποιείται τόσο ως πρότυπο για την μελέτη δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών όσο και ως μόριο ενδιαφέροντος στους τομείς της υγείας και της βιομηχανίας (Ganz, 2006; Ferraboschi et al., 2021; Bergamo & Sava, 2023).

3.1. Βιοσύνθεση & Έκκριση

Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που απαντάται σε ζωικούς οργανισμούς, φυτά, βακτήρια και βακτηριοφάγους, με κύριο ρόλο την προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς. Στον άνθρωπο έχει ρόλο ως στοιχείο της έμφυτης ανοσίας και δρα συμπληρωματικά προς αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως οι αμυντίνες και οι καθελιδίνες (Ganz, 2006). Η βιοσύνθεση της λυσοζύμης πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα επιθηλιακά και εκκριτικά κύτταρα, αλλά και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού, ιδίως στα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, όπου αποθηκεύεται σε κοκκία και εκκρίνεται κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αντιδράσεων (Ferraboschi et al., 2021).

Η πρωτεΐνη παράγεται αρχικά ως προλυσοζύμη, με αλληλουχία σηματοδότη που διευκολύνει την μεταφορά της στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στην συνέχεια, η ώριμη μορφή (*mature lysozyme*) κατευθύνεται στο εκκριτικό μονοπάτι και απελευθερώνεται σε διάφορα βιολογικά υγρά. Χαρακτηριστικά, υψηλές συγκεντρώσεις λυσοζύμης ανιχνεύονται σε δάκρυα, σάλιο, βρογχικές εκκρίσεις, γαστρικά υγρά και στο μητρικό γάλα, όπου λειτουργεί ως βασική γραμμή άμυνας έναντι βακτηριακών λοιμώξεων και συμβάλλει στην διατήρηση της μικροβιακής ομοιόστασης (Khorshidian et al., 2022). Στο ασπράδι του αυγού όρνιθας, η λυσοζύμη αντιστοιχεί περίπου στο 3,5% της ολικής πρωτεΐνης, γεγονός που εξηγεί γιατί το συγκεκριμένο βιολογικό υλικό αποτέλεσε την κύρια πηγή απομόνωσης και μελέτης του ενζύμου.

Η έκκριση της λυσοζύμης φαίνεται να είναι προσαρμοσμένη στις φυσιολογικές ανάγκες κάθε ιστού. Για παράδειγμα, στους αδένες των δακρύων, η συνεχής παραγωγή εξασφαλίζει έναν προστατευτικό φραγμό έναντι πιθανής μικροβιακής επιμόλυνσης του οφθαλμού. Αντίστοιχα, στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό επιθήλιο, η λυσοζύμη απελευθερώνεται τόσο στον βασικό ρυθμό έκκρισης όσο και επαγόμενη από φλεγμονώδη ερεθίσματα, ενισχύοντας την τοπική αντιμικροβιακή άμυνα (Ganz, 2006). Η συνεργατική δράση της με άλλες πρωτεΐνες, όπως η λακτοφερρίνη, επιτρέπει την αποτελεσματική εξουδετέρωση ενός μεγάλου φάσματος βακτηρίων.

Επιπλέον, η παρουσία της λυσοζύμης στο ανθρώπινο μητρικό γάλα έχει ιδιαίτερη βιολογική σημασία, καθώς προσφέρει στο νεογνό μια επιπρόσθετη ανοσολογική προστασία σε περίοδο όπου το δικό του ανοσοποιητικό είναι ακόμη ανώριμο. Σε αυτό το πλαίσιο, η λυσοζύμη, μαζί με άλλες αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, λειτουργεί ως φυσική ασπίδα κατά των εντερικών παθογόνων και ταυτόχρονα συμβάλλει στην διαμόρφωση ενός υγιούς μικροβιώματος (Ferraboschi et al., 2021).

3.2. Μηχανισμός δράσης

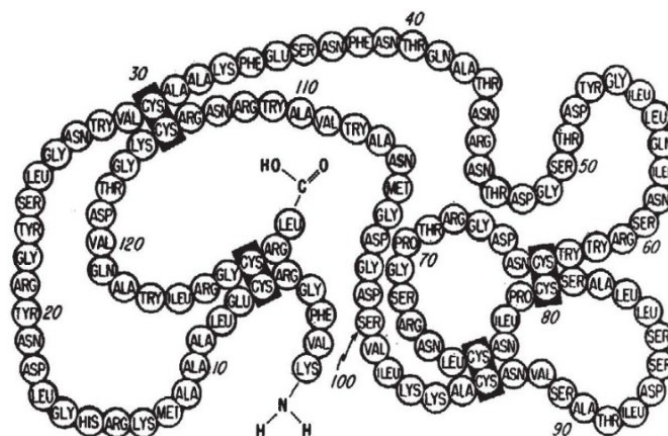
Η λυσοζύμη ανήκει στις γλυκοζιδάσες και δρα καταλύοντας την υδρόλυση του δεσμού β-1,4 μεταξύ της N-ακετυλογλυκοζαμίνης (GlcNAc) και του N-ακετυλομουραμικού οξέος (MurNAc) της πεπτιδογλυκάνης, το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (Khorshidian et al., 2022). Η ενζυμική αυτή δράση οδηγεί σε ωσμωτική αστάθεια και τελικά σε λύση του βακτηριακού κυττάρου. Η αποτελεσματικότητα είναι ιδιαίτερα έντονη έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων, λόγω της εκτεθειμένης στιβάδας πεπτιδογλυκάνης, αν και έχει καταδειχθεί ότι τροποποιήσεις της λυσοζύμης μπορούν να ενισχύσουν τη δράση της και έναντι Gram-αρνητικών μικροοργανισμών (Ferraboschi et al., 2021).

Ο καταλυτικός μηχανισμός της λυσοζύμης βασίζεται στην συνεργασία δύο αμινοξέων του ενεργού της κέντρου, του Glu35 και του Asp52. Το Glu35 δρα ως δότης και δέκτης πρωτονίων, ενώ το Asp52 συμβάλλει στην σταθεροποίηση του ενδιάμεσου σχηματισμού κατά την διάσπαση του γλυκοζιδικού δεσμού. Με αυτόν τον τρόπο, το ένζυμο επιτυγχάνει την υδρόλυση των δεσμών β-1,4 στην πεπτιδογλυκάνη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Held & van Smaalen, 2014). Επιπλέον, η ευκαμψία του ενεργού κέντρου, η οποία έχει αποδειχθεί με δομικές μελέτες, επιτρέπει στην λυσοζύμη να αναγνωρίζει και να δεσμεύει με ακρίβεια πολυσακχαρίτες διαφορετικής γεωμετρίας (Lanza et al., 2019). Αυτή η πλαστικότητα εξηγεί γιατί το ένζυμο διατηρεί υψηλή αποτελεσματικότητα απέναντι σε ένα ευρύ φάσμα βακτηριακών ειδών και γιατί αποτέλεσε πρότυπο μελέτης της σχέσης δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών.

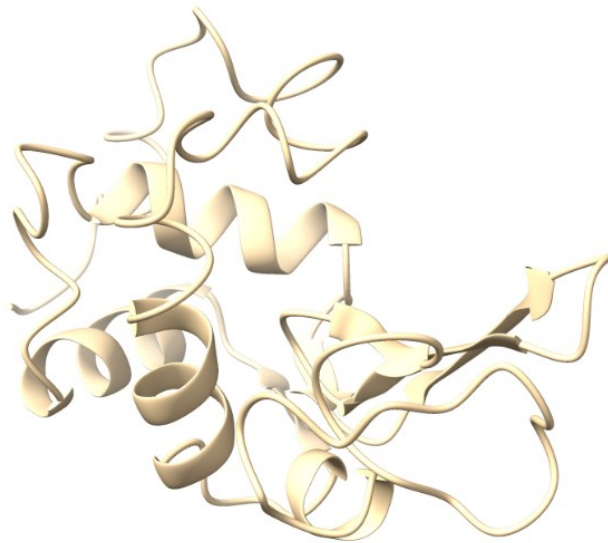
Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι η λυσοζύμη δεν περιορίζεται σε βακτηριολυτική δράση, καθώς φαίνεται να έχει και ανοσορρυθμιστικό ρόλο, επάγοντας την απελευθέρωση κυτταροκινών και την φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή (Bergamo & Sava, 2023). Ο συνδυασμός αυτών των δράσεων είναι που της δίνει ξεχωριστή σημασία στη σύγχρονη φαρμακευτική έρευνα.

3.3. Δομή της HEWL

Η HEWL είναι το πιο κλασικό και μελετημένο μέλος της οικογένειας των λυσοζυμών και έχει καθιερωθεί ως πρότυπο μόριο στην δομική βιολογία (Blake et al., 1965). Πρόκειται για μια μικρή πρωτεΐνη 14.3 kDa, που αποτελείται από 129 αμινοξέα (**Εικόνα 3-1**) και έχει ισοηλεκτρικό σημείο περίπου 11. Η πρωτοταγής δομή της χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία βασικών καταλοίπων, ενώ η δευτεροταγής δομή περιλαμβάνει έξι α-έλικες και ένα αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο (**Εικόνα 3-2**). Αυτές οι δομές οργανώνονται σε έναν σταθερό τριτοταγή πυρήνα, δημιουργώντας μια χαρακτηριστική αυλάκωση που φιλοξενεί το ενεργό κέντρο (Blake et al., 1965).



Εικόνα 3-1. Η πρωτοταγής δομή της HEWL (Πηγή: Blake et al., 1965).



Εικόνα 3-2. Η δευτεροταγής δομή της HEWL (PDB ID: 1lyz).

3.4. Μοριακός & Κρυσταλλικός πολυμορφισμός

Η λυσοζύμη αποτελεί ένα από τα πλέον χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεΐνης που εμφανίζει κρυσταλλικό πολυμορφισμό. Παρά το γεγονός ότι τριτοταγής της δομή διατηρείται σταθερή, οι διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης οδηγούν στην δημιουργία ποικίλων συμμετρικών διατάξεων, οι οποίες επηρεάζουν τον τρόπο πακεταρίσματος των μορίων χωρίς να αλλοιώνουν την βασική αρχιτεκτονική του ενζύμου.

Από τις πρώτες συγκριτικές μελέτες περιγράφηκαν τετραγωνικές, τρικλινείς, μονοκλινείς, ορθορομβικές και εξαγωνικές μορφές. Οι διαφορές ανάμεσά τους εντοπίζονται κυρίως σε επιφανειακές θηλιές και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων (Moult et al., 1976; Hogle et al., 1981; Artymiuk et al., 1982; Steinrauf, 1998). Ιδιαίτερα οι περιοχές 65–75 και 99–104 εμφανίζουν μεγαλύτερη ευκαμψία, δείχνοντας ότι ορισμένα τμήματα της πρωτεΐνης μπορούν να μετακινούνται πιο εύκολα σε διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές.

Μετάπειτα μελέτες έδειξαν ότι εξωτερικοί παράγοντες, όπως το pH, η ιοντική ισχύς και η παρουσία μονοσθενών ανιόντων, επηρεάζουν σημαντικά το κρυσταλλικό πολύμορφο (Vaney et al., 2001). Επίσης, η μεταβολή της σχετικής υγρασίας μπορεί να προκαλέσει αναστρέψιμες αλλαγές στον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας και στον τρόπο συσκευασίας των μορίων, φανερώνοντας τον δυναμικό χαρακτήρα των κρυστάλλων της λυσοζύμης (Dobrianov et al., 2001).

Η εξέλιξη της πειραματικής μεθοδολογίας συνέβαλε καθοριστικά στην μελέτη του πολυμορφισμού της λυσοζύμης. Η αξιοποίηση της τεχνικής XRPD και των πηγών ακτινοβολίας σύγχροτρον συνέβαλε επίσης στον χαρακτηρισμό δομών και εντοπισμό αλλαγών που συμβαίνουν λόγω της τροποποίησης περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η υγρασία. Στο πλαίσιο αυτό αναφέρθηκε για πρώτη φορά η εξαγωνική μορφή της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού γαλοπούλας με XRPD (Margiolaki et al., 2005) και χαρτογραφήθηκαν διαγράμματα φάσεων σε διαφορετικά pH (Basso et al., 2005). Επιπλέον, XRPD μελέτες έδειξαν ότι η σχετική υγρασία επηρεάζει σημαντικά μονοκλινείς και τετραγωνικούς κρυστάλλους HEWL, οδηγώντας σε μεταβολές των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας (Trampani et al., 2018; Logotheti et al., 2019).

Πιο πρόσφατα, η τρισδιάστατη περίθλαση ηλεκτρονίων (*3D electron diffraction*) με νανοδέσμες αποκάλυψε έναν νέο πολυμορφισμό, δείχνοντας ότι η λυσοζύμη μπορεί να σχηματίζει διαφορετικές διατάξεις ακόμη και σε νανοκρυστάλλους (Lanza et al., 2019). Το εύρημα αυτό εμπλουτίζει την εικόνα του πολυμορφισμού της λυσοζύμης και επιβεβαιώνει τη σημασία της ως πρότυπο μόριο για την μελέτη της ευκαμψίας και της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών.

Συνολικά, ο πολυμορφισμός της λυσοζύμης υπογραμμίζει την δυνατότητα του ενζύμου να διατηρεί τη λειτουργικότητά σε διάφορες κρυσταλλικές μορφές. Παράλληλα, προσφέρει στους ερευνητές ένα πρότυπο σύστημα για την κατανόηση των παραγόντων που διέπουν την οργάνωση των πρωτεϊνών σε κρυσταλλικές δομές, με άμεσες εφαρμογές στην βιοτεχνολογία και στην φαρμακευτική.

3.5. Λυσοζύμη & Παθοφυσιολογία

Η λυσοζύμη, πέρα του κλασικού της ρόλου ως βακτηριολυτικό ένζυμο, έχει συνδεθεί με σημαντικές πτυχές της φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας του ανθρώπινου οργανισμού. Ως βασικό συστατικό της έμφυτης ανοσίας, βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στις εκκρίσεις του αναπνευστικού, του γαστρεντερικού και του ουρογεννητικού συστήματος, όπου λειτουργεί ως φραγμός έναντι μικροβιακής εισβολής (Ganz, 2006). Παράλληλα, εκκρίνεται από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα κατά την ανοσολογική απόκριση, συμβάλλοντας τόσο στην βακτηριοκτόνο δράση όσο και στην ρύθμιση της φλεγμονώδους διεργασίας.

Στο πλαίσιο της παθοφυσιολογίας, μεταβολές στα επίπεδα της λυσοζύμης έχουν συνδεθεί με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους του αναπνευστικού, όπως η χρόνια βρογχίτιδα ή η κυστική ίνωση, έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις λυσοζύμης στις εκκρίσεις, ως αποτέλεσμα της αυξημένης ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων (Ganz, 2006). Αντίθετα, σε καταστάσεις ανοσοανεπάρκειας ή σε βαριά σήψη, η ανεπαρκής παραγωγή λυσοζύμης μπορεί να συμβάλει σε μειωμένη αντιμικροβιακή άμυνα. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι ενδείξεις ότι η λυσοζύμη εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία εντερικών φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα, πιθανώς μέσω της ρύθμισης της μικροβιακής ισορροπίας στο έντερο. Πέρα από την αντιμικροβιακή της δράση, έχει φανεί ότι η λυσοζύμη διαθέτει και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να επάγει την απελευθέρωση κυτταροκινών, να επηρεάζει την διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων και να συμμετέχει στην ομοιοστάση του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος (Bergamo & Sava, 2023). Αυτές οι ιδιότητες την καθιστούν όχι απλώς εκτελεστικό ένζυμο της έμφυτης ανοσίας, αλλά και ρυθμιστικό μόριο που συμμετέχει ενεργά στην διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης.

Επιπρόσθετα, η λυσοζύμη έχει συσχετιστεί με νεοπλασματικές διεργασίες. Έχει προταθεί ότι η αυξημένη έκφρασή της σε ορισμένους ιστούς μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η χρόνια φλεγμονώδης απάντηση που επάγεται μπορεί να συμβάλει σε προ-ογκογόνο μικροπεριβάλλον. Αν και οι μηχανισμοί αυτοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, η μελέτη της λυσοζύμης σε παθολογίες πέραν των λοιμώξεων αναδεικνύει τον πολυδιάστατο ρόλο της στην υγεία και την ασθένεια.

3.6. Φαρμακευτικές & Βιομηχανικές εφαρμογές

Η λυσοζύμη, πέραν της θεμελιώδους βιολογικής της σημασίας, έχει ευρύ πεδίο εφαρμογών στην φαρμακευτική, την ιατρική και την βιομηχανία τροφίμων.

Στην φαρμακευτική έρευνα, η λυσοζύμη έχει προταθεί ως εναλλακτική ή συμπληρωματική λύση στα αντιβιοτικά, ειδικά λόγω της αυξανόμενης αντοχής των παθογόνων (Ferraboschi et al., 2021). Με την

δράση της στην πεπτιδογλυκάνη στοχεύει επιλεκτικά τα βακτήρια χωρίς να επηρεάζει τα ευκαρυωτικά κύτταρα, κάτι που της δίνει καλό προφίλ ασφάλειας. Πρόσφατες μελέτες εξετάζουν τον συνδυασμό της με άλλα αντιμικροβιακά, όπως πεπτίδια ή αντιβιοτικά, ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα και να μειωθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης αντοχής. Πέρα από την βακτηριολυτική της δράση, η λυσοζύμη φαίνεται να έχει και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, καθώς μπορεί να επηρεάζει την φλεγμονώδη απόκριση, να ρυθμίζει την παραγωγή κυτταροκινών και να ενισχύει την έμφυτη ανοσία (Bergamo & Sava, 2023). Αυτά τα χαρακτηριστικά δημιουργούν προοπτικές για χρήση της σε θεραπείες χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων ή σε περιπτώσεις που χρειάζεται ενίσχυση της άμυνας χωρίς υπερβολική καταστολή του ανοσοποιητικού.

Στην βιομηχανία τροφίμων η λυσοζύμη χρησιμοποιείται ως φυσικό συντηρητικό. Στην τυροκομία εφαρμόζεται για την πρόληψη της ανάπτυξης του *Clostridium tyrobutyricum*, που προκαλεί το φαινόμενο καθυστερημένου φουσκώματος στα τυριά, εξασφαλίζοντας έτσι τη σταθερότητα των προϊόντων (Khorshidian et al., 2022). Επιπλέον, βρίσκει χρήση και σε άλλα τρόφιμα ή ποτά, αλλά και σε καλλυντικά, αξιοποιώντας την αντιμικροβιακή της δράση.

Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί και σε κλινικά σκευάσματα, όπως παστίλιες για τον λαιμό, οφθαλμικές σταγόνες και δερματολογικά προϊόντα, με στόχο την τοπική αντιμικροβιακή δράση και την μείωση της φλεγμονής. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, αλλά χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά της ως φαρμακευτικός παράγοντας στον άνθρωπο.

4. Στόχος της μελέτης

Ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εις βάθος διερεύνηση του μοριακού και κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης, με έμφαση στους παράγοντες που καθορίζουν την δομή και την σταθερότητά της. Συγκεκριμένα επιδιώκονται:

- Η ανάλυση και σύγκριση διαφορετικών πολυμόρφων της ινσουλίνης σε μοριακό και κρυσταλλικό επίπεδο, με στόχο την ανάδειξη διαφορών που σχετίζονται με τις συνθήκες κρυστάλλωσης και την παρουσία οργανικών προσδετών.
- Η αποσαφήνιση του ρόλου οργανικών φαινολικών παραγώγων (ρεσορσινόλης και 4-χλωρορεσορσινόλης) στην διαδικασία πολυμορφικού ελέγχου και στην διαμόρφωση νέων κρυσταλλικών μορφών, όπως η ταυτοποίηση του καινούριου πολυμόρφου $P2_{1(y)}$.
- Η αξιολόγηση της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως το pH και η σχετική υγρασία, στην σταθερότητα, στις πιθανές αναδιατάξεις και στις μεταβάσεις φάσης των πολυμόρφων. Οι μελέτες *in situ* υπό ελεγχόμενη σχετική υγρασία επεκτάθηκαν και στην λυσοζύμη από ασπράδι αυγού όρνιθας (HEWL), με στόχο την συγκριτική διερεύνηση της συμπεριφοράς διαφορετικών πρωτεϊνικών συστημάτων.
- Ο εντοπισμός βέλτιστων συνθηκών κρυστάλλωσης για την παραγωγή σταθερών και καλά διατεταγμένων κρυστάλλων, κατάλληλων για υψηλής ποιότητας κρυσταλλογραφικές μελέτες.
- Η διερεύνηση προτύπων σταθερότητας και συμπεριφοράς πρωτεϊνικών πολυμόρφων με άμεση συνάφεια προς την φαρμακευτική τεχνολογία, στο πλαίσιο του Σχεδιασμού Φαρμάκων Βάσει Δομής (*Structure-Based Drug Design - SBDD*).

Απώτερος σκοπός της εργασίας είναι η αξιοποίηση της γνώσης που προκύπτει για την ανάπτυξη νέων ή την βελτίωση υπαρχόντων φαρμακευτικών σκευασμάτων, με αυξημένη σταθερότητα και αποτελεσματικότητα.

5. Μελέτη του μοριακού και κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία οργανικών προσδετών

Ένας από τους άξονες μελέτης της ερευνητικής ομάδας Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας και Κρυσταλλογραφίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών¹ είναι η συστηματική διερεύνηση του πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης (HI) και η κατανόηση των παραγόντων που τον επηρεάζουν, με στόχο την ανακάλυψη νέων οργανικών προσδετών που θα μπορούσαν να συμβάλουν στη βελτίωση της χορήγησης και της αποτελεσματικότητας των αντιδιαβητικών φαρμάκων. Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης εξετάστηκε ο μοριακός και κρυσταλλικός πολυμορφισμός της HI παρουσία των οργανικών προσδετών ρεσορσινόλης (*resorcinol*, *rco*) και 4-χλωρορεσορσινόλης (*4-chlororesorcinol*, *chl*) σε διαφορετικές συνθήκες pH, με σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης των συγκεκριμένων μορίων στη διαμόρφωση της κρυσταλλικής δομής της ινσουλίνης. Η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων περίθλασης ακτίνων-X από πολυκρυσταλλικά δείγματα (XRPD), με μετρήσεις που διεξήχθησαν τόσο στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο όσο και στον πειραματικό σταθμό ID22 του Ευρωπαϊκού Σύγχροτρου στην Γκρενόμπλ, Γαλλία. Μερικά από τα δεδομένα περίθλασης αναλύθηκαν περαιτέρω και αποτελούν τα πρωταρχικά βήματα της επίλυσης δομής του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_1(\beta)$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης από δεδομένα XRPD. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλώσεις και συλλογή μονοκρυστάλλων, που στόχευαν στην συλλογή δεδομένων SCXRD (P13 / DESY & ID23-2 / ESRF) του νέου κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_1(\gamma)$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης.

5.1. Υλικά & Μέθοδοι

5.1.1. Πειράματα κρυστάλλωσης

Η μελέτη του κρυσταλλικού πολυμορφισμού της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία των οργανικών προσδετών ρεσορσινόλη και 4-χλωρορεσορσινόλη πραγματοποιήθηκε με την διεξαγωγή πειραμάτων κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου batch (καθίζηση μέσω αλάτων - *salting-out*; Hofmeister, 1888) ως προς την παραγωγή πολυκρυσταλλικών δειγμάτων. Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές συγκρυστάλλωσης ανθρώπινη ινσουλίνη και ρεσορσινόλης (Σειρές 7, 8 και 9) και μια σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης (Σειρά 5). Το πρωτόκολλο κρυστάλλωσης που ακολουθήθηκε έχει εφαρμοστεί σε προηγούμενες μελέτες συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης με οργανικούς προσδέτες (Karavassili et al., 2012; Valmas et al., 2015; Fili et al., 2015; Triandafillidis, Parthenios et al., 2020; Spiliouroulou et al., 2021) και παραχωρήθηκε από την προμηθεύτρια εταιρεία της ανθρώπινης ινσουλίνης *Novo Nordisk*. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και δύο πειράματα κρυστάλλωσης μέσω της μεθόδου διάχυσης ατμών με σκοπό την δημιουργία μονοκρυστάλλων ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης.

5.1.1.1. Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο batch

7^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Η έβδομη σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2023 και αποτελούταν από 20 δείγματα.

¹ <https://sites.google.com/view/margiolaki-biology-upat/home>

Η διαδικασία ξεκίνησε με την παραγωγή του διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε διάλυμα HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και όγκου 10 mL, διαλύοντας 190 mg λυοφιλοποιημένης σκόνης HI σε δις απεσταγμένο νερό (double distilled water, ddH₂O). Στο διάλυμα HI προστέθηκε όγκος 1.15 mL διαλύματος οξικού ψευδαργύρου (zinc acetate, ZnAc₂) συγκέντρωσης 10 mM, ώστε να δημιουργηθούν τα εξαμερή ινσουλίνης. Στο διάλυμα εξαμερών ινσουλίνης προστέθηκε όγκος 0.596 mL διαλύματος ρεσορσινόλης συγκέντρωσης **1 M** (η ρεσορσινόλη διαλύθηκε σε καθαρή αιθανόλη) και επήλθε αναμονή πέντε λεπτών με σκοπό να υπάρξει σίγουρη πρόσδεση της ρεσορσινόλης στα εξαμερή ινσουλίνης. Μετά την παύση πέντε λεπτών, προστέθηκε όγκος 0.15 mL θειοκυανιούχου νατρίου (sodium thiocyanate, NaSCN) συγκέντρωσης 1 M, με σκοπό την σταθεροποίηση των εξαμερών HI και ρεσορσινόλης. Το τελικό διάλυμα πρωτεΐνης που προέκυψε είχε τελικό όγκο 11.896 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 5-1**.

Πίνακας 5-1. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την 7^η σειρά κρυστάλλωσης παρουσία ρεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης						
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	HI	ZnAc ₂	rco	Αναμονή 5'	NaSCN
Αρχική συγκέντρωση	20	19 mg/mL	10 mM	1 M		1 M
Αρχικός όγκος		10 mL	1.150 mL	0.596 mL		0.150 mL
Τελική συγκέντρωση		15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM		12.6 mM
Τελικό όγκος		11.896 mL				

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών διένυδρου δισόξινου φωσφορικού νατρίου (monosodium phosphate dihydrate, NaH₂PO₄ · 2H₂O) συγκέντρωσης 2 M και όξινου φωσφορικού καλίου (dipotassium phosphate, K₂HPO₄) συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 20 ρυθμιστικά διαλύματα (PO₄ buffers) που κυμαίνονταν σε τιμές pH 4.10 – 8.20.

Για την παρασκευή κάθε πολυκρυσταλλικού δείγματος της σειράς, αναμείχθηκαν 0.5 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.125 mL του PO₄ buffer για όλες τις τιμές pH. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.625 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 5-2**.

Πίνακας 5-2. Η σύσταση του κάθε διαλύματος κρυστάλλωσης για την 7^η σειρά κρυστάλλωσης.

Διάλυμα κρυστάλλωσης					
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	rco	NaSCN	PO ₄ buffer
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM	2 M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	40.06 mM	10.09 mM	0.4 M
Τελικός όγκος	0.625 mL				

Κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε με μοναδικό κωδικό, όπου τα τρία αρχικά γράμματα υποδηλώνουν τον προσδέτη (resorcinol – rco), ο πρώτος αριθμός, εν προκειμένω 7, αντιστοιχεί στη σειρά κρυστάλλωσης και ο επόμενος στον αύξοντα αριθμό του δείγματος. Όσο αυξάνεται ο αριθμός δείγματος αυξάνεται και η τιμή pH (**Πίνακας 5-3**).

Πίνακας 5-3. Κωδικοί δειγμάτων και αρχικές τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα της 7^{ης} σειράς κρυστάλλωσης.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH
-------------------	----------------

rco71	4.10
rco72	4.20
rco73	4.30
rco74	4.50
rco75	4.80
rco76	5.00
rco77	5.50
rco78	6.00
rco79	6.50
rco710	7.00
rco711	7.20
rco712	7.40
rco713	7.50
rco714	7.60
rco715	7.70
rco716	7.80
rco717	7.90
rco718	8.00
rco719	8.10
rco720	8.20

8^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Η όγδοη σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2023 και αποτελούταν από 15 δείγματα.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την παραγωγή του διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε διάλυμα HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και όγκου 7.5 mL, διαλύοντας 142.5 mg λυοφιλοποιημένης σκόνης HI σε ddH₂O. Στο διάλυμα HI προστέθηκε όγκος 0.863 mL διαλύματος ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM, ώστε να δημιουργηθούν τα εξαμερή ινσουλίνης. Στο διάλυμα εξαμερών ινσουλίνης προστέθηκε όγκος 0.445 mL διαλύματος ρεσορσινόλης συγκέντρωσης **2 M** (η ρεσορσινόλη διαλύθηκε σε καθαρή αιθανόλη) και επήλθε αναμονή πέντε λεπτών με σκοπό να υπάρξει σίγουρη πρόσδεση της ρεσορσινόλης στα εξαμερή ινσουλίνης. Μετά την παύση πέντε λεπτών, προστέθηκε όγκος 0.113 mL NaSCN συγκέντρωσης 1 M, με σκοπό την σταθεροποίηση των εξαμερών HI και ρεσορσινόλης. Το τελικό διάλυμα πρωτεΐνης που προέκυψε είχε τελικό όγκο 8.921 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 5-4**.

Πίνακας 5-4. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την 8^η σειρά κρυστάλλωσης παρουσία ρεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης					
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	HI	ZnAc ₂	rco	NaSCN
Αρχική συγκέντρωση	15	19 mg/mL	10 mM	2 M	1 M
Αρχικός όγκος		7.5 mL	0.863 mL	0.445 mL	0.113 mL
Τελική συγκέντρωση		15.97 mg/mL	0.97 mM	100.2 mM	12.6 mM
Τελικό όγκος		8.921 mL			

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 2 M και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 15 ρυθμιστικά διαλύματα (PO₄ buffers) που κυμαίνονταν σε τιμές pH 4.10 – 8.20.

Για την παρασκευή κάθε πολυκρυσταλλικού δείγματος της σειράς, αναμείχθηκαν 0.5 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.125 mL του PO₄ buffer για όλες τις τιμές pH. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.625 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 5-5**.

Πίνακας 5-5. Η σύσταση του κάθε διαλύματος κρυστάλλωσης για την 8^η σειρά κρυστάλλωσης.

Διάλυμα κρυστάλλωσης					
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	rco	NaSCN	PO ₄ buffer
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	100.2 mM	12.6 mM	2 M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	80.14 mM	10.09 mM	0.4 M
Τελικός όγκος	0.625 mL				

Κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε με μοναδικό κωδικό, όπου τα τρία αρχικά γράμματα υποδηλώνουν τον προσδέτη (resorcinol – rco), ο πρώτος αριθμός, εν προκειμένω 8, αντιστοιχεί στη σειρά κρυστάλλωσης και ο επόμενος στον αύξοντα αριθμό του δείγματος. Όσο αυξάνεται ο αριθμός δείγματος αυξάνεται και η τιμή pH (**Πίνακας 5-6**).

Πίνακας 5-6. Κωδικοί δειγμάτων και αρχικές τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα της 8^{ης} σειράς κρυστάλλωσης.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH
rco81	4.10
rco82	4.20
rco83	4.30
rco84	4.40
rco85	4.50
rco86	4.80
rco87	5.00
rco88	5.50
rco89	6.00
rco810	6.50
rco811	7.00
rco812	7.30
rco813	7.60
rco814	8.00
rco815	8.20

9^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Η ένατη σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2025 και αποτελούταν από 20 δείγματα.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την παραγωγή του διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε διάλυμα HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και όγκου 10 mL, διαλύοντας 190 mg λυοφιλοποιημένης σκόνης HI σε ddH₂O. Στο διάλυμα HI προστέθηκε όγκος 1.15 mL διαλύματος ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM, ώστε να δημιουργηθούν τα εξαμερή ινσουλίνης. Στο διάλυμα εξαμερών ινσουλίνης προστέθηκε όγκος 0.596 mL διαλύματος ρεσορσινόλης συγκέντρωσης **2 M** (η ρεσορσινόλη διαλύθηκε σε καθαρή αιθανόλη) και επήλθε αναμονή πέντε λεπτών με σκοπό να υπάρξει σίγουρη πρόσδεση της ρεσορσινόλης στα εξαμερή ινσουλίνης. Μετά την παύση πέντε λεπτών, προστέθηκε όγκος 0.15 mL NaSCN συγκέντρωσης 1 M, με

σκοπό την σταθεροποίηση των εξαμερών HI και ρεσορσινόλης. Το τελικό διάλυμα πρωτεΐνης που προέκυψε είχε τελικό όγκο 11.896 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 5-7**.

Πίνακας 5-7. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την 9^η σειρά κρυστάλλωσης παρουσία ρεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης					
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	HI	ZnAc ₂	rco	NaSCN
Αρχική συγκέντρωση	20	19 mg/mL	10 mM	2 M	1 M
Αρχικός όγκος		10 mL	1.150 mL	0.596 mL	0.150 mL
Τελική συγκέντρωση		15.97 mg/mL	0.97 mM	100.2 mM	12.6 mM
Τελικό όγκος		11.896 mL			

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 2 M και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 20 ρυθμιστικά διαλύματα (PO₄ buffers) που κυμαίνονταν σε τιμές pH 4.20 – 8.00.

Για την παρασκευή κάθε πολυκρυσταλλικού δείγματος της σειράς, αναμείχθηκαν 0.5 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.125 mL του PO₄ buffer για όλες τις τιμές pH. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.625 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 5-8**.

Πίνακας 5-8. Η σύσταση του κάθε διαλύματος κρυστάλλωσης για την 9^η σειρά κρυστάλλωσης.

Διάλυμα κρυστάλλωσης					
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	rco	NaSCN	PO ₄ buffer
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	100.2 mM	12.6 mM	2 M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	80.14 mM	10.09 mM	0.4 M
Τελικός όγκος	0.625 mL				

Κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε με μοναδικό κωδικό, όπου τα τρία αρχικά γράμματα υποδηλώνουν τον προσδέτη (resorcinol – rco), ο πρώτος αριθμός, εν προκειμένω 9, αντιστοιχεί στη σειρά κρυστάλλωσης και ο επόμενος στον αύξοντα αριθμό του δείγματος. Όσο αυξάνεται ο αριθμός δείγματος αυξάνεται και η τιμή pH (**Πίνακας 5-9**).

Πίνακας 5-9. Κωδικοί δειγμάτων και αρχικές τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα της 9^{ης} σειράς κρυστάλλωσης.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH
rco91	4.20
rco92	4.30
rco93	4.40
rco94	4.50
rco95	4.60
rco96	4.70
rco97	4.80
rco98	4.90
rco99	5.00
rco910	5.10
rco911	5.30

rco912	5.60
rco913	5.90
rco914	6.20
rco915	6.50
rco916	6.80
rco917	7.10
rco918	7.40
rco919	7.70
rco920	8.00

5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης

Η πέμπτη σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2025 και αποτελούταν από 20 δείγματα.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την παραγωγή του διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε διάλυμα HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και όγκου 10 mL, διαλύοντας 190 mg λυοφιλοποιημένης σκόνης HI σε ddH₂O. Στο διάλυμα HI προστέθηκε όγκος 1.15 mL διαλύματος ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM, ώστε να δημιουργηθούν τα εξαμερή ινσουλίνης. Στο διάλυμα εξαμερών ινσουλίνης προστέθηκε όγκος 0.596 mL διαλύματος 4-χλωρορεσορσινόλης συγκέντρωσης 1 M (η 4-χλωρορεσορσινόλη διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο - DMSO) και επήλθε αναμονή πέντε λεπτών με σκοπό να υπάρξει σίγουρη πρόσδεση της 4-χλωρορεσορσινόλης στα εξαμερή ινσουλίνης. Μετά την παύση πέντε λεπτών, προστέθηκε όγκος 0.15 mL NaSCN συγκέντρωσης 1 M, με σκοπό την σταθεροποίηση των εξαμερών HI και ρεσορσινόλης. Το τελικό διάλυμα πρωτεΐνης που προέκυψε είχε τελικό όγκο 11.896 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 5-10**.

Πίνακας 5-10. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την 5^η σειρά κρυστάλλωσης παρουσία 4-χλωρορεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης					
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	HI	ZnAc ₂	chl	NaSCN
Αρχική συγκέντρωση	20	19 mg/mL	10 mM	1 M	1 M
Αρχικός όγκος		10 mL	1.150 mL	0.596 mL	0.150 mL
Τελική συγκέντρωση		15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM
Τελικό όγκος		11.896 mL			

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 2 M και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 20 ρυθμιστικά διαλύματα (PO₄ buffers) που κυμαίνονταν σε τιμές pH 4.20 – 8.00.

Για την παρασκευή κάθε πολυκρυσταλλικού δείγματος της σειράς, αναμείχθηκαν 0.5 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.125 mL του PO₄ buffer για όλες τις τιμές pH. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.625 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 5-11**.

Πίνακας 5-11. Η σύσταση του κάθε διαλύματος κρυστάλλωσης για την 5^η σειρά κρυστάλλωσης.

Διάλυμα κρυστάλλωσης					
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	chl	NaSCN	PO ₄ buffer
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM	2 M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	40.06 mM	10.09 mM	0.4 M

Κάθε δείγμα χαρακτηρίστηκε με μοναδικό κωδικό, όπου τα τρία αρχικά γράμματα υποδηλώνουν τον προσδέτη (4-chlororesorcinol – chl), ο πρώτος αριθμός, εν προκειμένω 5, αντιστοιχεί στη σειρά κρυστάλλωσης και ο επόμενος στον αύξοντα αριθμό του δείγματος. Όσο αυξάνεται ο αριθμός δείγματος αυξάνεται και η τιμή pH (**Πίνακας 5-12**).

Πίνακας 5-12. Κωδικοί δειγμάτων και αρχικές τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα της 5^{ης} σειράς κρυστάλλωσης.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH
chl51	4.20
chl52	4.40
chl53	4.60
chl54	4.80
chl55	5.00
chl56	5.20
chl57	5.40
chl58	5.60
chl59	5.80
chl510	6.00
chl511	6.20
chl512	6.50
chl513	6.60
chl514	6.80
chl515	7.00
chl516	7.20
chl517	7.40
chl518	7.60
chl519	7.80
chl520	8.00

5.1.1.2. Πειράματα κρυστάλλωσης με την μέθοδο διάχυσης ατμών

Τα πειράματα κρυσταλλώσεων ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη ρεσορσινόλη που πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο διάχυσης ατμών, και συγκεκριμένα με την τεχνική καθήμενης σταγόνας, ήταν δύο και διεξάχθηκαν τον Μάιο 2024 και τον Απρίλιο 2025.

Πείραμα κρυστάλλωσης (Μάιος 2024)

Η διαδικασία ξεκίνησε με την προετοιμασία του διαλύματος πρωτεΐνης. Για την παρασκευή 160 μL διαλύματος πρωτεΐνης αναμείχθηκαν 106.2 μL HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και 15.8 μL ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM για τον σχηματισμό των εξαμερών ινσουλίνης. Έπειτα προστέθηκαν 8.2 μL ρεσορσινόλης (διαλυμένης σε καθαρή αιθανόλη) συγκέντρωσης 2 M και έγινε παύση πέντε λεπτών ώστε να εξασφαλισθεί η πρόσδεσή της στις φαινολικές θέσεις πρόσδεσης. Στην συνέχεια προστέθηκαν 2.1 μL NaSCN συγκέντρωσης 1 M για την σταθεροποίηση των εξαμερών και τελικά συμπληρώθηκε όγκος 27.8 μL ddH₂O (**Πίνακας 5-13**). Το τελικό μείγμα είχε λόγο συγκεντρώσεων [HI] : [ZnAc₂] : [ρεσορσινόλη] : [NaSCN] = 2.2 : 1 : 104 : 13, διαφέροντας από την κλασσική αναλογία 2.2 : 1 : 52 : 13, καθώς στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η δημιουργία μονοκρυστάλλων συγκεκριμένου πολυμόρφου

ανθρώπινης ινσουλίνης, προσομοιάζοντας τα πρωτόκολλα κρυστάλλωσης των σειρών πολυκρυσταλλικών δειγμάτων 8 και 9.

Πίνακας 5-13. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την συγκρυστάλλωση ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης						
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	rco	5 min pause	NaSCN	ddH ₂ O
Αρχική συγκέντρωση	19 mg/mL	10 mM	2 M		1 M	
Αρχικός όγκος	106.2 μ L	15.8 μ L	8.2 μ L		2.1 μ L	27.8 μ L
Τελική συγκέντρωση	12.6 mg/mL	0.986 mM	102.54 mM		12.82 mM	
Τελικός όγκος	160 μ L					

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την δημιουργία των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων. Έτσι, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 2 M και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 3 ρυθμιστικά διαλύματα (PO₄ buffers) με τιμές pH 4.40, 4.60 και 4.80.

Πίνακας 5-14. Οι συνθήκες των παραγόντων καθίζησης παρουσιάζονται ανά εννιάδα. Κάθε μία από τις τρεις εννιάδες περιέχει ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, με μοναδική διαφορά το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH= 4.40, 4.60 και 4.80).

0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄	+ PO ₄
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄	
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄	
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
+ ZnAc ₂						

Πίνακας 5-15. Οι συνθήκες των παραγόντων καθίζησης παρουσιάζονται ανά εννιάδα. Στις συγκεκριμένες εννιάδες προστέθηκε και ρεσορσινόλη στα τελικά διαλύματα παραγόντων καθίζησης. Κάθε μία από τις τρεις εννιάδες περιέχει ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, με μοναδική διαφορά το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH= 4.40, 4.60 και 4.80).

0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄	+ PO ₄
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco	
0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄	
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco	
0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄	
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂	
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco	
+ ZnAc ₂						

Εξετάστηκαν συνολικά 54 διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες ομαδοποιούνται σε ομάδες των εννέα συνθηκών, στις οποίες τροποποιούνται οι τελικές συγκεντρώσεις των PO₄ buffers (0.3 ή 0.4 ή 0.5 M) και του ZnAc₂ (1 ή 2 ή 3 mM). Εκτός αυτού, αποφασίστηκε επιπλέον στις τρεις από τις έξι εννιάδες να γίνει προσθήκη ρεσορσινόλης με τελική συγκέντρωση 25 mM. Τέλος όλες οι συνθήκες περιείχαν NaSCN τελικής συγκέντρωσης 9 mM. Οι συνθήκες των παραγόντων καθίζησης αναγράφονται στους Πίνακες 5-14 & 5-15.

Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε σε plate κρυσταλλώσεων 96 θέσεων, ειδικά σχεδιασμένο για την τεχνική καθήμενης σταγόνας. Κάθε θέση παρέχει τη δυνατότητα εναπόθεσης δύο σταγόνων κρυστάλλωσης. Κάθε δεξαμενή (reservoir) γέμισε με 80 µL διαλύματος παραγόντων καθίζησης. Σε κάθε θέση σταγόνας πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 1 µL διαλύματος πρωτεΐνης και 1 µL διαλύματος παραγόντων καθίζησης από την δεξαμενή, δηλαδή με αναλογία 1:1.

Πείραμα κρυστάλλωσης (Απρίλιος 2025)

Η διαδικασία ξεκίνησε με την προετοιμασία του διαλύματος πρωτεΐνης. Για την παρασκευή 120 µL διαλύματος πρωτεΐνης αναμείχθηκαν 79.6 µL HI συγκέντρωσης 19 mg/mL και 11.8 µL ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM για τον σχηματισμό των εξαμερών ινσουλίνης. Έπειτα προστέθηκαν 6.2 µL ρεσορσινόλης (διαλυμένης σε καθαρή αιθανόλη) συγκέντρωσης 2 M και έγινε παύση πέντε λεπτών ώστε να εξασφαλισθεί η πρόσδεσή της στις φαινολικές θέσεις πρόσδεσης. Στην συνέχεια προστέθηκαν 1.5 µL NaSCN συγκέντρωσης 1 M για την σταθεροποίηση των εξαμερών και τελικά συμπληρώθηκε όγκος 20.8 µL ddH₂O (Πίνακας 5-16). Το τελικό μείγμα είχε και σε αυτήν την περίπτωση λόγο συγκεντρώσεων [HI] : [ZnAc₂] : [ρεσορσινόλη] : [NaSCN] = 2.2 : 1 : 104 : 13.

Πίνακας 5-16. Το διάλυμα πρωτεΐνης (protein mix) για την συγκρυστάλλωση ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης						
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	rco	5 min pause	NaSCN	ddH ₂ O
Αρχική συγκέντρωση	19 mg/mL	10 mM	2 M		1 M	
Αρχικός όγκος	79.6 µL	11.8 µL	6.2 µL		1.5 µL	20.8 µL
Τελική συγκέντρωση	12.6 mg/mL	0.986 mM	102.54 mM		12.82 mM	
Τελικός όγκος	120 µL					

Πίνακας 5-17. Οι συνθήκες των παραγόντων καθίζησης παρουσιάζονται ανά εννιάδα. Κάθε μία από τις τρεις εννιάδες περιέχει ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, με μοναδική διαφορά το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH= 4.40, 4.60 και 4.80).

0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄	0.3 M	PO ₄
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco
0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄	0.4 M	PO ₄
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco
0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄	0.5 M	PO ₄
1 mM	ZnAc ₂	2 mM	ZnAc ₂	3 mM	ZnAc ₂
9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN	9 mM	NaSCN
25 mM	rco	25 mM	rco	25 mM	rco

+ PO₄

+ ZnAc₂

Το επόμενο βήμα περιλάμβανε την δημιουργία των ρυθμιστικών διαλυμάτων φωσφορικών αλάτων. Έτσι, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH_2PO_4 συγκέντρωσης 2 M και K_2HPO_4 συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθούν 3 ρυθμιστικά διαλύματα (PO_4 buffers) με τιμές pH 4.40, 4.60 και 4.80.

Εξετάστηκαν συνολικά 27 διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες ομαδοποιούνται σε ομάδες των εννέα συνθηκών, στις οποίες τροποποιούνται οι τελικές συγκεντρώσεις των PO_4 buffers (0.3 ή 0.4 ή 0.5 M) και του ZnAc_2 (1 ή 2 ή 3 mM). Επιπλέον αποφασίστηκε να γίνει προσθήκη ρεσορσινόλης με τελική συγκέντρωση 25, και τέλος όλες οι συνθήκες περιείχαν NaSCN τελικής συγκέντρωσης 9 mM. Οι συνθήκες των παραγόντων καθίζησης αναγράφονται στον **Πίνακα 5-17**.

Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα κρυστάλλωσης, η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε σε plate κρυσταλλώσεων 96 θέσεων, ειδικά σχεδιασμένο για την τεχνική καθήμενης σταγόνας. Κάθε δεξαμενή γέμισε με 80 μL διαλύματος παραγόντων καθίζησης. Σε κάθε θέση σταγόνας πραγματοποιήθηκε ανάμειξη 1 μL διαλύματος πρωτεΐνης και 1 μL διαλύματος παραγόντων καθίζησης από την δεξαμενή (αναλογία 1:1).

5.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

5.1.2.1. Προετοιμασία πολυκρυσταλλικών δειγμάτων

Πριν από τη συλλογή δεδομένων XRPD, τα πολυκρυσταλλικά δείγματα μεταφέρονται σε τριχοειδείς σωλήνες από βοριοπυριτικό γυαλί (*borosilicate glass capillaries*) διαμέτρου 1 mm και πάχους 0.1 mm, οι οποίοι διαθέτουν κλειστό άκρο και ανοιχτό, πεπλατυσμένο στόμιο που διευκολύνει την πλήρωσή τους. Αρχικά, στο capillary προστίθεται μικρή ποσότητα μητρικού υγρού (*mother liquor*), ώστε οι κρύσταλλοι να μεταφερθούν στο περιβάλλον όπου αναπτύχθηκαν. Στη συνέχεια, μεταφέρεται αρκετή ποσότητα με πιπέτα, τόση ώστε να γεμίσει το capillary (~20 μL). Το capillary φυγοκεντρείται στις 4000 rpm ώστε οι κρύσταλλοι να συσσωρευθούν στο κατώτερο άκρο του. Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζει πιο συμπαγή πακετάρισμα των κρυστάλλων και καλύτερη ποιότητα δεδομένων περίθλασης. Το πεπλατυσμένο άκρο του capillary αποκόπτεται ώστε αυτό να έχει την ίδια διάμετρο σε όλο το μήκος του, ενώ στην συνέχεια αφαιρείται το περίσσιο μητρικό υγρό εξασφαλίζοντας ελάχιστο για την διατήρηση των κρυστάλλων. Στη συνέχεια, το ανοιχτό άκρο του capillary σφραγίζεται με γράσο σιλικόνης ή κερί, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του υπολειπόμενου υγρού και να σταθεροποιηθεί το δείγμα. Τέλος, το capillary στερεώνεται στο γωνιόμετρο του περιθλασιμέτρου και πραγματοποιείται ευθυγράμμιση (*alignment*), ώστε το δείγμα να βρίσκεται στο κέντρο της δέσμης ακτίνων-X. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, τα capillaries περιστρέφονται γύρω από τον άξονά τους για την εξασφάλιση ομοιογενούς κατανομής έντασης των δακτυλίων Debye-Scherrer.

5.1.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων μονοκρυστάλλων

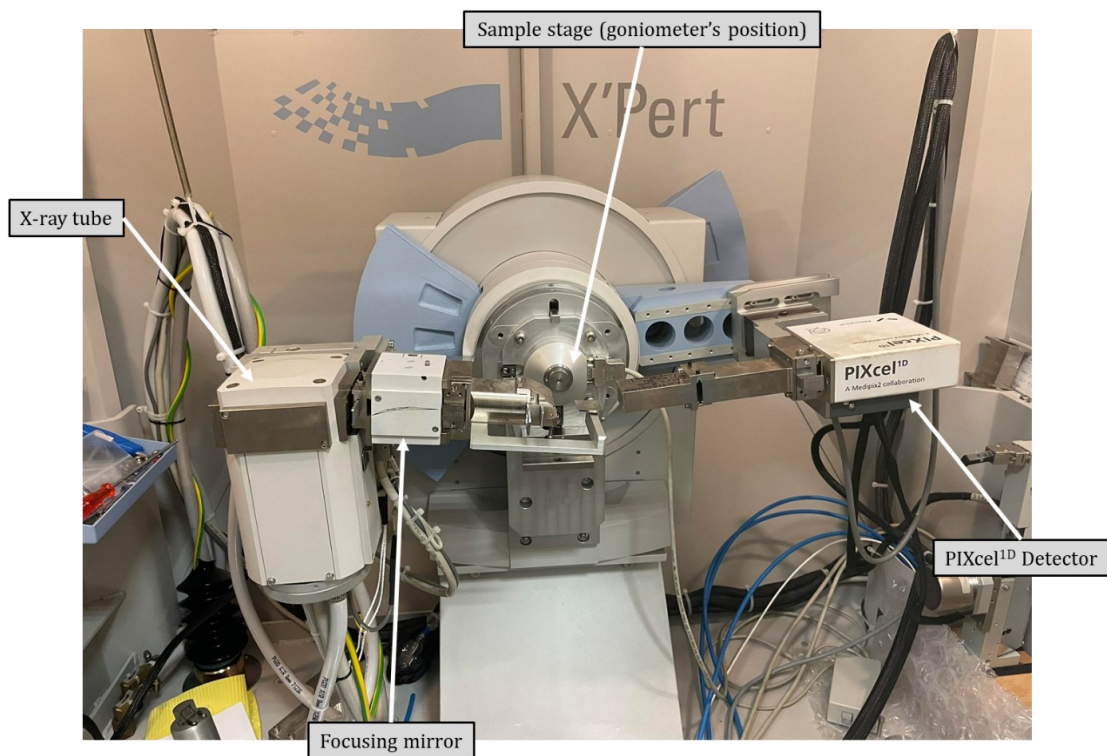
Η προετοιμασία των δειγμάτων μονοκρυστάλλων ξεκινά με το ψάρεμα κρυστάλλων (*crystal fishing*). Το plate κρυστάλλωσης τοποθετείται σε στερεοσκόπιο που επιτρέπει στον ερευνητή να διακρίνει τα μεγέθη των μονοκρυστάλλων, και έπειτα ψαρεύονται κρύσταλλοι διεισδύοντας στις σταγόνες κρυστάλλωσης με ειδικές θηλίες (*loops*) διαφόρων μεγεθών (0.025 – 0.2 μm). Αφού ψαρευτεί ένας μονοκρύσταλλος, εμβαπτίζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα, το οποίο έχει δημιουργηθεί από την ανάμειξη των συνθηκών παραγόντων καθίζησης, στις οποίες αναπτύχθηκε, και γλυκερόλης με αναλογία συνήθως 4:1 (20% γλυκερόλη – ή και 25%, ανάλογα με το αν παρατηρείται ψύξη του κρυοπροστατευτικού διαλύματος οπότε και απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητά της). Τέλος, η θηλιά με τον εμβαπτισμένο στο κρυοπροστατευτικό μονοκρύσταλλο τοποθετείται σε ειδικό puck (*Unipuck* ή *SPINE puck*) υποδοχής της, το οποίο βρίσκεται εντός υγρού άζωτου. Έτσι, οι κρύσταλλοι βρίσκονται αποθηκευμένοι σε υγρό άζωτο μέχρι και την στιγμή του πειράματος περίθλασης.

5.1.3. Συλλογή δεδομένων περίθλασης

5.1.3.1. Εργαστηριακό περιθλασίμετρο (X'Pert Pro, Malvern PANalytical)

Η συλλογή δεδομένων περίθλασης πολυκρυσταλλικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro της Malvern Panalytical, με σκοπό να γίνει ένας πρωταρχικός χαρακτηρισμός των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων. Η παραγωγή ακτίνων X γίνεται μέσω σωλήνα ακτίνων X με δυναμικό επιτάχυνσης 40 kV και ένταση ρεύματος 45 mA. Ο στόχος της ανόδου είναι χαλκού, παρέχοντας χαρακτηριστική ακτινοβολία K α με μήκος κύματος $\lambda = 1.540585(3)$ Å. Το περιθλασίμετρο λειτουργεί σε γεωμετρία Debye–Scherrer, στην οποία η πηγή παραμένει σταθερή και κινείται ο ανιχνευτής, ο οποίος συλλέγει την περιθλούσα δέσμη σε γωνία 2θ ως προς το δείγμα. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται ο ψηφιακός ανιχνευτής εικονοστοιχείων PIXcel^{1D}, τεχνολογίας photon-counting, ο οποίος μετατρέπει τα προσπίπτοντα φωτόνια σε ηλεκτρικά σήματα και στην συνέχεια σε ψηφιακή εικόνα του μοτίβου περίθλασης.

Ανάμεσα στην πηγή και το δείγμα παρεμβάλλονται οπτικά στοιχεία που διαμορφώνουν την προσπίπτουσα δέσμη. Αυτά είναι ένα κάτοπτρο εστίασης (*focusing mirror*) σε συνδυασμό με σχισμή αντισκέδασης $1/2^\circ$ (*antiscatter slit*), σχισμή soller 0.04 rad (*soller slit*), μάσκα 10 mm (*beam mask*) και σχισμή απόκλισης $1/2^\circ$ (*divergence slit*). Τα στοιχεία αυτά διασφαλίζουν την εστίαση και την ευθυγράμμιση της δέσμης στο capillary. Πιο συγκεκριμένα το anti-scatter περιορίζει την ανεπιθύμητη σκέδαση, το soller slit μειώνει την αξονική απόκλιση βελτιώνοντας τη συμμετρία των κορυφών, ενώ το divergence slit ελέγχει το άνοιγμα της δέσμης ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος και τη γωνία σάρωσης, ενώ το beam mask καθορίζει το αξονικό πλάτος της δέσμης ώστε να προσαρμόζεται στο μέγεθος του δείγματος (**Εικόνα 5-1**).



Εικόνα 5-1. Η διάταξη του εργαστηριακού περιθλασιμέτρου X'Pert Pro στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

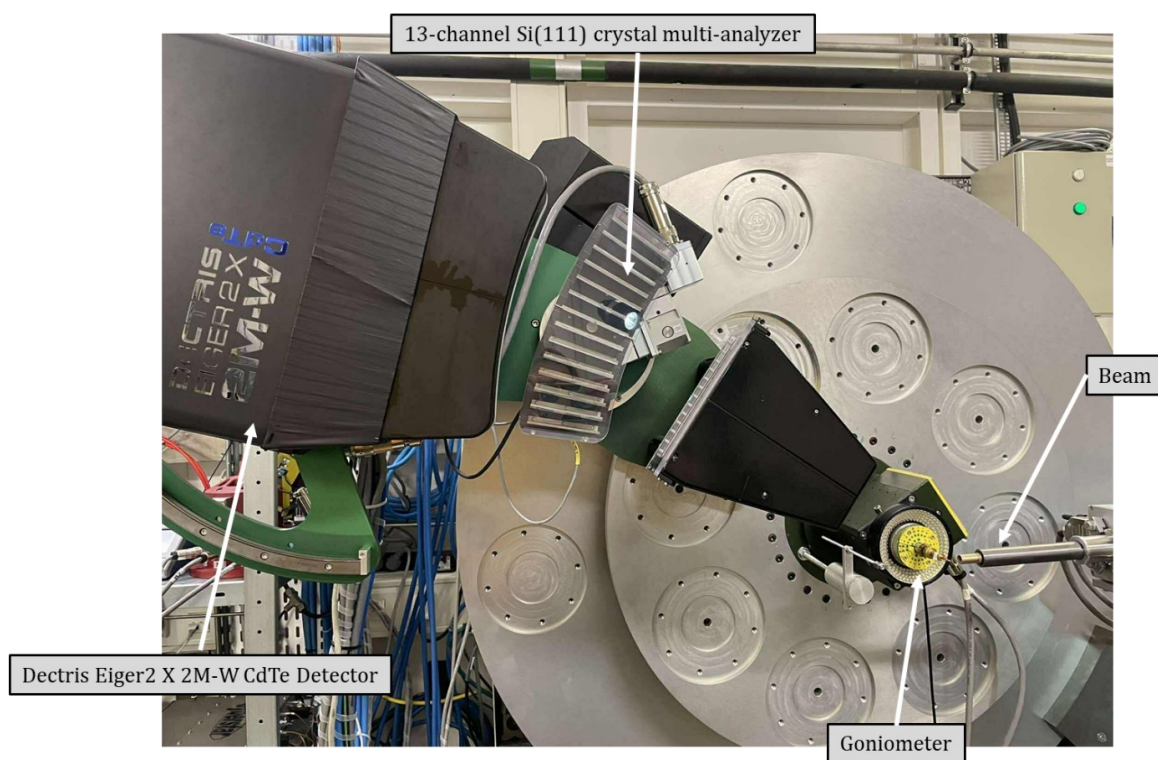
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για 25 συνεχόμενες σαρώσεις σε μία θέση του capillary, σε εύρος γωνίας 2θ από 0° έως 30° , με κάθε σάρωση διάρκειας 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Η έναρξη της σάρωσης από 0° κατέστη δυνατή χάρη στο beamstop που ενσωματώνεται στη διάταξη του κατόπτρου

εστίασης, προστατεύοντας τον ανιχνευτή. Ο συνολικός χρόνος μέτρησης για κάθε δείγμα υπολογίζεται περίπου στις 12.5 ώρες. Στο τέλος οι επιμέρους σαρώσεις αθροίζονται για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (*signal to noise ratio*, *S/N ratio*). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της συλλογής δεδομένων με το εργαστηριακό περιθλασίμετρο είναι πως δεν παρατηρείται καταπόνηση λόγω ακτινοβόλησης (*radiation damage*) στο δείγμα λόγω της χαμηλής σε ένταση ακτινοβολία που παράγει η πηγή ακτίνων-X, με αποτέλεσμα να αρκεί η μέτρηση του δείγματος σε μόνο μία θέση κάθε φορά. Τα μοτίβα περίθλασης παρουσιάζουν ευρύτερες κορυφές συγκριτικά με τις μετρήσεις σύγχροτρον, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον συνδυασμό δεδομένων από εργαστηριακές και σύγχροτρον μετρήσεις για τον βέλτιστο δομικό χαρακτηρισμό.

5.1.3.2. Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτρον – Πειραματικός σταθμός ID22

Η 7^η και η 8^η σειρά συγκρυστάλλωσης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης μετρήθηκαν κατά την διάρκεια beamtime τον Ιούλιο 2023, ενώ η 9^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης και η 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης μετρήθηκαν κατά την διάρκεια άλλου beamtime τον Ιούλιο 2025, στην Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτρον (*European Synchrotron Radiation Facility*, *ESRF*) στην Γκρενόμπλ της Γαλλίας.

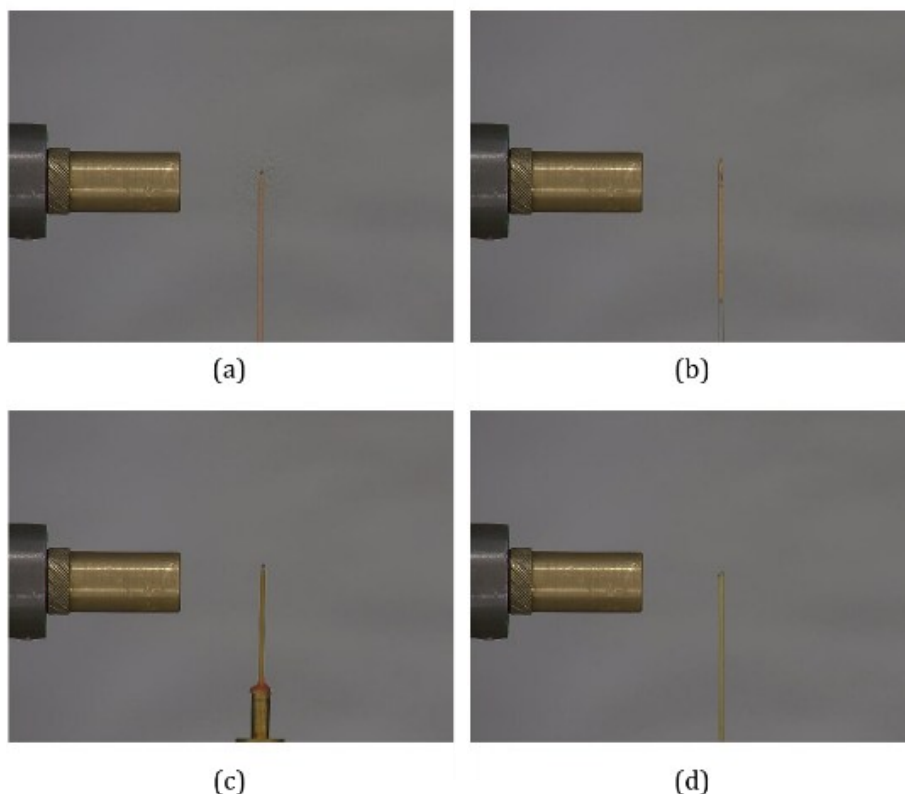
Το ESRF, μετά την αναβάθμιση του EBS (*Extremely Bright Source*), λειτουργεί ως σύγχροτρον τέταρτης γενιάς, με δακτύλιο αποθήκευσης ηλεκτρονίων ενέργειας έως και 6 GeV, γεγονός που αυξάνει δραστικά τη λαμπρότητα της ακτινοβολίας. Η νέα αναβαθμισμένη διάταξη ενσωματώνει μεγαλύτερο αριθμό μαγνητών σε σχέση με τον προηγούμενο σχεδιασμό, μειώνει δραστικά το οριζόντιο μέγεθος της δέσμης και την απόκλιση της πηγής. Έτσι, καθίσταται δυνατή η συλλογή δεδομένων υψηλής ανάλυσης με βελτιωμένα στατιστικά.



Εικόνα 5-2. Η διάταξη του περιθλασιμέτρου στον πειραματικό σταθμό ID22 στο ESRF (Dejoie et al., 2018; Fitch et al., 2023).

Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό υψηλής ανάλυσης περίθλασης πολυκρυσταλλικών δειγμάτων (*High Resolution Powder Diffraction Beamline*) ID22 (Fitch, 2004; Dejoie et al., 2018; Fitch 2019; Fitch et al., 2023), ο οποίος είναι αποκλειστικά αφιερωμένος σε πειράματα

περίθλασης πολυκρυσταλλικών δειγμάτων. Διαθέτει ενεργειακό εύρος 6 έως 75 keV. Κεντρικό στοιχείο του σταθμού είναι η υψηλή γωνιακή ευκρίνεια (*angular resolution*), γεγονός που τον καθιστά κατάλληλο για την συλλογή δεδομένων από πρωτεΐνες (Margiolaki & Wright, 2008). Ο σταθμός διαθέτει έναν σύγχρονο ανιχνευτή εικονοστοιχείων, τον Dectris Eiger2 X 2M-W CdTe με υψηλή αξονική διακριτική ικανότητα, ο οποίος επιτρέπει καλύτερη διόρθωση των αξονικών αποκλίσεων (*axial divergence*) και μειώνει τα φαινόμενα αλληλοεπικάλυψης κορυφών. Στο σύστημα ανίχνευσης, είναι επίσης εγκατεστημένος ένας πολυαναλυτής 13 καναλιών κρυστάλλων Si(111) (*Si(111) multi-analyzer*), με αποτέλεσμα οι κορυφές να καθίστανται εξαιρετικά οξείες και συμμετρικές και οι θέσεις τους ανεξάρτητες από γεωμετρικές εκτροπές ή μετατοπίσεις δείγματος (**Εικόνα 5-2**) (Fitch et al., 2023; Dejoie et al., 2018). Χάρη σε αυτά τα χαρακτηριστικά, ο σταθμός ID22 μπορεί να αποδώσει μοτίβα περίθλασης πολύ υψηλής ποιότητας, κρίσιμα για την επίλυση και τον χαρακτηρισμό πολύμορφων πρωτεϊνικών δειγμάτων.



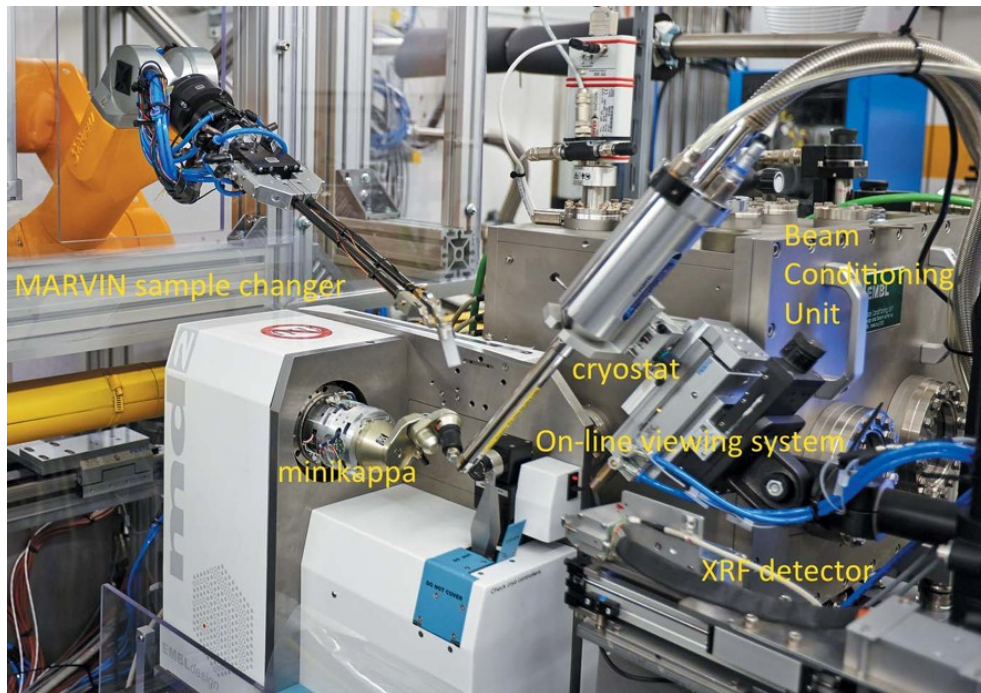
Εικόνα 5-3. Τα δείγματα (a) chl53, (b) chl515, (c) rco918 και (d) rco920 φορτωμένα σε capillaries και τοποθετημένα στο γωνιόμετρο λίγο πριν την εκκίνηση της μέτρησής τους.

Η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πολλές διαφορετικές θέσεις κατά μήκος του εκάστοτε δείγματος. Η μέτρηση κάθε θέσης διαρκούσε 1', και κάθε φορά ακολουθούσε μετατόπιση του δείγματος κατά 1.1 mm, ώστε το δείγμα να ακτινοβοληθεί στην επόμενη θέση. Η μετατόπιση γινόταν λόγω του υψηλού radiation damage που υφίστανται τα δείγματα, κάτι που φαίνεται μετά από λίγα δευτερόλεπτα στα διαγράμματα περίθλασης μέσω ακραίων μετατοπίσεων κορυφών, διεύρυνσης κορυφών, μοτίβο περίθλασης που υποδηλώνει την αμορφοποίηση του δείγματος. Το μήκος κύματος για το beamtime του Ιουλίου 2023 ορίστηκε ως $\lambda = 1.3007899(8) \text{ \AA}$, ενώ για το beamtime του Ιουλίου 2025 ορίστηκε ως $\lambda = 1.07817(3) \text{ \AA}$. Τα δείγματα περιστρέφονταν κατά 1031 rpm και η συλλογή πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (**Εικόνα 5-3**). Ο ανιχνευτής κινούταν στο εύρος 0° έως 30° γωνία περίθλασης 2θ γύρω από το δείγμα.

5.1.3.3. Γερμανικό Σύγχροτρον (PETRA III – Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY) – Πειραματικός σταθμός P13

Η συλλογή δεδομένων μονοκρυστάλλων, που προέκυψαν από την κρυστάλλωση του Μαΐου 2024, πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό P13 τον Ιούνιο του 2024. Ο πειραματικός σταθμός αποτελεί μέρος του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (*European Molecular Biology Laboratory – EMBL*), του Γερμανικού Σύγχροτρον (*PETRA III – Deutsches Elektronen-Synchrotron DESY*) στο Αμβούργο της Γερμανίας.

Ο πειραματικός σταθμός P13 είναι αφιερωμένος στη μακρομοριακή κρυσταλλογραφία, με ρυθμιζόμενη ενέργεια δέσμης 4–17.5 keV και μικροεστίαση μέσω οπτικών Kirkpatrick–Baez (μεταβλητό μέγεθος δέσμης τάξης δεκάδων μm). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο EIGER 16M, ένας ανιχνευτής εικονοστοιχείων δύο διαστάσεων. Η φόρτωση των δειγμάτων έγινε αυτόματα με την χρήση του ρομποτικού βραχίονα MARVIN (**Εικόνα 5-4**) (Cianci et al., 2017).



Εικόνα 5-4. Το περιβάλλον του πειραματικού σταθμού P13. Απεικονίζονται η διάταξη του περιθλασιμέτρου, ο κρυοστάτης αζώτου και ο ρομποτικός βραχίονας MARVIN (Πηγή: Cianci et al., 2017).

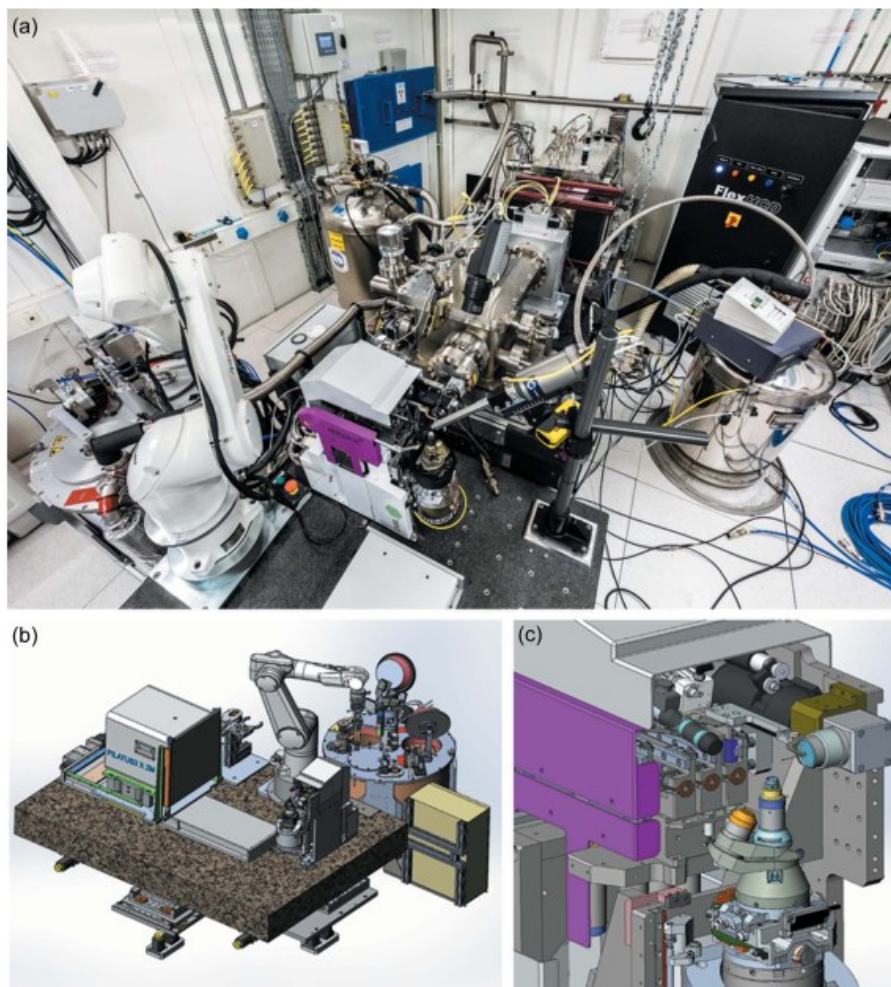
Η συλλογή πραγματοποιήθηκε εξ αποστάσεως μέσω της πλατφόρμας MXCuBE (Gabadinho et al., 2010), με αυτόματη καταγραφή στο σύστημα διαχείρισης πληροφοριών ISPyB (Delagenière et al., 2011). Το μήκος κύματος ορίστηκε ως $\lambda = 0.976200 \text{ \AA}$ και για κάθε μονοκρύσταλλο λήφθηκαν συνολικά 2400 ή 3600 εικόνες, σε εύρος περιστροφής κάθε μονοκρυστάλλου από 0° έως $180^\circ/360^\circ$. Τέλος, κάθε μονοκρύσταλλος μετρήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (100 K) μέσω συνεχούς ροής αζώτου (N_2 cryostream).

5.1.3.4. Ευρωπαϊκή Εγκατάσταση Ακτινοβολίας Σύγχροτρον – Πειραματικός σταθμός ID23-2

Η συλλογή δεδομένων μονοκρυστάλλων, οι οποίοι προέκυψαν από το πείραμα κρυστάλλωσης του Απριλίου 2025, πραγματοποιήθηκε στον πειραματικό σταθμό ID23-2 τον Ιούνιο του 2025. Ο πειραματικός σταθμός βρίσκεται στο ESRF, στην Γκρενόμπλ της Γαλλίας.

Και αυτός ο πειραματικός σταθμός είναι αφιερωμένος στην μακρομοριακή κρυσταλλογραφία. Παρέχει μικροδέσμη σταθερής ενέργειας 14.2 keV, με υψηλή ροή φωτονίων (άνω των 10^{13} φωτόνια ανά δευτερόλεπτο), καθιστώντας τον έτσι έναν πειραματικό σταθμό κατάλληλο για μέτρηση μικρών μονοκρυστάλλων. Ο σταθμός είναι εξοπλισμένος με περιθλασίμετρο MD3-UP, το οποίο έχει εγκατεστημένο ένα γωνιόμετρο mini-kappa. Το φόρτωμα των δειγμάτων έγινε μέσω του συστήματος FLEX-HCD, και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο DECTRIS EIGER X 9M, ένας υβριδικός ανιχνευτής εικονοστοιχείων δύο διαστάσεων (Εικόνα 5-5) (Nanao et al., 2022).

Η συλλογή πραγματοποιήθηκε και πάλι μέσω του συστήματος MXCuBE και τα δεδομένα καταγράφηκαν στο σύστημα διαχείρισης πληροφοριών ISPyB. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το μήκος κύματος είναι σταθερό $\lambda = 0.873128 \text{ \AA}$.



Εικόνα 5-5. (a) Το περιβάλλον του πειραματικού σταθμού ID23-2, (b) το περιθλασίμετρο MD3-UP, ο ανιχνευτής και το σύστημα FLEX-HCD και (c) κοντινή λήψη του περιθλασιμέτρου MD3-UP (Πηγή: Nanao et al., 2022).

5.1.4. Επεξεργασία & Ανάλυση δεδομένων περίθλασης

Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων XRPD πραγματοποιήθηκαν με την χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων HighScore Plus (Degen et al., 2014), DASH (Shankland et al., 2006), PRODD (Wright & Forsyth, 2000; Wright, 2004) και WinPLOTR (Roisnel & Rodriguez-Carvajal, 2001).

Η διαδικασία ξεκινάει με την υπέρθεση (*overplot*) των προφίλ περίθλασης με σκοπό να γίνει μια πρώτη ποιοτική ομαδοποίηση των σετ δεδομένων περίθλασης. Κατά την υπέρθεση, η οποία πραγματοποιήθηκε στα προγράμματα HighScore Plus και WinPLOTR, εισάγονται σετ δεδομένων γνωστών φάσεων ώστε να γίνει σύγκριση των θέσεων των κορυφών και να υπάρξει μια αρχική εκτίμηση

της συμμετρίας. Κατά την σύγκριση προφίλ περίθλασης που συλλέχθηκαν με το ίδιο μήκος κύματος, η ομαδοποίηση γίνεται συναρτήσει της γωνίας περίθλασης 2θ , ενώ κατά την σύγκριση με προφίλ περίθλασης που δεν συλλέχθηκαν με το ίδιο μήκος κύματος η σύγκριση γίνεται συναρτήσει του Q -spacing, το οποίο ορίζεται ως:

$$Q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

με σκοπό να είναι συγκρίσιμες οι θέσεις των κορυφών των προφίλ περίθλασης. Εκτός από την υπέρθεση δημιουργούνται και διαγράμματα επιφάνειας (*surface plots*), τα οποία πρόκεινται για μία «κάτοψη» όλων των προφίλ περίθλασης που συγκρίνονται, ώστε ομοίως να βγουν συμπεράσματα της συμμετρίας των δειγμάτων.

Η ανάλυση ξεκινάει με τον ορισμό του **υποβάθρου** (*background*) και του μήκους κύματος με το οποίο έγινε η συλλογή δεδομένων. Ο ορισμός του υποβάθρου συμβάλλει στην εύρεση των εντάσεων των κορυφών και απορρίπτει καταγεγραμμένο σήμα το οποίο οφείλεται σε θόρυβο (αέρα, υλικό του δειγματοφορέα κ.λπ.). Στην συνέχεια, κατά την **δεικτοδότηση** (*indexing*) επιλέγονται οι πρώτες κορυφές του προφίλ (~ 20) με σκοπό να αποδοθεί σε κάθε κορυφή περίθλασης ένα set δεικτών Miller (*hkl*). Η επιλογή των πρώτων κορυφών γίνεται είτε αυτόματα μέσω του ορισμού του δείκτη ελάχιστης σημασίας (*minimum significance*) είτε από τον ίδιο τον χρήστη. Μετά από αυτό το στάδιο, επιλέγεται η μέθοδος δεικτοδότησης η οποία εκτελείται μέσω των αλγορίθμων DICVOL, DICVOL04 (Boultif & Louër, 1991), TREOR (Werner et al., 1985), ITO, MCMAILLE (Le Bail, 2004), ώστε να δοθούν μερικές πιθανές τιμές στις πλεγματικές παραμέτρους, οι οποίες θα μπορούσαν να προσδιορίσουν την μοναδιαία κυψελίδα. Η επιλογή της λύσης γίνεται μέσω της αξιολόγησης του στατιστικού δείκτη FOM (*Figure Of Merit*) από τον χρήστη και συγκεκριμένα όσο πιο υψηλός είναι τόσο πιο πιθανή είναι η λύση ου απέδωσε αλγόριθμος. Έτσι, γίνεται ανάθεση του space group το οποίο να εξηγεί καλύτερα το προφίλ περίθλασης και υπολογίζονται πρωταρχικά οι τιμές των πλεγματικών σταθερών που ορίζουν την μοναδιαία κυψελίδα. Η δεικτοδότηση πραγματοποιήθηκε μέσω των προγραμμάτων HighScore Plus και DASH.

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται η **βελτιστοποίηση** (*refinement*). Η ανάλυση των προφίλ περίθλασης έγινε κατά **Pawley** (*Pawley Fit*) (Pawley, 1981). Η συγκεκριμένη μέθοδος βελτιστοποιεί τις πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας, τις παραμέτρους που σχετίζονται με το σχήμα των κορυφών, το υπόβαθρο και τα μέτρα των εντάσεων με την μέθοδο ελάχιστων τετραγώνων. Πρακτικά, αυτό που κάνει ο χρήστης είναι να εκτελεί διαδοχικούς κύκλους βελτιστοποίησης ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη συμφωνία της καμπύλης των πειραματικών δεδομένων και της καμπύλης του θεωρητικού προφίλ που υπολογίζεται. Για τον υπολογισμό του θεωρητικού προφίλ χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση pseudo-Voigt, με πλάτος στο ήμισυ του μέγιστου (*Full Width at Half Maximum - FWHM*) που υπολογίστηκε κατά Caglioti, Paoletti και Ricci (Caglioti et al., 1958), καθώς και τύπο ασυμμετρίας (*asymmetry type*) σύμφωνα με το μοντέλο των Finger, Cox και Jephcoat (Finger et al., 1994). Η ανάλυση κατά Pawley πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα HighScore Plus.

Η μεγαλύτερη δυνατή ελαχιστοποίηση των διαφορών μεταξύ πειραματικού και θεωρητικού προφίλ είναι ο απώτερος στόχος της βελτιστοποίησης. Ένας στατιστικός δείκτης που χρησιμοποιείται για να κριθεί αυτή η συγκυρία είναι ο επιβαρυσμένος παράγοντας αξιοπιστίας (*Weighted Reliability Factor - R_{wp}*), ο οποίος αποδίδει μεγαλύτερη βαρύτητα στις περιοχές με κορυφές. Ο R_{wp} υπολογίζεται ως:

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum w(2\theta)[y_o(2\theta) - y_c(2\theta)]^2}{\sum w(2\theta)[y_o(2\theta)]^2}}$$

όπου y_o οι πειραματικές τιμές εντάσεων, y_c οι υπολογισμένες τιμές εντάσεων και $w(2\theta)$:

$$w(2\theta) = \frac{1}{\sigma_{y_o}^2(2\theta)}$$

Ιδανικά η τιμή του R_{wp} πρέπει να προσεγγίζει την τιμή του αναμενόμενου παράγοντα αξιοπιστίας (Expected Reliability Factor – R_{exp}), ο οποίος εξαρτάται από την ποιότητα των δεδομένων. Ο R_{exp} υπολογίζεται ως:

$$R_{exp} = \sqrt{\frac{n - p + r}{\sum w(2\theta)[y_o(2\theta)]^2}}$$

όπου n ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων, p ο αριθμός των παραμέτρων που βελτιστοποιούνται και r ο αριθμός των περιορισμών που χρησιμοποιούνται κατά την βελτιστοποίηση. Παράλληλα παρακολουθείται και ο στατιστικός δείκτης χ^2 ο οποίος ορίζεται ως:

$$\chi^2 = \left(\frac{R_{wp}}{R_{exp}}\right)^2$$

και όσο πιο κοντά φτάνει στην τιμή 1, δηλαδή ταυτίζονται οι δυο δείκτες αξιοπιστίας, τόσο καλύτερη προσαρμογή έχει το θεωρητικό προφίλ στο πειραματικό (Spilioroulou, Triandafillidis et al., 2020).

Τελικά, τα δεδομένα ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης μονοκλινούς συμμετρίας και συγκεκριμένα φάσης $P2_{1(\beta)}$ της 7ης σειράς συγκρυστάλλωσης, αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω του υπολογιστικού προγράμματος PRODD, σε μια συνδυαστική ανάλυση κατά Pawley (*Multi-Pawley refinement*), με σκοπό να εξαχθούν πιο αξιόπιστες τιμές πλεγματικών σταθερών και εντάσεων για την επίλυση της δομής του συγκεκριμένου πολυμόρφου από δεδομένα XRPD.

Όσον αφορά τα δεδομένα περίθλασης SCXRD, η πρωταρχική επεξεργασία και ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα XDS (Kabsch, 2010) και AIMLESS (Evans, 2011).

5.2. Αποτελέσματα

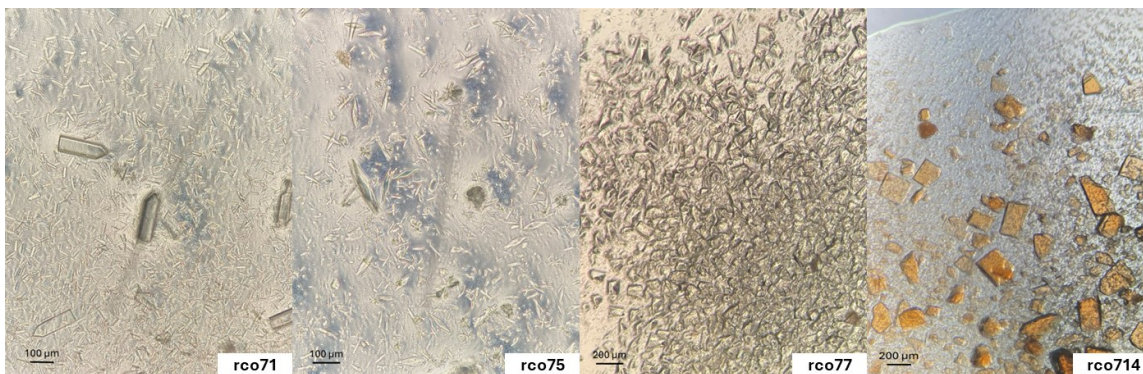
5.2.1. Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη ρεσορσινόλη

Κατά την ανάλυση όλων των διαφορετικών σετ δεδομένων που προέκυψαν από τις τρεις σειρές συγκρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν, επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός πέντε διαφορετικών κρυσταλλικών φάσεων: $P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\alpha)}$, $C222_1$, $C2$ και $P2_{1(\beta)}$.

7η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Αρχικά, η παρατήρηση των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων με οπτική μικροσκοπία ανέδειξε την ετερογένειά τους, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή εμφάνιση διαφορετικών κρυσταλλικών πολυμόρφων σε όλο το εύρος των συνθηκών pH (**Εικόνα 5-6**). Οι διαφοροποιήσεις στην μορφολογία των κρυστάλλων αντανακλούν την σημασία του pH ως καθοριστικό παράγοντα για την εμφάνιση συγκεκριμένων πολυμόρφων, γεγονός που αποτέλεσε το πρώτο ποιοτικό στοιχείο για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων.

Ο συνολικός χρόνος κρυστάλλωσης των δειγμάτων της συγκεκριμένης σειράς ήταν 43 ημέρες και υπολογίζεται από την ημερομηνία της κρυστάλλωσης μέχρι την ημερομηνία μέτρησης των δειγμάτων. Να σημειωθεί ότι πριν από την μέτρηση, γίνεται η μέτρηση της τιμής pH του κάθε δείγματος. Έτσι, όλα τα αποτελέσματα έχουν ερμηνευθεί βάσει αυτών των τιμών, οι οποίες είναι και πιο αντιπροσωπευτικές (**Πίνακας 5-18**).

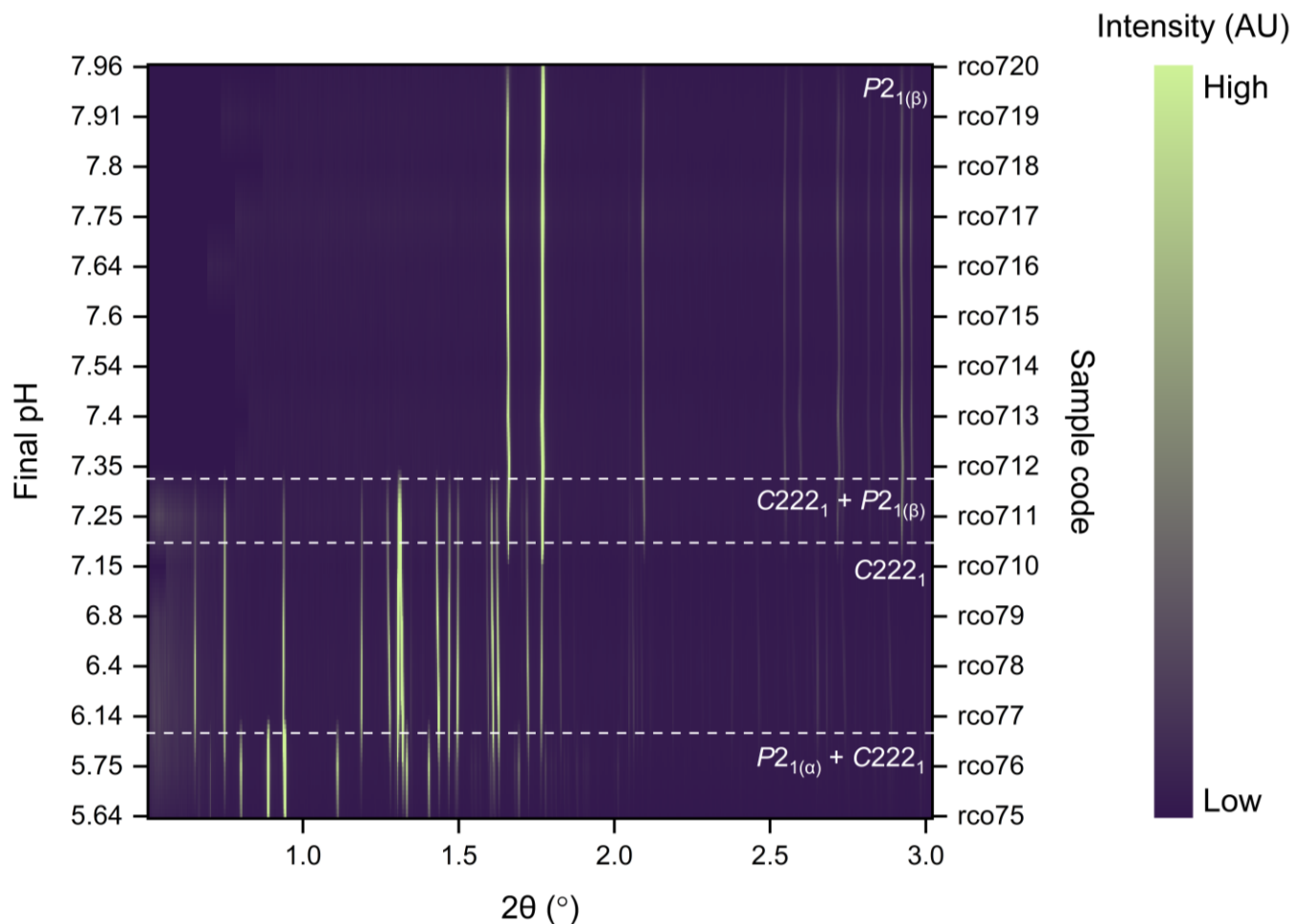


Εικόνα 5-6. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας επιλεγμένων δειγμάτων της 7ης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη. Απεικονίζονται τα δείγματα rco71 [amorphous, pH=5.06], rco75 [$P2_{1(\alpha)}$ + C222₁, pH=5.64], rco77 [C222₁, pH=6.14] και rco714 [$P2_{1(\beta)}$, pH=7.54].

Πίνακας 5-18. Κωδικός δείγματος, αρχικό pH την ημέρα της κρυστάλλωσης και τελικό pH πριν από την μέτρηση κάθε δείγματος της 7ης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH	Τελική τιμή pH
rco71	4.10	5.06
rco72	4.20	5.15
rco73	4.30	5.27
rco74	4.50	5.37
rco75	4.80	5.64
rco76	5.00	5.75
rco77	5.50	6.14
rco78	6.00	6.40
rco79	6.50	6.80
rco710	7.00	7.15
rco711	7.20	7.25
rco712	7.40	7.35
rco713	7.50	7.40
rco714	7.60	7.54
rco715	7.70	7.60
rco716	7.80	7.64
rco717	7.90	7.75
rco718	8.00	7.80
rco719	8.10	7.91
rco720	8.20	7.96

Στην έβδομη σειρά προσδιορίστηκαν τρία κρυσταλλικά πολύμορφα σε εύρος pH 5.75-7.96. Τα πρώτα τέσσερα δείγματα της σειράς δεν απέδωσαν σήμα περίθλασης και χαρακτηρίστηκαν ως άμορφα. Ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός της σειράς φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα επιφανείας (**Εικόνα 5-7**), το οποίο αποτελεί την κάτοψη όλων των διαγραμμάτων περίθλασης σε εύρος 2θ συναρτήσει της τελικής τιμής pH.

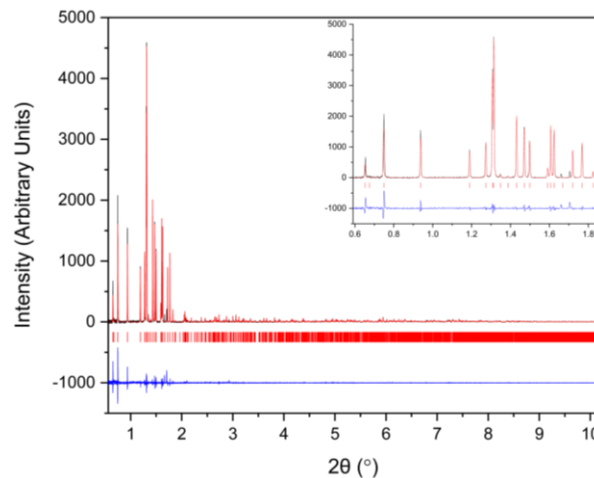
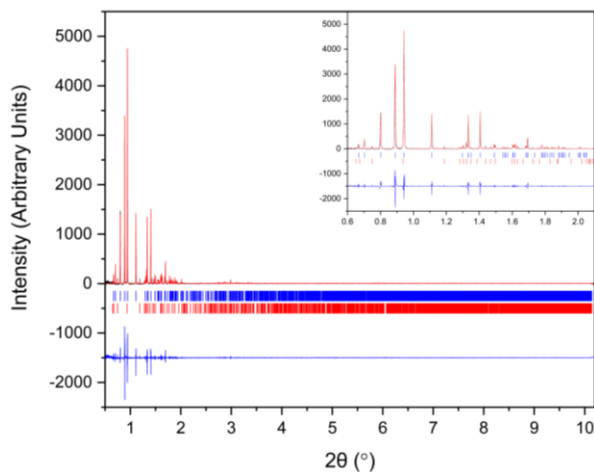


Εικόνα 5-7. Διάγραμμα επιφανείας των δεδομένων XRPD της 7^{ης} σειράς ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση του τελικού pH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης. Παρατηρούνται τρεις διαφορετικές κρυσταλλικές φάσεις.

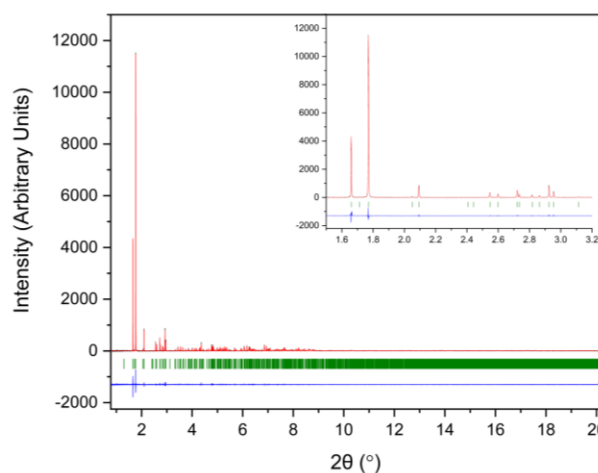
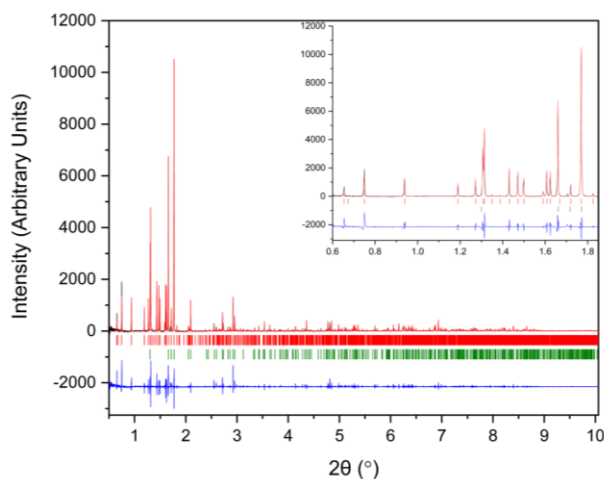
Στο εύρος pH 5.64-5.75 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\alpha)}$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=114.018(1) \text{ \AA}$, $b=335.020(3) \text{ \AA}$, $c=49.2432(5) \text{ \AA}$, $\beta=101.5143(2)^\circ$. Σε όλο το εύρος εμφάνισής του βρίσκεται σε συνύπαρξη με το κρυσταλλικό πολύμορφο $C222_1$ (**Εικόνα 5-8**).

Το κρυσταλλικό πολύμορφο ορθορομβικής συμμετρίας $C222_1$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 5.64-7.25, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=60.6368(8) \text{ \AA}$, $b=220.850(3) \text{ \AA}$, $c=227.825(3) \text{ \AA}$ (**Εικόνα 5-8**). Στο τέλος του εύρους εμφάνισής του βρίσκεται σε συνύπαρξη με το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ (**Εικόνα 5-9**).

Σε εύρος pH 7.25-7.96 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\beta)}$ με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=61.2159(4) \text{ \AA}$, $b=61.8927(5) \text{ \AA}$, $c=47.8838(4) \text{ \AA}$, $\beta=110.5160(1)^\circ$ (**Εικόνα 5-9**).



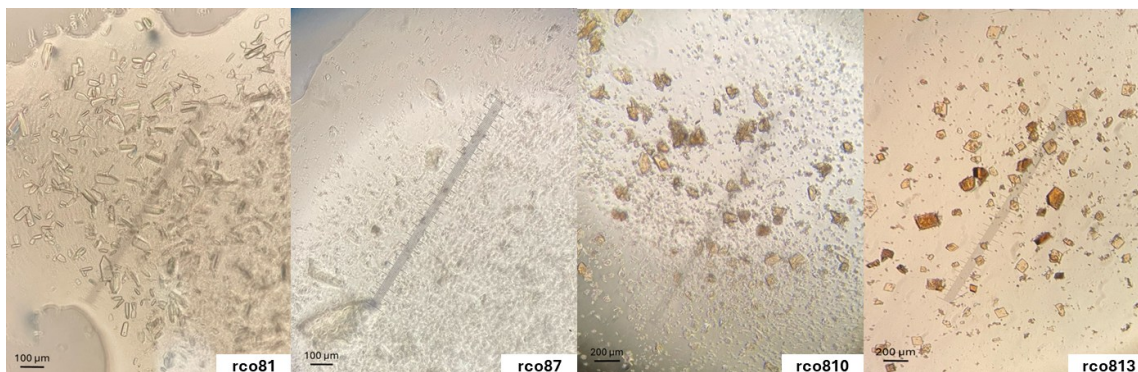
Εικόνα 5-8. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco75 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.64. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μπλε κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\alpha)$, ενώ οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_1(\alpha)$ $a=114.018(1)$ Å, $b=335.020(3)$ Å, $c=49.2432(5)$ Å, $\beta=101.5143(2)^\circ$, για την φάση $C222_1$ $a=60.232(1)$ Å, $b=221.034(4)$ Å, $c=228.390(4)$ Å, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=10.6606\%$ και $\chi^2=2.44055$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco710 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.15. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=60.6368(8)$ Å, $b=220.850(3)$ Å, $c=227.825(3)$ Å, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=8.7772\%$ και $\chi^2=1.32675$.



Εικόνα 5-9. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco711 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.25. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$, ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\beta)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $C222_1$ $a=60.6847(1)$ Å, $b=220.7138(4)$ Å, $c=227.7493(4)$ Å, για την φάση $P2_1(\beta)$ $a=61.0878(2)$ Å, $b=61.9528(2)$ Å, $c=47.8152(1)$ Å, $\beta=110.29650(8)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=17.4519\%$ και $\chi^2=3.35691$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco714 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.54. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\beta)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=61.2159(4)$ Å, $b=61.8927(5)$ Å, $c=47.8838(4)$ Å, $\beta=110.5160(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=4.987\%$ και $\chi^2=1.1575$.

8^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Και σε αυτήν τη σειρά συγκρυστάλλωσης, η παρατήρηση των δειγμάτων με οπτική μικροσκοπία επιβεβαίωσε την ετερογένειά τους σε επίπεδο κρυσταλλικής μορφολογίας σε όλο το εύρος pH της σειράς (Εικόνα 5-10).

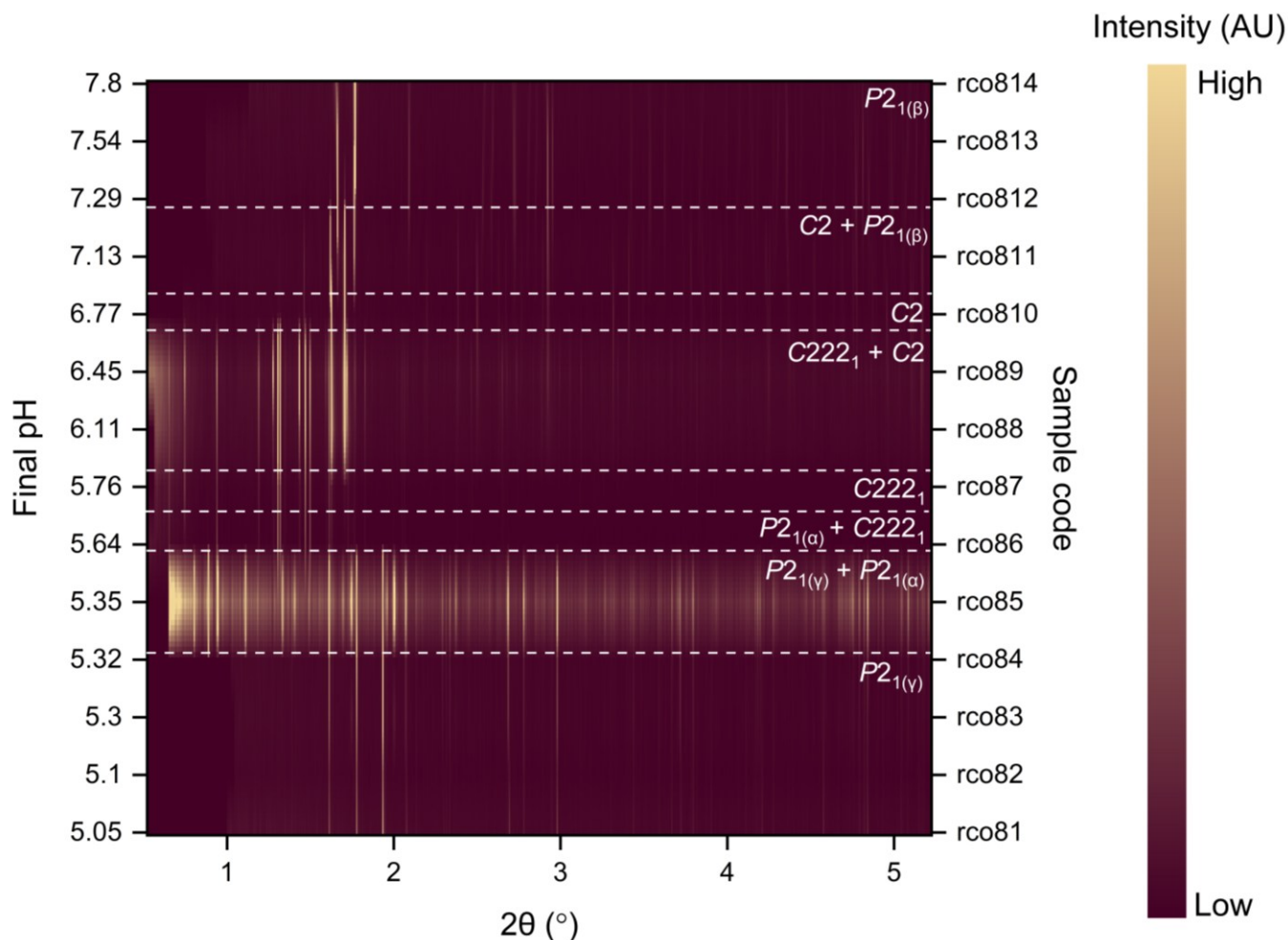


Εικόνα 5-10. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας επιλεγμένων δειγμάτων της 8^{ης} σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη. Απεικονίζονται τα δείγματα rco81 [$P2_{1(\gamma)}$, pH=5.05], rco87 [$C222_1$, pH=5.76], rco810 [$C2$, pH=6.77] και rco813 [$P2_{1(\beta)}$, pH=7.54].

Ο συνολικός χρόνος κρυστάλλωσης των δειγμάτων ήταν 42 ημέρες, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση προηγήθηκε η μέτρηση των τελικών τιμών pH κάθε δείγματος πριν την ακτινοβολήση των δειγμάτων (Πίνακας 5-19).

Πίνακας 5-19. Κωδικός δείγματος, αρχικό pH την ημέρα της κρυστάλλωσης και τελικό pH πριν από την μέτρηση κάθε δείγματος της 8^{ης} σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH	Τελική τιμή pH
rco81	4.10	5.05
rco82	4.20	5.10
rco83	4.30	5.30
rco84	4.40	5.32
rco85	4.50	5.35
rco86	4.80	5.64
rco87	5.00	5.76
rco88	5.50	6.11
rco89	6.00	6.45
rco810	6.50	6.77
rco811	7.00	7.13
rco812	7.30	7.29
rco813	7.60	7.54
rco814	8.00	7.80
rco815	8.20	7.92



Εικόνα 5-11. Διάγραμμα επιφανείας των δεδομένων XRPD της 8ης σειράς ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση του τελικού pH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης. Παρατηρούνται πέντε διαφορετικές κρυσταλλικές φάσεις.

Στην όγδοη σειρά προσδιορίστηκαν πέντε κρυσταλλικά πολύμορφα σε εύρος pH 5.05-7.80. Το τελευταίο δείγμα της σειράς δεν απέδωσε σήμα περίθλασης και χαρακτηρίστηκε ως άμορφο. Ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός της σειράς φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα επιφανείας (**Εικόνα 5-11**), το οποίο αποτελεί την κάτοψη όλων των διαγραμμάτων περίθλασης σε εύρος 2θ συναρτήσει της τελικής τιμής pH.

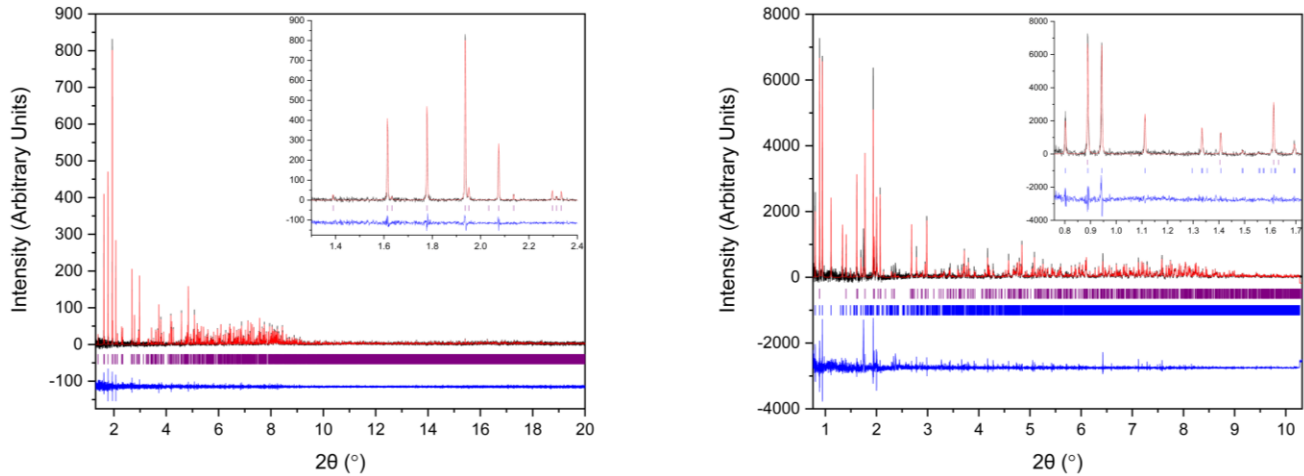
Σε εύρος pH 5.05-5.35 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\gamma)$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=87.560(1)$ Å, $b=69.710(1)$ Å, $c=47.6875(6)$ Å, $\beta=106.9743(2)^\circ$ (**Εικόνα 5-12**).

Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\alpha)$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 5.35-5.64, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=113.662(6)$ Å, $b=332.14(2)$ Å, $c=49.475(2)$ Å, $\beta=101.493(1)^\circ$ (**Εικόνα 5-12**). Εμφανίζεται μόνον σε συνύπαρξη, αρχικά με το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\gamma)$ και τελικά με το κρυσταλλικό πολύμορφο $C222_1$ (**Εικόνα 5-13**).

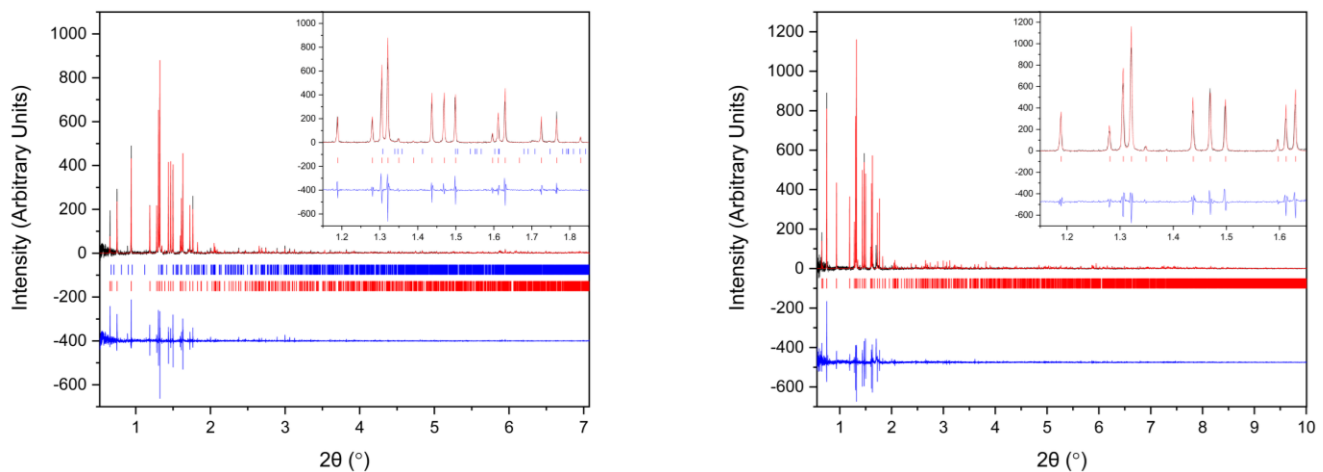
Σε εύρος pH 5.64-6.45 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο ορθορομβικής συμμετρίας $C222_1$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=60.3094(4)$ Å, $b=220.960(1)$ Å, $c=228.225(2)$ Å (**Εικόνα 5-13**). Εκτός από το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\alpha)$, συνυπάρχει και με το πολύμορφο $C2$ στο τέλος του εύρους εμφάνισής του (**Εικόνα 5-14**).

Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $C2$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 6.11-7.13, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=102.7626(7)$ Å, $b=61.2180(2)$ Å, $c=63.4663(4)$ Å, $\beta=116.86740(9)^\circ$ (Εικόνα 5-14). Εκτός από το κρυσταλλικό πολύμορφο $C222_1$, συνυπάρχει και με το πολύμορφο $P2_1(\beta)$ στο τέλος του εύρους εμφάνισής του (Εικόνα 5-15).

Σε εύρος pH 7.13-7.80 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\beta)$ με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=61.3809(6)$ Å, $b=61.9276(5)$ Å, $c=47.8949(5)$ Å, $\beta=110.6282(3)^\circ$ (Εικόνα 5-15).

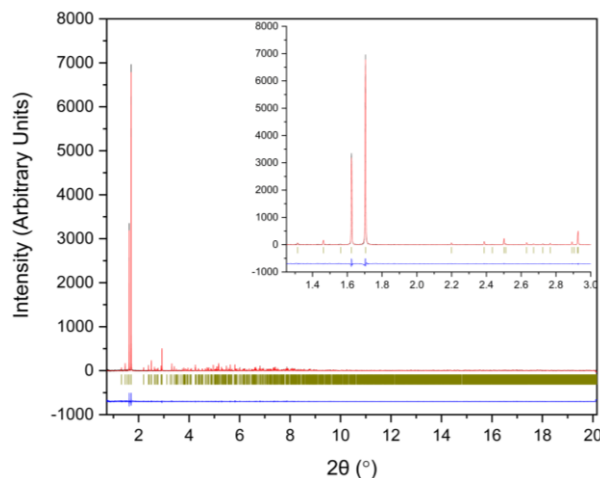
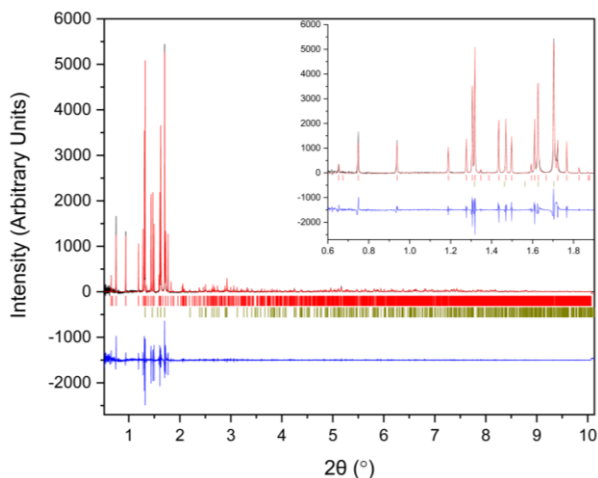


Εικόνα 5-12. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco82 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.10. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μωβ κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\gamma)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=87.560(1)$ Å, $b=69.710(1)$ Å, $c=47.6875(6)$ Å, $\beta=106.9743(2)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.8824\%$ και $\chi^2=1.16522$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco85 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.35. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μωβ κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\gamma)$, ενώ οι μπλε κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\alpha)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_1(\gamma)$ $a=87.862(3)$ Å, $b=68.64(1)$ Å, $c=47.817(2)$ Å, $\beta=107.0415(8)^\circ$, για την φάση $P2_1(\alpha)$ $a=114.256(4)$ Å, $b=335.59(1)$ Å, $c=49.030(2)$ Å, $\beta=102.0706(8)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=11.7418\%$ και $\chi^2=1.90254$.

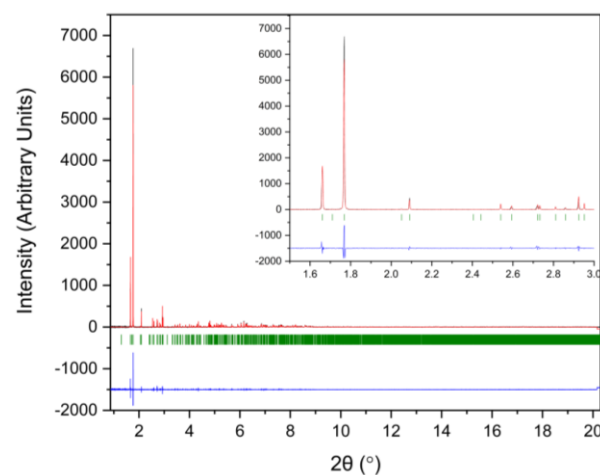
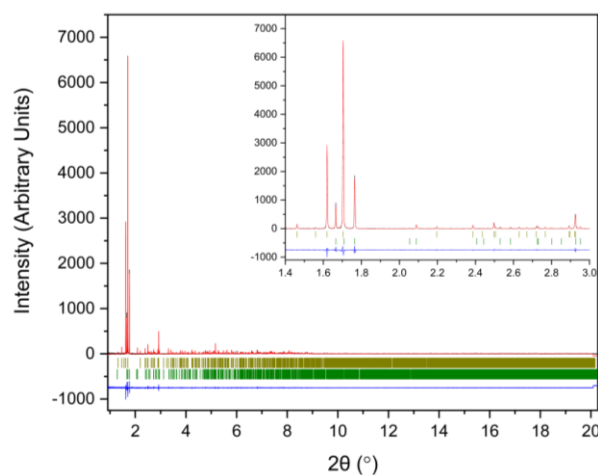


Εικόνα 5-13. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco86 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.64. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μπλε κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\alpha)$, ενώ οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$. Οι

πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_{1(a)}$ $a=113.662(6)$ Å, $b=332.14(2)$ Å, $c=49.475(2)$ Å, $\beta=101.493(1)^\circ$, για την φάση $C222_1$ $a=60.381(1)$ Å, $b=221.018(4)$ Å, $c=228.533(4)$ Å, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=22.1621\%$ και $\chi^2=1.42005$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco87 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.76. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=60.3094(4)$ Å, $b=220.960(1)$ Å, $c=228.225(2)$ Å, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=17.1134\%$ και $\chi^2=1.36288$.



Εικόνα 5-14. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco89 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.25. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κόκκινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C222_1$, ενώ οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C2$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $C222_1$ $a=60.4774(3)$ Å, $b=221.1153(9)$ Å, $c=228.085(1)$ Å, για την φάση $C2$ $a=102.723(5)$ Å, $b=61.306(2)$ Å, $c=63.483(3)$ Å, $\beta=116.9013(6)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=10.1122\%$ και $\chi^2=1.7492$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco810 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=6.77. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C2$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=102.7626(7)$ Å, $b=61.2180(2)$ Å, $c=63.4663(4)$ Å, $\beta=116.86740(9)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=8.172\%$ και $\chi^2=1.17536$.

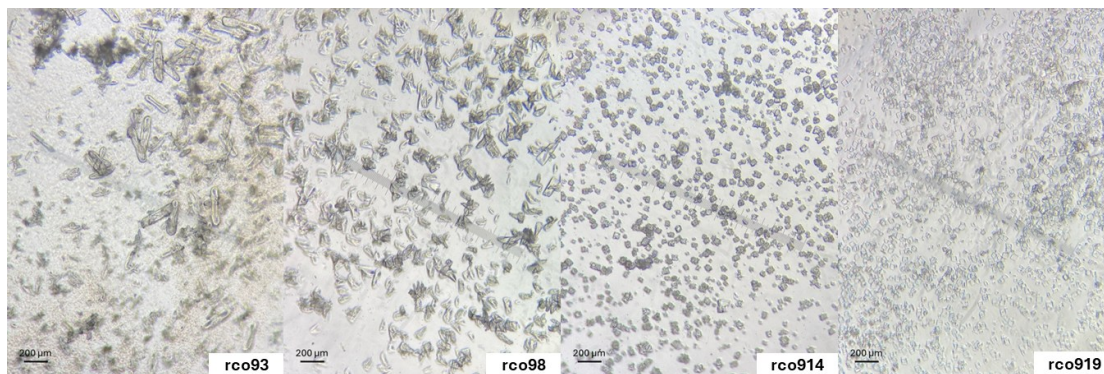


Εικόνα 5-15. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco811 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.13. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $C2$, ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $C2$ $a=103.001(2)$ Å, $b=61.182(2)$ Å,

$c=63.475(1)$ Å, $\beta=116.8003(3)^\circ$, για την φάση $P2_{1(\beta)}$ $a=61.655(3)$ Å, $b=61.925(2)$ Å, $c=47.817(2)$ Å, $\beta=110.7750(7)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.3564\%$ και $\chi^2=1.43154$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco813 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.54. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες κόκκινες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=61.3809(6)$ Å, $b=61.9276(5)$ Å, $c=47.8949(5)$ Å, $\beta=110.6282(3)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.7002\%$ και $\chi^2=1.28778$.

9η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης

Και σε αυτήν τη σειρά συγκρυστάλλωσης, η παρατήρηση των δειγμάτων με οπτική μικροσκοπία επιβεβαίωσε την ετερογένειά τους σε επίπεδο κρυσταλλικής μορφολογίας σε όλο το εύρος pH της σειράς (Εικόνα 5-16).



Εικόνα 5-16. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας επιλεγμένων δειγμάτων της 9ης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη, Απεικονίζονται τα δείγματα rco93 [$P2_{1(\gamma)}$ + $P2_{1(\alpha)}$, pH=5.34], rco98 [pH=5.70], rco914 [C2, pH=6.57] και rco919 [$P2_{1(\beta)}$, pH=7.55].

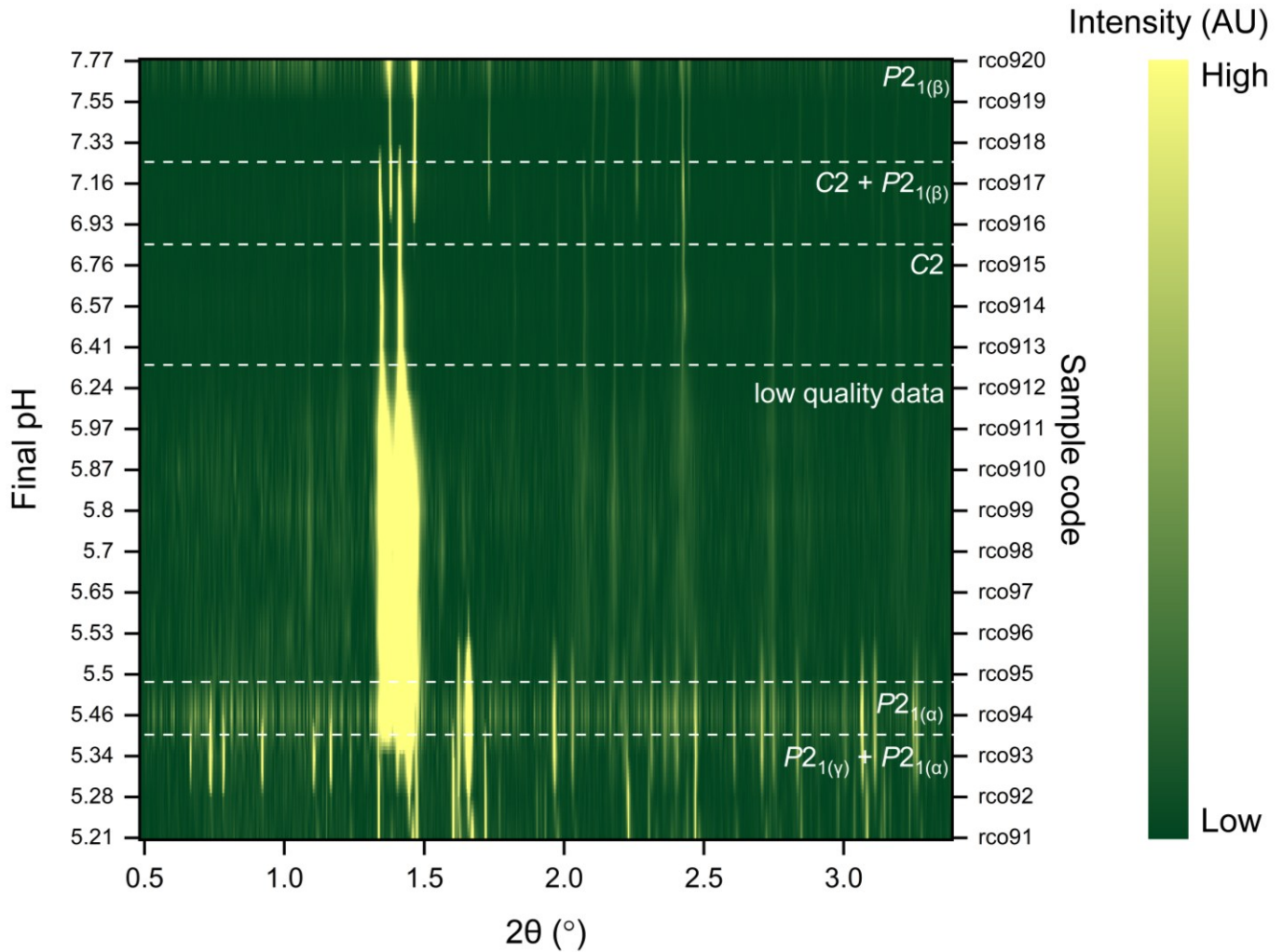
Ο συνολικός χρόνος κρυστάλλωσης των δειγμάτων ήταν 28 ημέρες, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση προηγήθηκε η μέτρηση των τελικών τιμών pH κάθε δείγματος πριν την ακτινοβολήση των δειγμάτων (Πίνακας 5-20).

Πίνακας 5-20. Κωδικός δείγματος, αρχικό pH την ημέρα της κρυστάλλωσης και τελικό pH πριν από την μέτρηση κάθε δείγματος της 9ης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη ρεσορσινόλη.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH	Τελική τιμή pH
rco91	4.20	5.21
rco92	4.30	5.28
rco93	4.40	5.34
rco94	4.50	5.46
rco95	4.60	5.50
rco96	4.70	5.53
rco97	4.80	5.65
rco98	4.90	5.70
rco99	5.00	5.80
rco910	5.10	5.87
rco911	5.30	5.97
rco912	5.60	6.24
rco913	5.90	6.41
rco914	6.20	6.57
rco915	6.50	6.76
rco916	6.80	6.93
rco917	7.10	7.16
rco918	7.40	7.33

rco919	7.70	7.55
rco920	8.00	7.77

Στην ένατη σειρά προσδιορίστηκαν τέσσερα κρυσταλλικά πολύμορφα σε εύρος pH 5.21-7.77. Ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός της σειράς φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα επιφανείας (**Εικόνα 5-17**), το οποίο αποτελεί την κάτοψη όλων των διαγραμμάτων περίθλασης σε εύρος 2θ συναρτήσει της τελικής τιμής pH.



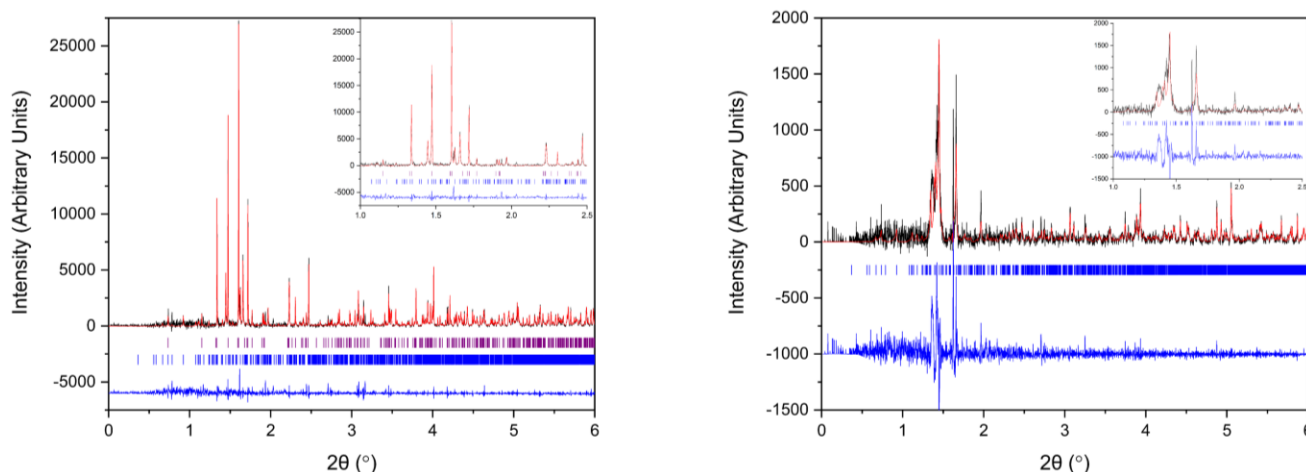
Εικόνα 5-17. Διάγραμμα επιφανείας των δεδομένων XRPD της 9ης σειράς ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση του τελικού pH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης. Παρατηρούνται τέσσερις διαφορετικές κρυσταλλικές φάσεις.

Σε εύρος pH 5.21-5.34 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\gamma)}$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=87.48(1) \text{ \AA}$, $b=69.680(3) \text{ \AA}$, $c=48.153(6) \text{ \AA}$, $\beta=106.996(3)^\circ$. Εμφανίζεται μόνον σε συνύπαρξη με το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(\alpha)}$ (**Εικόνα 5-18**).

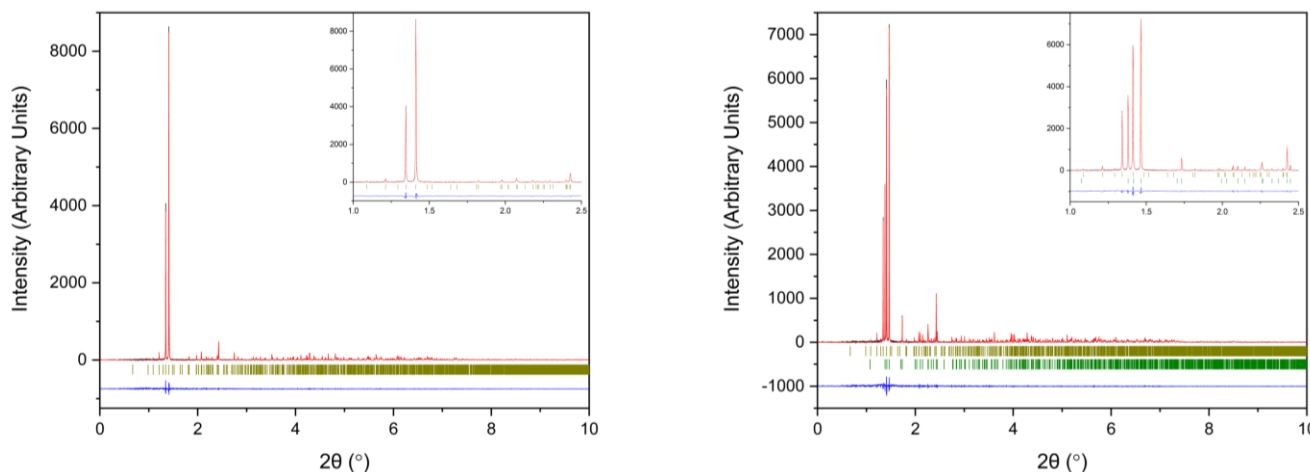
Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_{1(\alpha)}$ ταυτοποιήθηκε σε pH 5.46, με πλεγματικές σταθερές $a=112.222(6) \text{ \AA}$, $b=338.08(4) \text{ \AA}$, $c=48.695(2) \text{ \AA}$, $\beta=99.694(2)^\circ$ (**Εικόνα 5-18**).

Στο εύρος pH 6.41-7.16 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $C2$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=102.781(3) \text{ \AA}$, $b=61.1667(9) \text{ \AA}$, $c=63.505(1) \text{ \AA}$, $\beta=116.8721(4)^\circ$ (**Εικόνα 5-19**). Στο τέλος του εύρους εμφάνισής του εμφανίζεται σε συνύπαρξη με το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ (**Εικόνα 5-19**).

Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\beta)$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 6.93-7.77, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=61.3948(4)$ Å, $b=61.9321(3)$ Å, $c=47.8467(3)$ Å, $\beta=110.7729(1)^\circ$ (Εικόνα 5-20).

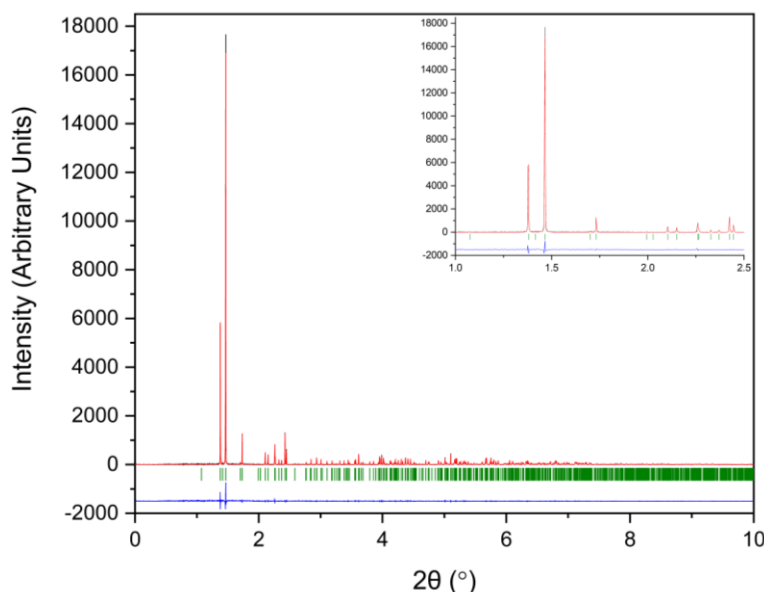


Εικόνα 5-18. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco92 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.28. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μωβ κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\gamma)$, ενώ οι μπλε κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\alpha)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_1(\gamma)$ $a=87.48(1)$ Å, $b=69.680(3)$ Å, $c=48.153(6)$ Å, $\beta=106.996(3)^\circ$, για την φάση $P2_1(\alpha)$ $a=112.45(1)$ Å, $b=334.87(3)$ Å, $c=49.180(4)$ Å, $\beta=100.907(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=8.9972\%$ και $\chi^2=2.61653$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco94 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=5.46. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μπλε κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\alpha)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=112.29(5)$ Å, $b=334.99(2)$ Å, $c=49.20(2)$ Å, $\beta=100.823(9)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=16.7975\%$ και $\chi^2=1.69876$.



Εικόνα 5-19. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco915 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=6.76. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση C2. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=102.781(3)$ Å, $b=61.1667(9)$ Å, $c=63.505(1)$ Å, $\beta=116.8721(4)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.4078\%$ και $\chi^2=1.27297$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco917 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.16. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση C2, ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\beta)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση C2

$a=103.003(4)$ Å, $b=61.127(1)$ Å, $c=63.497(2)$ Å, $\beta=116.7878(6)^\circ$, για την φάση $P2_{1(\beta)}$ $a=61.486(1)$ Å, $b=61.916(1)$ Å, $c=47.7973(9)$ Å, $\beta=110.7673(4)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.0115\%$ και $\chi^2=1.71076$.

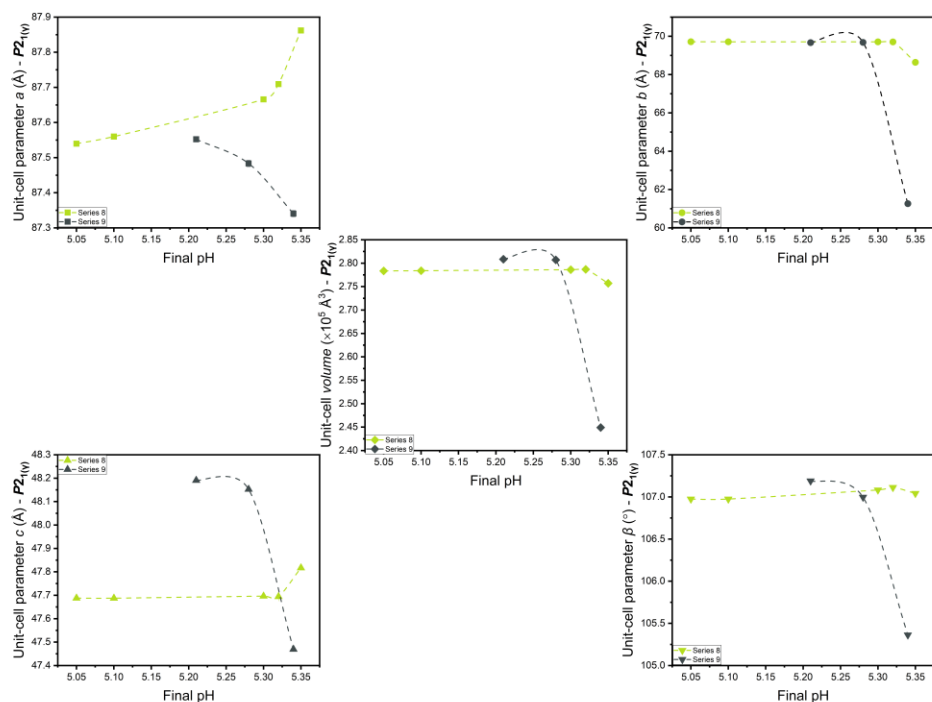


Εικόνα 5-20. Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος rco918 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη σε τελικό pH=7.33. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=61.3948(4)$ Å, $b=61.9321(3)$ Å, $c=47.8467(3)$ Å, $\beta=110.7729(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=7.1529\%$ και $\chi^2=1.44168$.

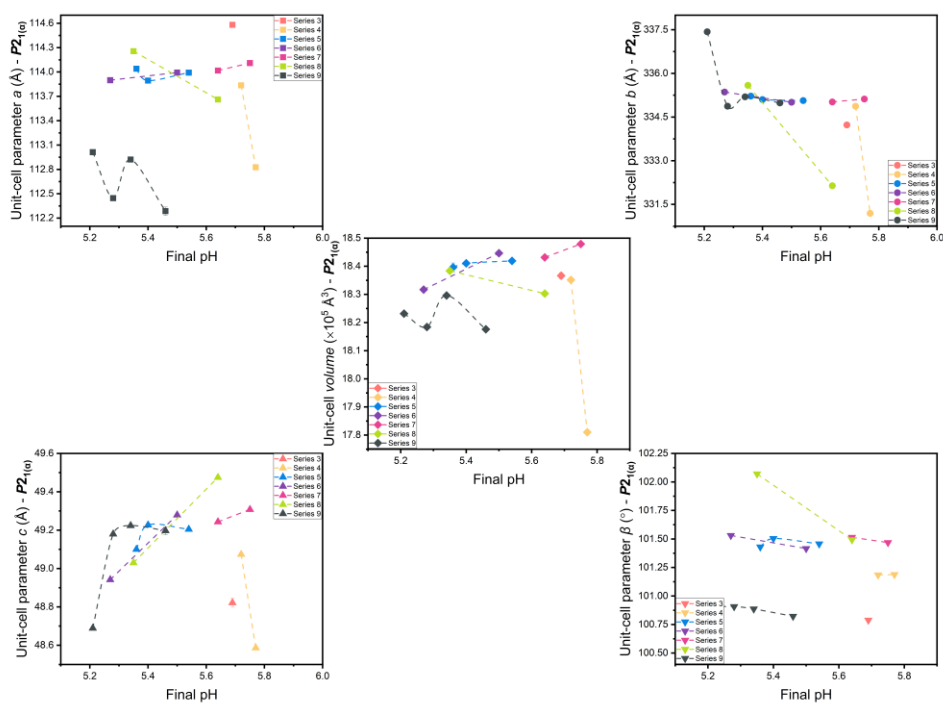
Μεταβολές των πλεγματικών σταθερών & του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πρωτίστως τα δεδομένα των **σειρών συγκρυστάλλωσης 7, 8 και 9** της ανθρώπινης ινσουλίνης με ρεσορσινόλη, οι οποίες παρήχθησαν και αναλύθηκαν εξ ολοκλήρου στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, αξιοποιήθηκαν και δεδομένα από παλαιότερες σειρές συγκρυστάλλωσης (**σειρές 5 και 6**), οι οποίες είχαν παραχθεί στο πλαίσιο προπτυχιακής εργασίας και επανεξετάστηκαν και αναλύθηκαν εκ νέου στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε πλήρης ανάλυση και για τις **σειρές 3 και 4**, των οποίων τα δεδομένα περίθλασης ήταν μη αναλυμένα. Ακολουθούν τα διαγράμματα μεταβολής πλεγματικών σταθερών και όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας των κρυσταλλικών πολυμόρφων που ταυτοποιήθηκαν στις 3^η, 4^η, 5^η, 6^η, 7^η, 8^η και 9^η σειρές συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης (**Εικόνες 5-21, 5-22, 5-23, 5-24 & 5-25**).

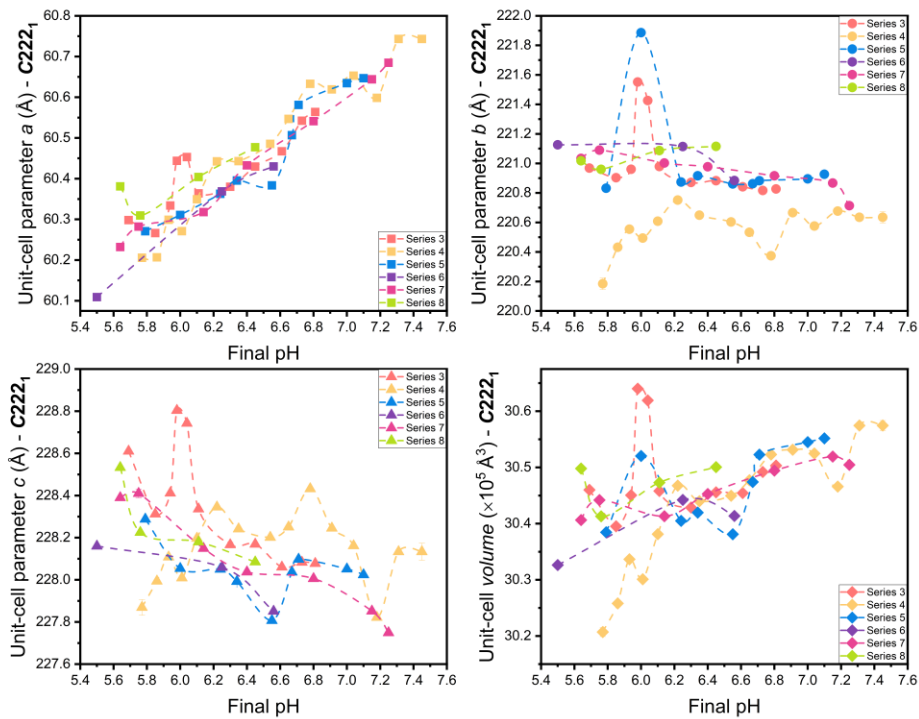
Κύριο συμπέρασμα για τις πλεγματικές σταθερές όλων των πολυμόρφων είναι πως αυτές μεταβάλλονται ανισοτροπικά, δηλαδή η αύξηση του pH δεν επιφέρει την ίδια αλλαγή στα μέτρα τους (αύξηση ή μείωση). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι μεταβολές του άξονα a , ο οποίος αυξάνεται με την αύξηση του pH, συγκριτικά με τους άξονες b και c , οι οποίοι μειώνονται με την αύξηση του pH, για το πολύμορφο $C222_1$. Επίσης, για το πολύμορφο $C2$ παρατηρείται αύξηση του άξονα a και μείωση του άξονα b και της γωνίας β με την αύξηση του pH. Τέλος, για το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ παρατηρείται μείωση του άξονα a και μείωση όλων των υπόλοιπων πλεγματικών σταθερών με την αύξηση του pH.



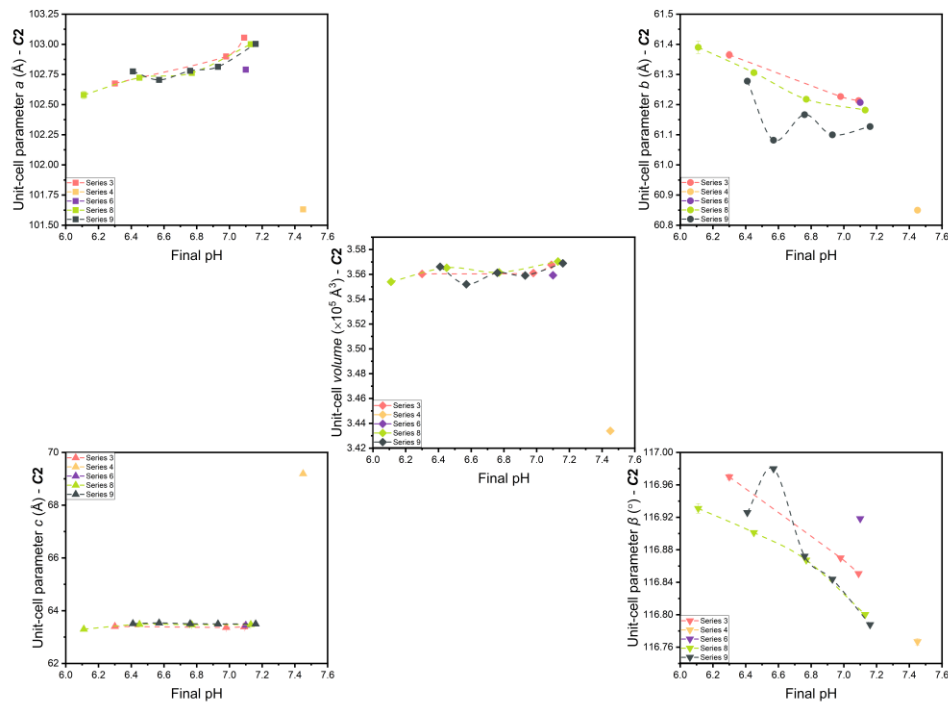
Εικόνα 5-21. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P21(\gamma)$ για τις σειρές 8 & 9 συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη.



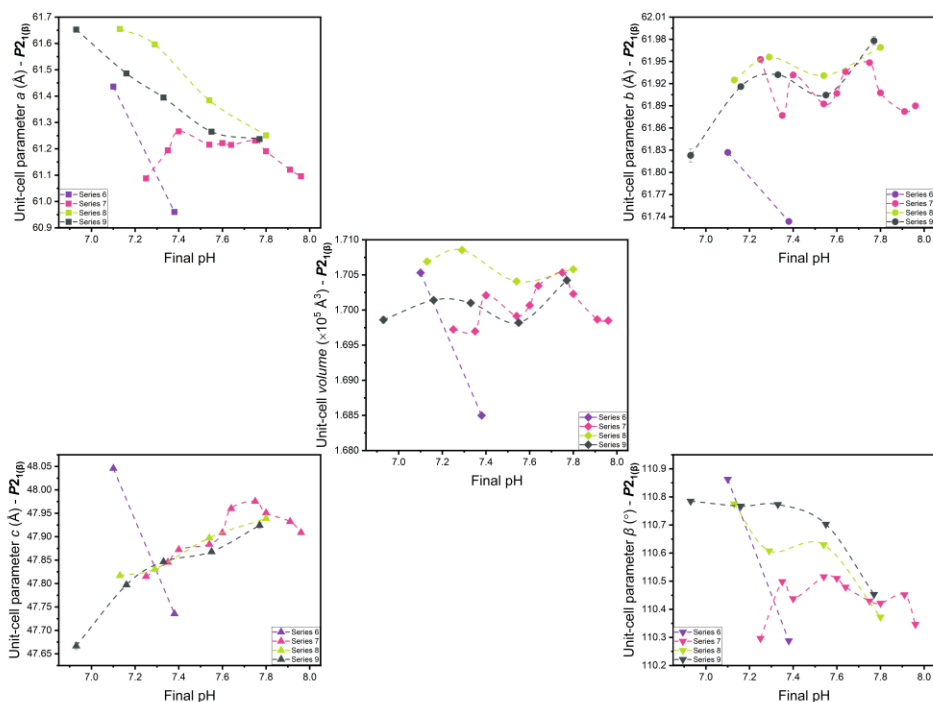
Εικόνα 5-22. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P21(\alpha)$ για τις σειρές 3, 4, 5, 6, 7, 8 & 9 συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη.



Εικόνα 5-23. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου C222₁ για τις σειρές 3, 4, 5, 6, 7 & 8 συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη.



Εικόνα 5-24. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου C2 για τις σειρές 3, 4, 6, 8 & 9 συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη.

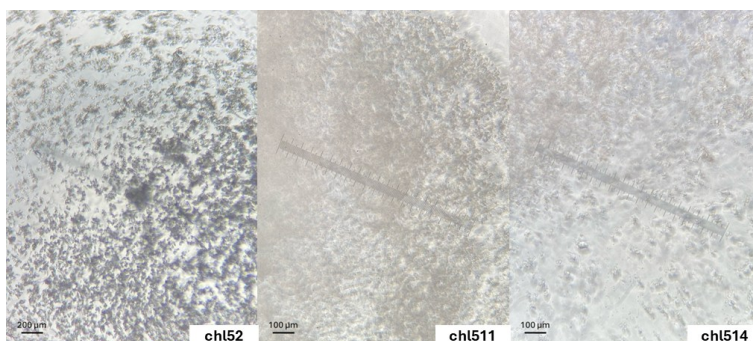


Εικόνα 5-25. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ για τις σειρές 6, 7, 8 & 9 συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη.

5.2.2. Πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη

Κατά την ανάλυση όλων των διαφορετικών σετ δεδομένων που προέκυψαν από την **5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης** που πραγματοποιήθηκε, επιτεύχθηκε ο χαρακτηρισμός τεσσάρων διαφορετικών κρυσταλλικών φάσεων: $P2_{1(\gamma)}$, $P2_{1(\delta)}$, $C2$ και $P2_{1(\beta)}$.

Η παρατήρηση των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων με οπτική μικροσκοπία ανέδειξε την ετερογένειά τους, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή εμφάνιση διαφορετικών κρυσταλλικών πολυμόρφων σε όλο το εύρος των συνθηκών pH (**Εικόνα 5-26**).



Εικόνα 5-26. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας επιλεγμένων δειγμάτων της 5^{ης} σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη, Απεικονίζονται τα δείγματα chl52 [$P2_{1(\gamma)}$, pH=5.41], chl511 [$C2$, pH=6.59] και chl514 [$P2_{1(\beta)}$, pH=6.99].

Ο συνολικός χρόνος κρυστάλλωσης των δειγμάτων ήταν 28 ημέρες, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση προηγήθηκε η μέτρηση των τελικών τιμών pH κάθε δείγματος πριν την ακτινοβολία των δειγμάτων (**Πίνακας 5-21**).

Πίνακας 5-21. Κωδικός δείγματος, αρχικό pH την ημέρα της κρυστάλλωσης και τελικό pH πριν από την μέτρηση κάθε δείγματος της 5^{ης} σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη.

Κωδικός δείγματος	Αρχική τιμή pH	Τελική τιμή pH
chl51	4.20	5.26
chl52	4.40	5.41
chl53	4.60	5.51
chl54	4.80	5.71
chl55	5.00	5.86
chl56	5.20	5.98
chl57	5.40	6.12
chl58	5.60	6.24
chl59	5.80	6.40
chl510	6.00	6.50
chl511	6.20	6.59
chl512	6.50	6.78
chl513	6.60	6.85
chl514	6.80	6.99
chl515	7.00	7.10
chl516	7.20	7.22
chl517	7.40	7.37
chl518	7.60	7.49
chl519	7.80	7.66
chl520	8.00	7.78

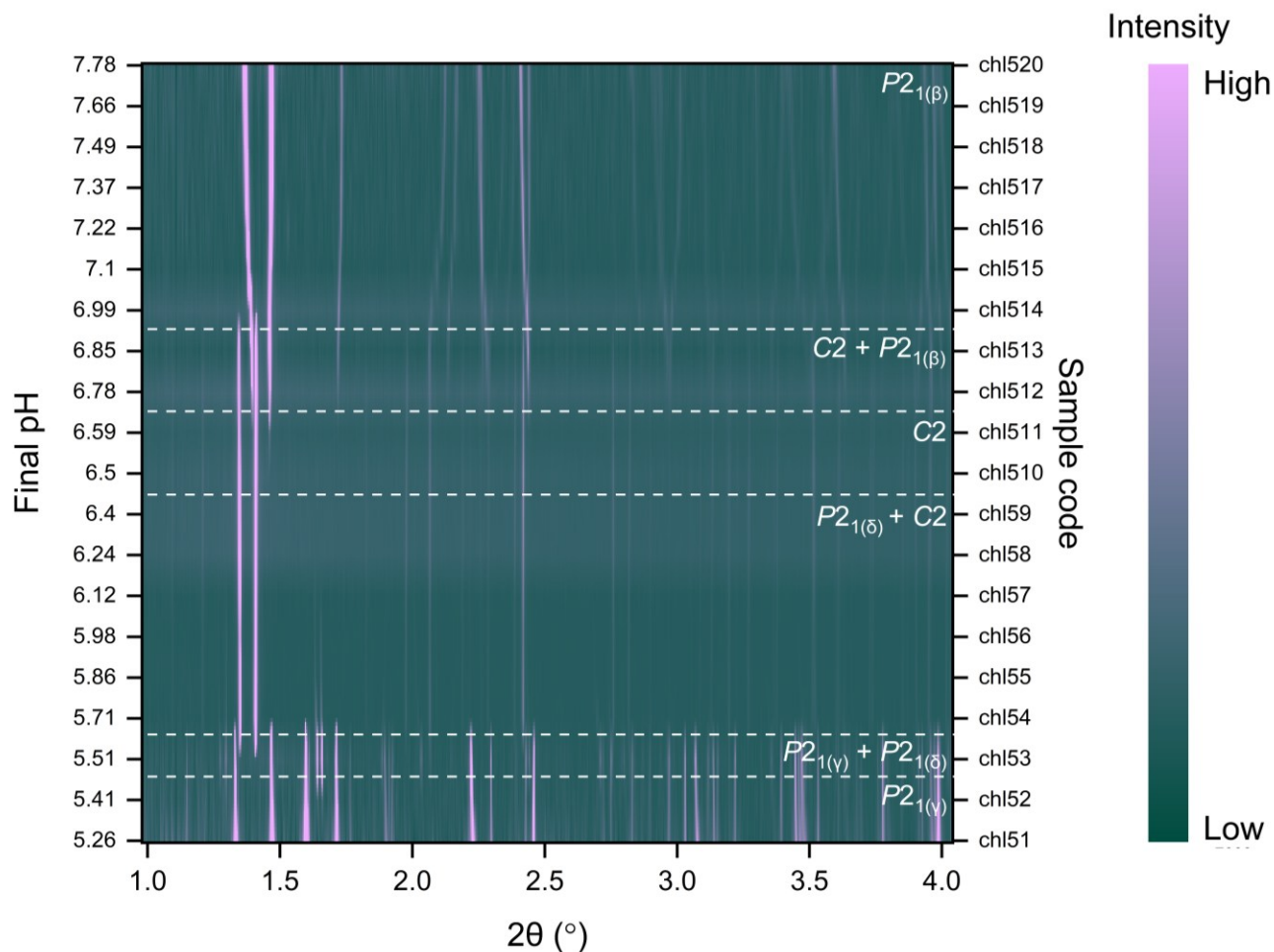
Τα κρυσταλλικά πολύμορφα σε εύρος pH 5.26-7.78. Ο κρυσταλλικός πολυμορφισμός της σειράς φαίνεται στο διάγραμμα επιφανείας της **Εικόνας 5-27**, το οποίο αποτελεί την κάτοψη όλων των διαγραμμάτων περίθλασης σε εύρος 2θ συναρτήσει της τελικής τιμής pH.

Στο εύρος pH 5.26-5.51 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\gamma)$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=87.659(3)$ Å, $b=69.924(1)$ Å, $c=47.948(1)$ Å, $\beta=106.7493(6)^\circ$ (**Εικόνα 5-28**). Στο τέλος του εύρους εμφάνισής του βρίσκεται σε συνύπαρξη με το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\delta)$ (**Εικόνα 5-28**).

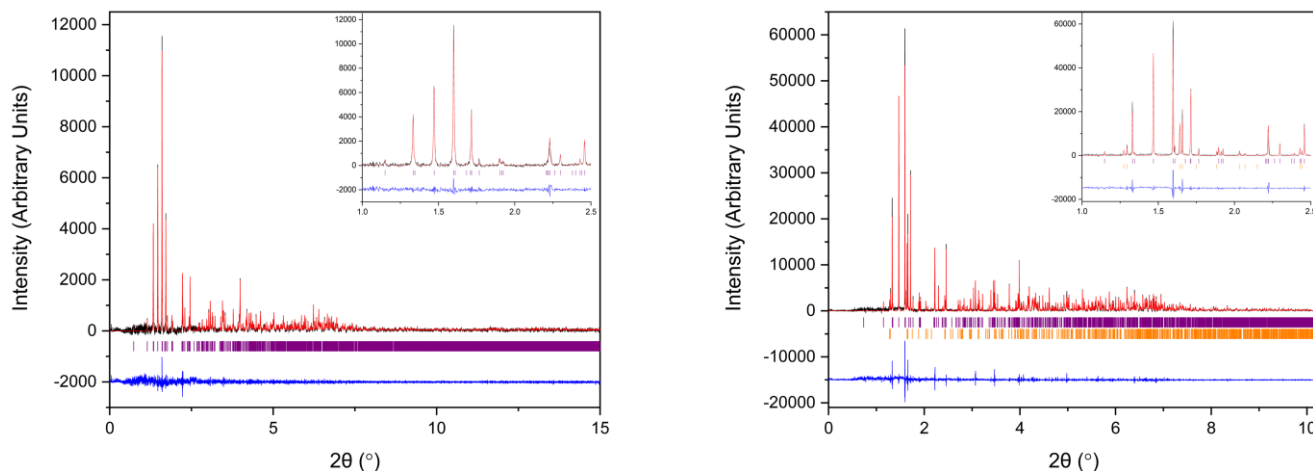
Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\delta)$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 5.51-6.40, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=48.541(2)$ Å, $b=59.669(2)$ Å, $c=47.747(2)$ Å, $\beta=94.219(1)^\circ$. Εμφανίζεται μόνον σε συνύπαρξη, και στο τέλος του εύρους εμφάνισής του συνυπάρχει με το κρυσταλλικό πολύμορφο $C2$ (**Εικόνα 5-29**).

Το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $C2$ ταυτοποιήθηκε σε εύρος pH 5.71-6.85, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=102.374(4)$ Å, $b=61.672(2)$ Å, $c=63.786(2)$ Å, $\beta=116.2282(7)^\circ$ (**Εικόνα 5-29**). Στο τέλος του εύρους εμφάνισής του συνυπάρχει με το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\beta)$ (**Εικόνα 5-30**).

Σε εύρος pH 6.78-7.78 ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\beta)$, με ενδεικτικές πλεγματικές σταθερές $a=61.003(3)$ Å, $b=62.164(3)$ Å, $c=47.928(3)$ Å, $\beta=110.594(1)^\circ$ (**Εικόνα 5-30**).

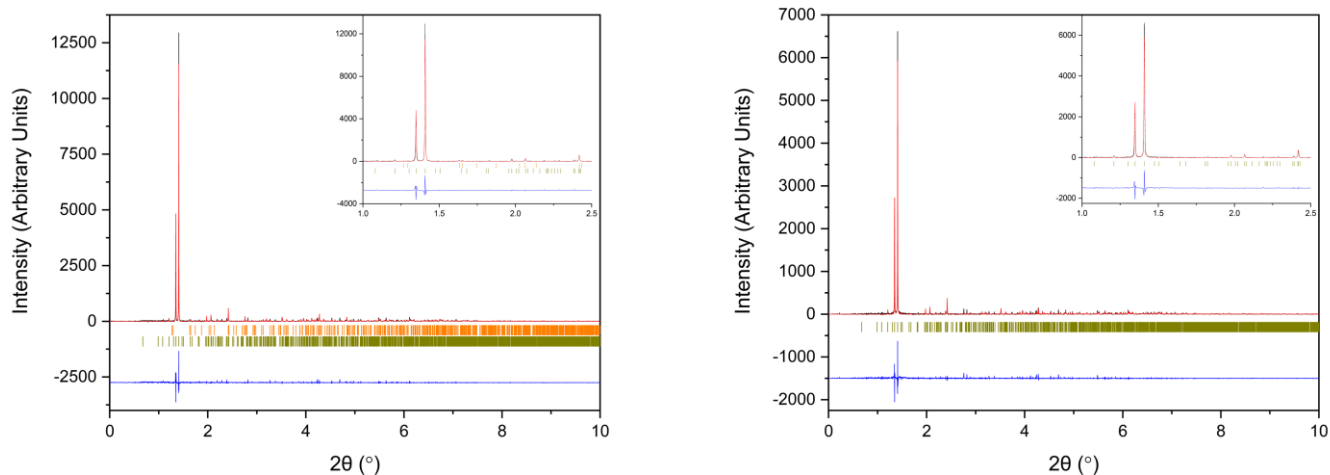


Εικόνα 5-27. Διάγραμμα επιφανείας των δεδομένων XRPD της 5^{ης} σειράς ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση του τελικού pH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης. Παρατηρούνται τέσσερις διαφορετικές κρυσταλλικές φάσεις.

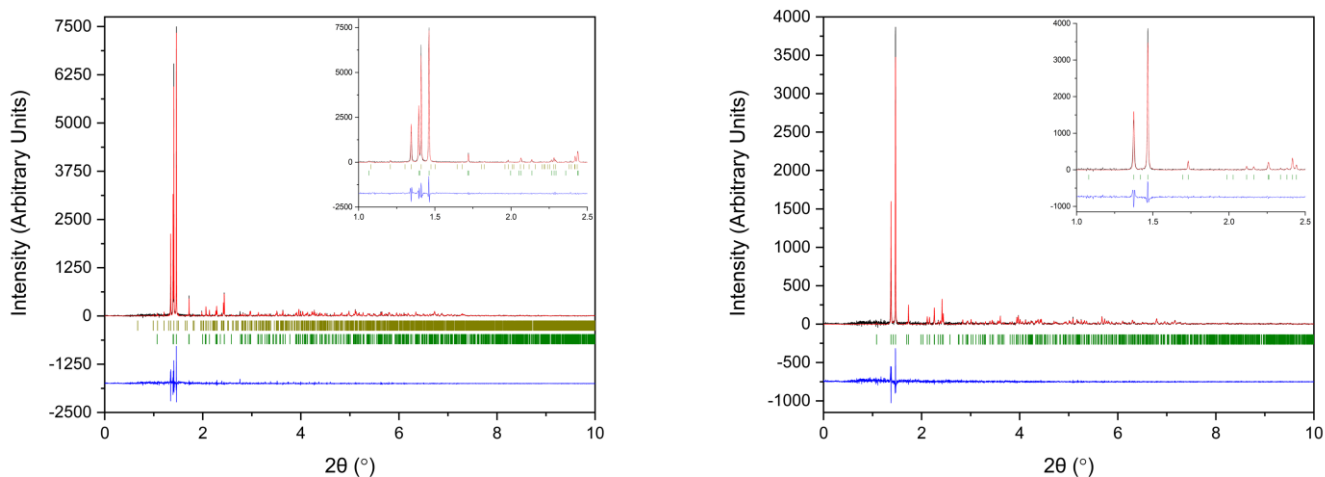


Εικόνα 5-28. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl51 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=5.26. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μωβ κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\gamma)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=87.659(3)$ Å, $b=69.924(1)$ Å, $c=47.948(1)$ Å, $\beta=106.7493(6)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=3.1875\%$ και $\chi^2=1.50984$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl53 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=5.51. Η

μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μωβ κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\gamma)$, ενώ οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\delta)$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_1(\gamma)$ $a=87.865(1)$ Å, $b=69.9094(4)$ Å, $c=47.9750(4)$ Å, $\beta=106.9380(2)^\circ$, για την φάση $P2_1(\delta)$ $a=48.541(2)$ Å, $b=59.669(2)$ Å, $c=47.747(2)$ Å, $\beta=94.219(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=6.2118\%$ και $\chi^2=2.19045$.



Εικόνα 5-29. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl57 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=6.12. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι πορτοκαλί κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_1(\delta)$, ενώ οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση C2. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση $P2_1(\delta)$ $a=48.976(1)$ Å, $b=59.987(1)$ Å, $c=47.9635(6)$ Å, $\beta=94.0368(4)^\circ$, για την φάση C2 $a=102.323(6)$ Å, $b=61.649(2)$ Å, $c=63.862(2)$ Å, $\beta=116.2604(9)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=9.2345\%$ και $\chi^2=2.67991$. **(Δεξιά)** Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl510 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=6.50. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση C2. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=102.374(4)$ Å, $b=61.672(2)$ Å, $c=63.786(2)$ Å, $\beta=116.2282(7)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=12.4524\%$ και $\chi^2=2.22853$.



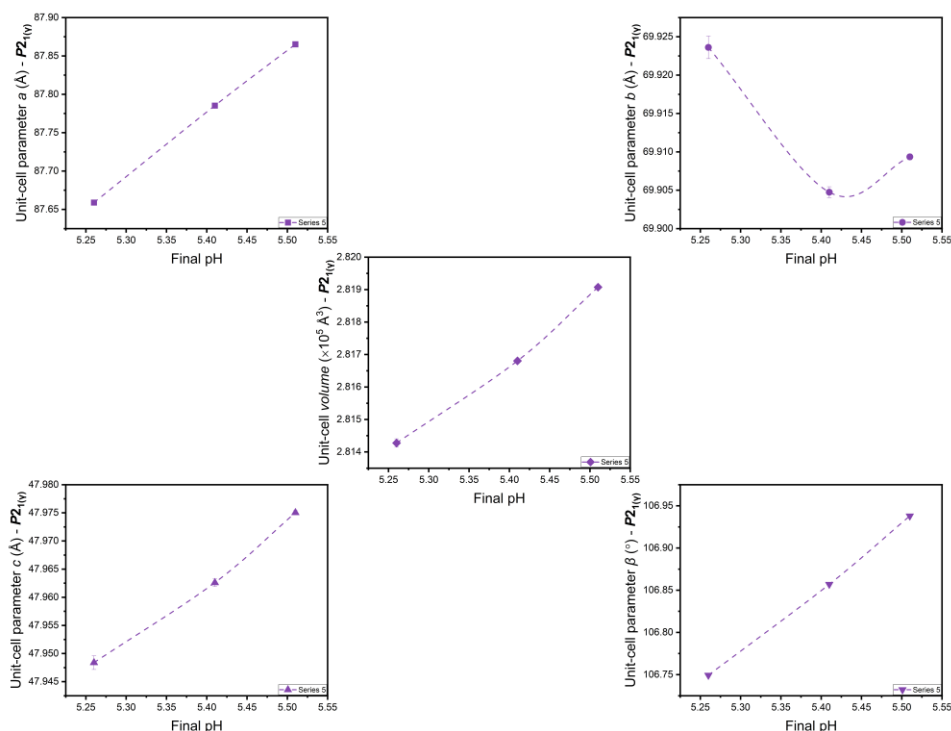
Εικόνα 5-30. (Αριστερά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl513 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=6.85. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους

διαφορά. Οι κίτρινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση C2, ενώ οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι για την φάση C2 $a=102.213(7)$ Å, $b=61.522(3)$ Å, $c=63.679(3)$ Å, $\beta=116.001(1)^\circ$, για την φάση $P2_{1(\beta)}$ $a=62.430(3)$ Å, $b=61.864(3)$ Å, $c=47.806(2)$ Å, $\beta=112.124(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=6.1468\%$ και $\chi^2=2.05831$. (Δεξιά) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD του δείγματος chl517 ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη σε τελικό pH=7.37. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι πράσινες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι πλεγματικές σταθερές που προέκυψαν από την ανάλυση Pawley είναι $a=61.003(3)$ Å, $b=62.164(3)$ Å, $c=47.928(3)$ Å, $\beta=110.594(1)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=5.6126\%$ και $\chi^2=1.24978$.

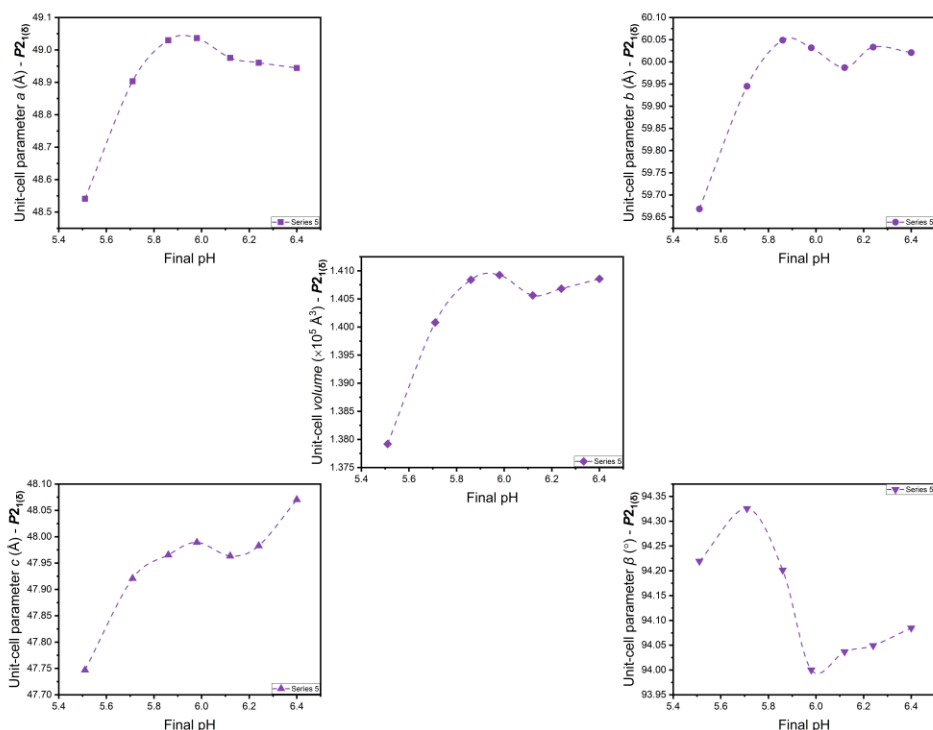
Μεταβολές των πλεγματικών σταθερών & του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας

Ακολουθούν τα διαγράμματα μεταβολής πλεγματικών σταθερών και όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας των κρυσταλλικών πολυμόρφων που ταυτοποιήθηκαν στην 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης (Εικόνες 5-31, 5-32, 5-33 & 5-34).

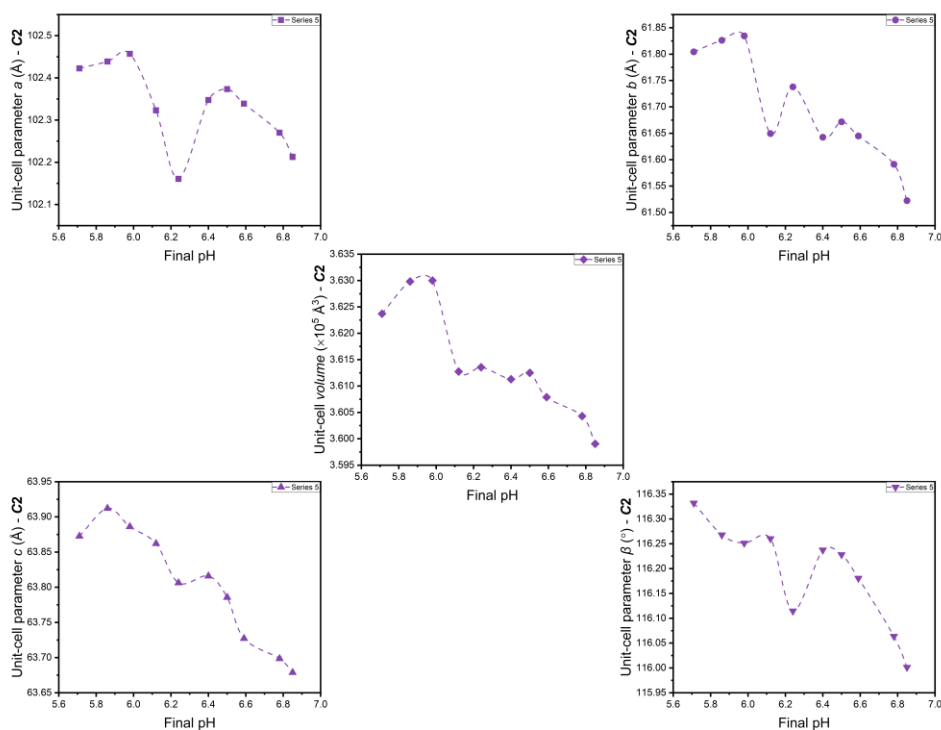
Και σε αυτήν την περίπτωση, όπως παρατηρήθηκε και για τα κρυσταλλικά πολύμορφα της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία της ρεσορσινόλης, οι μεταβολές των πλεγματικών σταθερών των πολυμόρφων της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία της 4-χλωρορεσορσινόλης χαρακτηρίζονται από ανισοτροπία. Συγκεκριμένα, για το πολύμορφο $P2_{1(\gamma)}$, όλες οι πλεγματικές σταθερές εκτός της πλευράς b αυξάνονται με την αύξηση του pH. Για το πολύμορφο $P2_{1(\delta)}$, η γωνία β φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση του pH ενώ όλες οι άλλες πλεγματικές σταθερές αυξάνονται. Για το C2 πολύμορφο, όλες οι πλεγματικές σταθερές φαίνεται να μειώνονται, και τέλος για το πολύμορφο $P2_{1(\beta)}$ παρατηρείται μείωση του άξονα a και της γωνίας β αλλά αύξηση των αξόνων b και c .



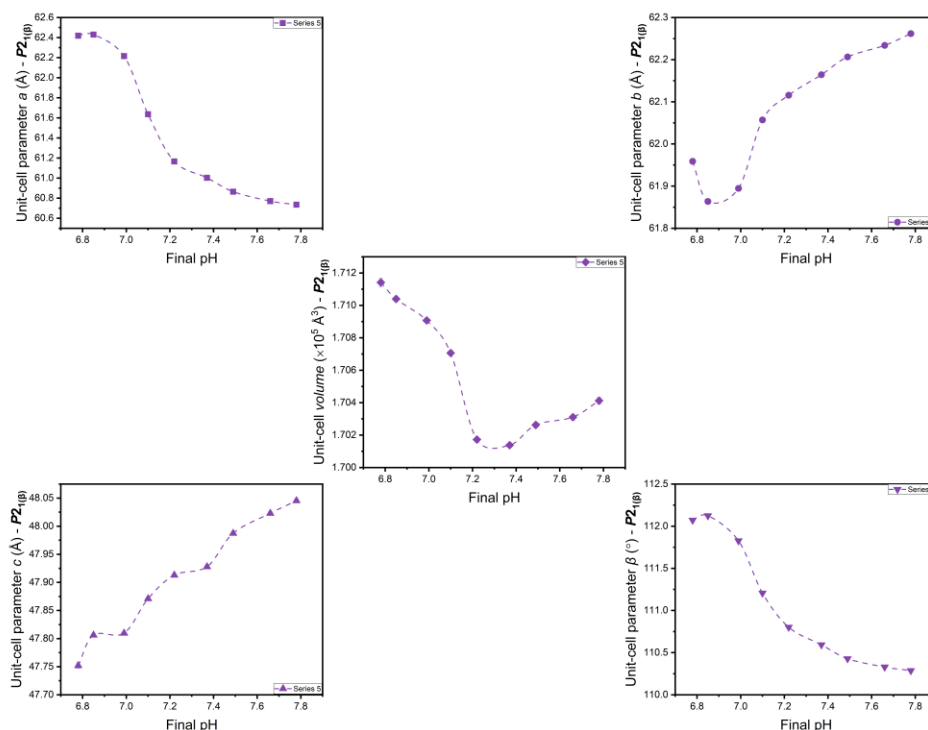
Εικόνα 5-31. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_{1(\gamma)}$ για την 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη.



Εικόνα 5-32. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_{1(8)}$ για την 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη.



Εικόνα 5-33. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου C2 για την 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη.



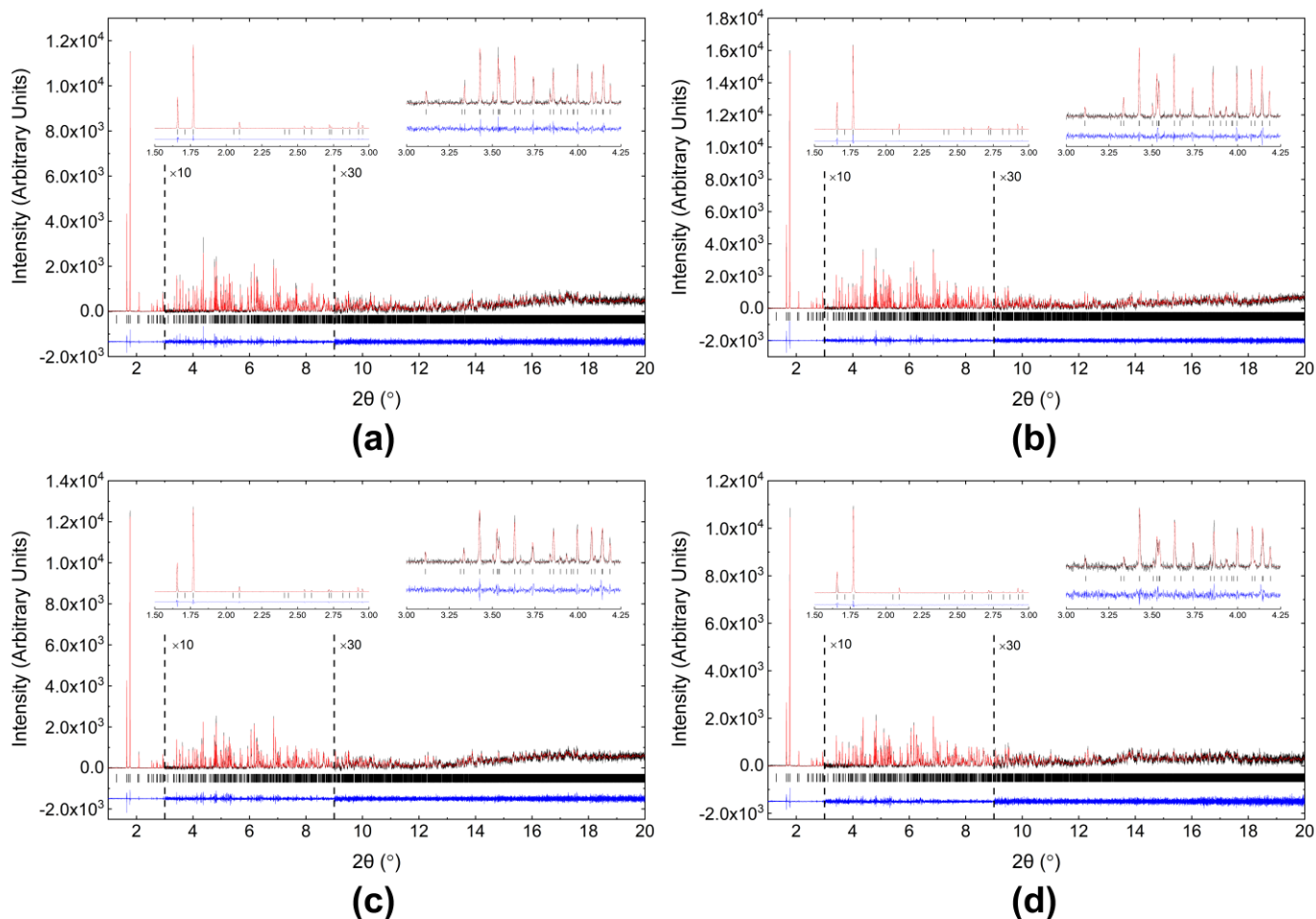
Εικόνα 5-34. Διαγράμματα μεταβολής των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_{1(g)}$ για την 5^η σειρά συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη.

5.2.3. Πρωταρχικά βήματα του δομικού χαρακτηρισμού του πολυμόρφου $P2_{1(g)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης και ρεσορσινόλης με σύγχροτον δεδομένα XRPD

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση δεδομένων XRPD από δείγματα ανθρώπινης ινσουλίνης σε σύμπλοκο με ρεσορσινόλη, τα οποία προέκυψαν από την 7^η σειρά συγκρυστάλλωσης και εμφάνισαν το πολύμορφο $P2_{1(g)}$. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό PRODD (Wright & Forsyth, 2000; Wright, 2004), το οποίο υποστηρίζει τη διεξαγωγή συνδυαστικής ανάλυσης Pawley (*multi-Pawley refinement*) σε πολλαπλά σετ δεδομένων ταυτόχρονα.

Τα datasets που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα rco712, rco713, rco714, rco715, rco716, rco717, rco718 και rco719. Αρχικά, κάθε dataset αναλύθηκε μεμονωμένα, προκειμένου να εξαχθούν ακόμη πιο αντιπροσωπευτικές πλεγματικές σταθερές και να εκτιμηθεί η ποιότητα της προσαρμογής των θεωρητικών προφίλ (**Εικόνα 5-35**). Στη συνέχεια, μέσω της συνδυαστικής Pawley ανάλυσης, όλα τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε ένα κοινό σύνολο εντάσεων, ενώ επιτράπηκε η διαφοροποίηση μόνο στις πλεγματικές παραμέτρους κάθε dataset. Το dataset που χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά ήταν το rco712, καθώς ήταν αυτό με τις καλύτερες στατιστικές παραμέτρους εκ των οκτώ. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε διάγραμμα περίθλασης περιγράφηκε ως άθροισμα επικαλυπτόμενων ανακλάσεων, των οποίων οι εντάσεις θεωρήθηκαν κοινές μεταβλητές σε μια διαδικασία βελτιστοποίησης ελαχίστων τετραγώνων.

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τόσο τον έλεγχο της ισομορφίας των δεδομένων όσο και την αξιολόγηση της ποιότητας της προσαρμογής μέσω των στατιστικών δεικτών R_{wp} και χ^2 . Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο φορές, καθώς το πρόγραμμα PRODD επιτρέπει την συνδυαστική ανάλυση έως και έξι dataset ταυτόχρονα. Η ανάλυση ανέδειξε ότι τα datasets της σειράς 7 παρουσίαζαν υψηλή μεταξύ τους συμφωνία, γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία τους για μελλοντικά βήματα δομικού χαρακτηρισμού του εν λόγω πολυμόρφου (**Πίνακες 5-22 & 5-23**).



Εικόνα 5-35. Αναλύσεις κατά Pawley δεδομένων XRPD από σύγχροτρον ανθρώπινης ινσουλίνης σε συγκρουστικότητα με ρεσορσινόλη σε διαφορετικές τιμές pH. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF ($\lambda = 1.30079(2) \text{ \AA}$, 298 K), επιβεβαιώνοντας την παρουσία της μονοκλινούς φάσης $P2_1(\beta)$ σε όλα τα δείγματα. Η μαύρη, κόκκινη και μπλε γραμμή αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα, το υπολογισμένο προφίλ και τη διαφορά μεταξύ τους, αντίστοιχα, ενώ οι μαύρες κάθετες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των ανακλάσεων Bragg, σύμφωνα με την φάση $P2_1(\beta)$. Τα ένθετα παρουσιάζουν μεγεθυμένες περιοχές 2θ . **(a)** κωδικός δείγματος rco714 με πλεγματικές σταθερές $a = 61.2159(4) \text{ \AA}$, $b = 61.8927(5) \text{ \AA}$, $c = 47.8838(4) \text{ \AA}$, $\beta = 110.5160(1)^\circ$, και με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp} = 4.987\%$ και $\chi^2 = 1.1575$. **(b)** κωδικός δείγματος rco716 με πλεγματικές σταθερές $a = 61.2149(4) \text{ \AA}$, $b = 61.9361(3) \text{ \AA}$, $c = 47.9603(3) \text{ \AA}$, $\beta = 110.4790(1)^\circ$, και με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp} = 4.567\%$ και $\chi^2 = 1.2244$. **(c)** κωδικός δείγματος rco718 με πλεγματικές σταθερές $a = 61.1910(7) \text{ \AA}$, $b = 61.9076(7) \text{ \AA}$, $c = 47.9508(5) \text{ \AA}$, $\beta = 110.4215(2)^\circ$, και με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp} = 5.284\%$ και $\chi^2 = 1.3177$. **(d)** κωδικός δείγματος rco719 με πλεγματικές σταθερές $a = 61.1209(6) \text{ \AA}$, $b = 61.8823(6) \text{ \AA}$, $c = 47.9325(5) \text{ \AA}$, $\beta = 110.4521(2)^\circ$, και με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp} = 4.747\%$ και $\chi^2 = 1.2029$.

Πίνακας 5-22. Στατιστικά αποτελέσματα της συνδυαστικής ανάλυσης Pawley στο λογισμικό PRODD για τα δείγματα rco712, rco713, rco714 και rco715. Παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών R_{exp} , R_{wp} και χ^2 , τόσο για κάθε dataset ξεχωριστά όσο και για τη συνολική fit. Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του refinement και της μεταξύ τους ισομορφίας.

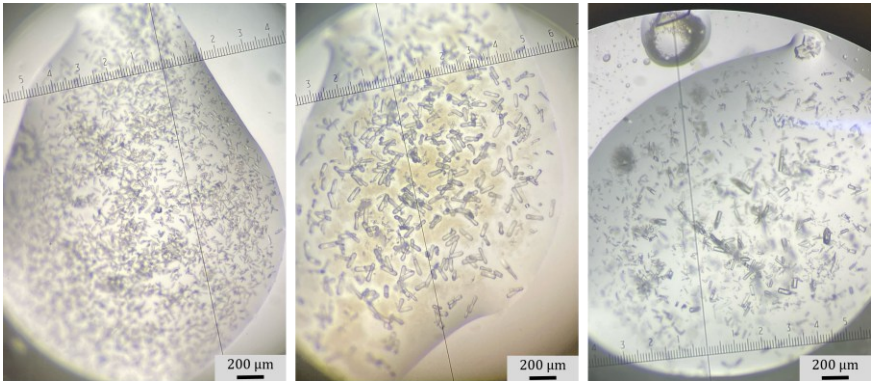
Multi-profile Pawley Analysis for rco712, rco713, rco714 & rco715 - PRODD					
	Total	rco712	rco713	rco714	rco715
$R_{exp} (\%)$	3.9601	3.6453	3.6865	4.629	4.0717
$R_{wp} (\%)$	5.096	4.681	5.401	5.331	5.024
χ^2	1.6561	1.6489	2.1461	1.3265	1.5226

Πίνακας 5-23. Στατιστικά αποτελέσματα της συνδυαστικής ανάλυσης Pawley στο λογισμικό PRODD για τα δείγματα rco712, rco716, rco717, rco718 και rco719. Παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών R_{exp} , R_{wp} και χ^2 , τόσο για κάθε dataset ξεχωριστά όσο και για το συνολικό fit. Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της ποιότητας του refinement και της μεταξύ τους ισομορφίας.

Multi-profile Pawley Analysis for rco712, rco716, rco717, rco718 & rco719 - PRODD						
	Total	rco712	rco716	rco717	rco718	rco719
R_{exp} (%)	3.9366	3.6435	4.1195	3.3582	4.5946	4.3184
R_{wp} (%)	5.041	4.708	4.846	4.955	5.668	5.254
χ^2	1.64	1.6697	1.3837	2.1766	1.5221	1.4801

5.2.4. Αποτελέσματα δεδομένων SCXRD – Το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(g)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης

Η ταυτοποίηση του νέου κρυσταλλικού πολυμόρφου $P2_{1(g)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης στην 8^η σειρά κρυστάλλωσης, δημιούργησε την ανάγκη αναπαραγωγής των συνθηκών κρυστάλλωσης και σε πειράματα με την μέθοδο διάχυσης ατμών (**Εικόνα 5-36**).



Εικόνα 5-36. Εικόνες μονοκρυστάλλων, οι οποίοι αναπτύχθηκαν σε συνθήκες (**αριστερά**) pH= 4.60, [PO₄]= 0.4 M, [ZnAc₂]= 1 mM, [rco]= 25 mM, [NaSCN]= 9 mM, (**μέση**) pH= 4.60, [PO₄]= 0.5 M, [ZnAc₂]= 1 mM, [rco]= 25 mM, [NaSCN]= 9 mM, (**δεξιά**) pH= 4.60, [PO₄]= 0.4 M, [ZnAc₂]= 1 mM, [NaSCN]= 9 mM.

Η περίθλαση μονοκρυστάλλου (πείραμα Ιουνίου 2024), ο οποίος αναπτύχθηκε σε pH= 4.40, [PO₄]= 0.5 M, [ZnAc₂]= 3 mM και [NaSCN]= 9 mM, έδειξε την ύπαρξη του συγκεκριμένου κρυσταλλικού πολυμόρφου με πλεγματικές σταθερές $a=46.151 \text{ \AA}$, $b=68.905 \text{ \AA}$, $c=81.861 \text{ \AA}$ και $\beta=104.704^\circ$ σε ευκρίνεια 79.18 - 2.5 $\text{\AA}$. Αναλυτικά στοιχεία που σχετίζονται με την συλλογή δεδομένων και την επεξεργασία τους αναγράφονται στον **Πίνακα 5-24**.

Πίνακας 5-24. Στοιχεία που σχετίζονται με την συλλογή και την επεξεργασία δεδομένων SCXRD για το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_{1(g)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδότη ρεσορσινόλη.

Ονομασία δείγματος	HI_rco_mk3001_F6
Συλλογή δεδομένων	
Πηγή ακτινοβολίας	DESY, P13
Ανιχνευτής	EIGER 16M
Μήκος κύματος	0.976200 $\text{\AA}$
Απόσταση κρυστάλλου & ανιχνευτή	323.36 mm
Γωνία περιστροφής ανά εικόνα	0.1°
Συνολικό εύρος περιστροφής	0°-360°
Θερμοκρασία	100 K
Επεξεργασία δεδομένων	

Space Group	$P 1 2_1 1 (4) [P2_1(γ)]$
Πλεγματικές σταθερές	$a=46.151 \text{ \AA}, b=68.905 \text{ \AA}, c=81.861 \text{ \AA}$ $\beta=104.704^\circ$
Εύρος ευκρίνειας	79.18-2.50 $\text{\AA}$
Αριθμός συνολικών ανακλάσεων	119296
Αριθμός μοναδικών ανακλάσεων	17293
Μωσαϊκότητα	0.45°
Πολλαπλότητα	6.9
Πληρότητα	99.7%
$I/\sigma(I)$	4.4
$CC_{1/2}$	0.993
R_{meas}	31.2%
R_{merge}	28.8%
$R_{\text{p.i.m.}}$	11.8%

Όσον αφορά τα δείγματα που συλλέχθηκαν για το πείραμα του Ιουνίου 2025, σε μερικές περιπτώσεις τα δείγματα που ψαρεύτηκαν διαπιστώθηκε πως ανήκαν σε κρυστάλλους αλάτων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι μονοκρύσταλλοι πρωτεΐνης δεν έδωσαν σήμα περίθλασης.

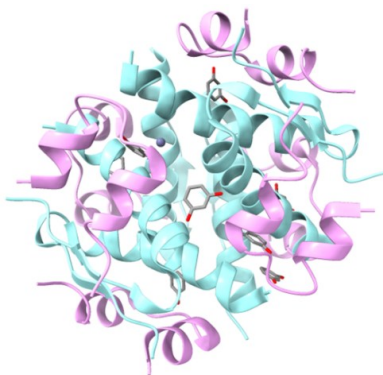
5.3. Συμπεράσματα & Συζήτηση

Ο κρυσταλλικός και μοριακός πολυμορφισμός της ινσουλίνης έχει μελετηθεί εκτενώς από την ερευνητική ομάδα Βιοχημείας, Δομικής Βιολογίας & Κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ του Πανεπιστημίου Πατρών, οδηγώντας στην δημιουργία ενός λεπτομερούς χάρτη πολυμόρφων σε εύρος τιμών pH και παρουσία ποικιλίας οργανικών προσδετών (Karavassili et al., 2012; Fili et al., 2015; Valmas et al., 2015; Karavassili et al., 2017; Karavassili et al., 2020; Triandafillidis, Parthenios et al., 2020; Spiliopoulou et al., 2020; Spiliopoulou et al., 2021). Οι φαινολικοί προσδέτες, όπως η φαινόλη, η m-κρεσόλη και η ρεσορσινόλη, έχουν αποδειχτεί ικανοί να επάγουν τον σχηματισμό συγκεκριμένων φάσεων, μέσω πρόσδεσής τους σε χαρακτηριστικές θέσεις των εξαμερών της ινσουλίνης. Ωστόσο, η πολυμορφική συμπεριφορά δεν εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος του προσδέτη ή την συνθήκη pH, αλλά φαίνεται ότι και άλλοι πειραματικοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του προσδέτη ή η παρουσία υποκαταστατών, μπορούν να οδηγήσουν σε νέα μη καταγεγραμμένα πολύμορφα. Η ταυτοποίηση νέων πολυμόρφων, καθώς και η λεπτομερής μελέτη των ήδη γνωστών, είναι υψηλής σημασίας για τη φαρμακευτική αξιοποίηση της ινσουλίνης. Τα κρυσταλλικά σκευάσματα επιτρέπουν την αποθήκευση μεγαλύτερης ποσότητας δραστικής ουσίας, ενισχύουν την χημική της σταθερότητα και μπορούν να παρατείνουν τον χρόνο δράσης του φαρμάκου. Παράλληλα, η παρουσία οργανικών προσδετών που σταθεροποιούν συγκεκριμένες κρυσταλλικές μορφές μπορεί να βελτιώσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του σκευάσματος, ενώ ταυτόχρονα να προσδώσει και επιπλέον φαρμακολογικά οφέλη, καθώς πολλά φαινολικά μόρια χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Έτσι, η χαρτογράφηση του πολυμορφισμού της ινσουλίνης δεν περιορίζεται σε μια αμιγώς δομική μελέτη, αλλά αποκτά ευρύτερη σημασία στο πλαίσιο του σχεδιασμού φαρμάκων βάσει δομής (*Structure-Based Drug Design – SBDD*), όπου η κατανόηση της τρισδιάστατης οργάνωσης των φαρμακευτικών πρωτεϊνών συνδέεται άμεσα με την βελτίωση της φαρμακοκινητικής τους, αλλά και την μελέτη της πιθανής τοξικότητάς διάφορων πρόσθετων που περιέχουν (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity – ADME-Tox*).

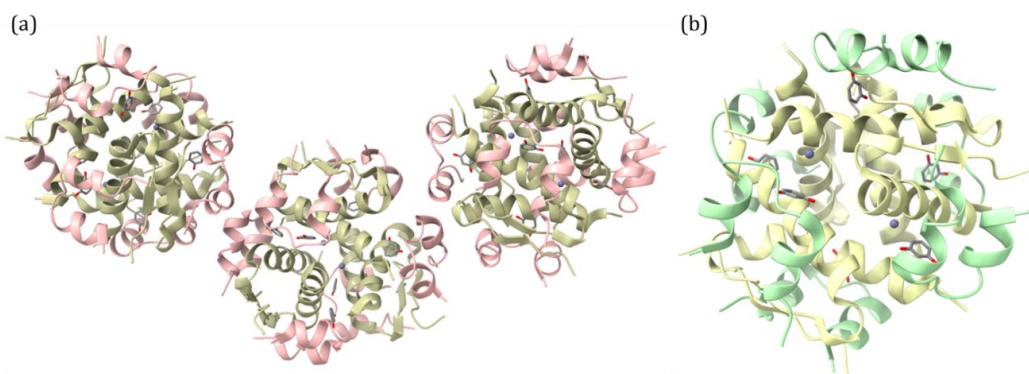
Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία εστίασε στην μελέτη της ινσουλίνης παρουσία δύο συγγενικών φαινολικών προσδετών, της ρεσορσινόλης και της 4-χλωρορεσορσινόλης, αξιοποιώντας

δεδομένα XRPD που συλλέχθηκαν σε εγκαταστάσεις σύγχροτων. Η ανάλυση ανέδειξε την ιδιαίτερη ευαισθησία του πολυμορφισμού τόσο στις συνθήκες pH όσο και στην συγκέντρωση του προσδέτη, ενώ παράλληλα κατέγραψε διαφοροποιήσεις μεταξύ ρεσορσινόλης και 4-χλωρορεσορσινόλης, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην χημική φύση των μορίων.

Η επίδραση του pH στον πολυμορφισμό της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία ρεσορσινόλης έχει μελετηθεί και στο παρελθόν. Η χρήση της τεχνικής SCXRD απέδειξε, ότι η ρεσορσινόλη προσδένεται στις φαινολικές θέσεις και σταθεροποιεί το R₆ εξαμερές (κρυσταλλικό πολύμορφο P2_{1(β)}), παρέχοντας μια πρώτη άμεση απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο οι φαινολικοί προσδέτες επηρεάζουν τη δομή (Smith et al., 2000) (**Εικόνα 5-37**). Επίσης, μελετήθηκαν οι αλλαγές που προκαλεί το pH σε συστήματα με φαινολικά μόρια και καταγράφηκαν τα κρυσταλλικά πολύμορφα ορθορομβικής συμμετρίας C222₁ και μονοκλινούς συμμετρίας C2, ακολουθώντας με την επίλυση των προαναφερθέντων δομών (R₆ μοριακή διαμόρφωση) και την επιβεβαίωση ότι η μεταβολή του pH μπορεί να επάγει τον σχηματισμό διαφορετικών πολυμόρφων (Norrman & Schluckebier, 2007) (**Εικόνα 5-38**). Συμπληρωματικά, στην δημοσίευση των Karavassili et al. (2012), χρησιμοποιώντας την τεχνική XRPD καταγράφηκε η εμφάνιση πολλών πολυμόρφων παρουσία ρεσορσινόλης σε διαφορετικά pH, μεταξύ των οποίων και το μονοκλινές πολύμορφο P2_{1(α)}, εμπλουτίζοντας τον ήδη υπάρχοντα χάρτη φάσεων της ινσουλίνης.



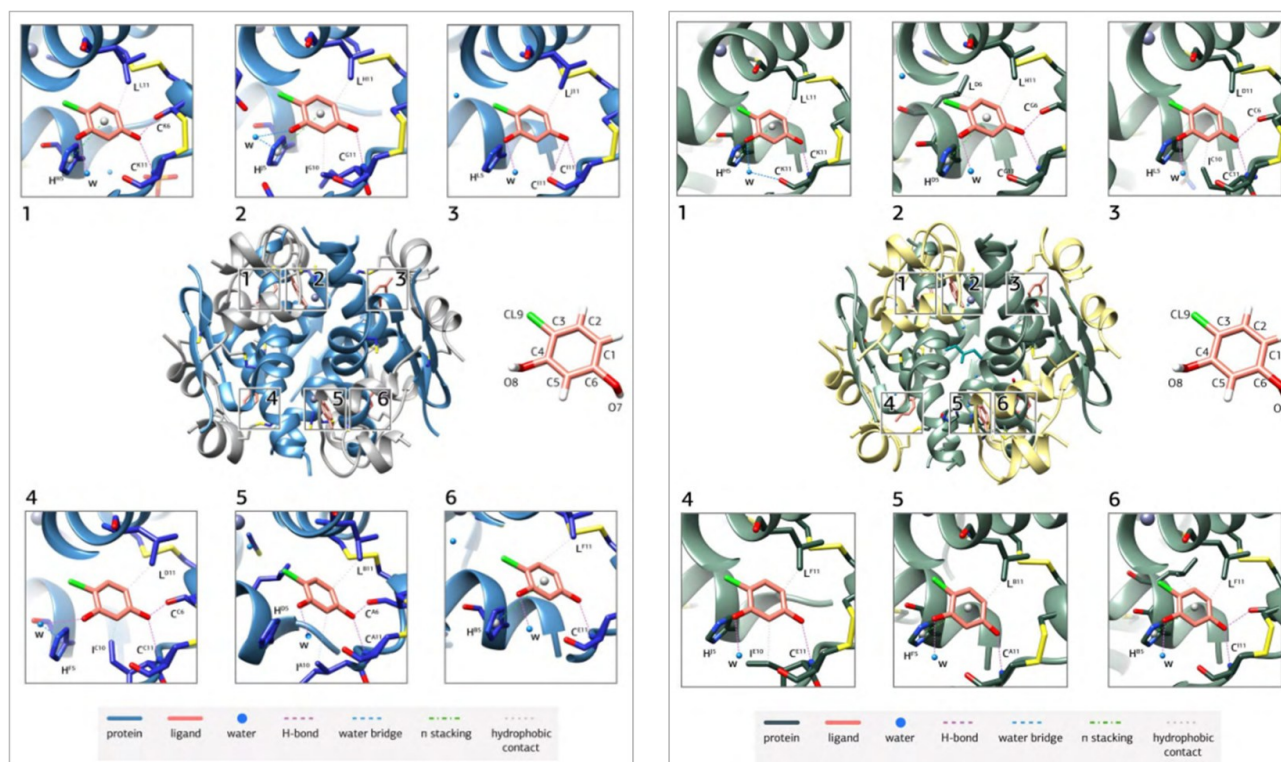
Εικόνα 5-37. Το δομικό μοντέλο του κρυσταλλικού πολυμόρφου P2_{1(β)} του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη, με μοριακή διαμόρφωση R₆ (PDB ID: 1evr; Πηγή: Smith et al., 2000).



Εικόνα 5-38. (a) Το δομικό μοντέλο του κρυσταλλικού πολυμόρφου C222₁ του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη, με μοριακή διαμόρφωση R₆ (PDB ID: 2om1). (b) Το δομικό μοντέλο του κρυσταλλικού πολυμόρφου C2 του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδέτη ρεσορσινόλη, με μοριακή διαμόρφωση R₆ (PDB ID: 2olz; Πηγή: Norrman & Schluckebier, 2007).

Η 4-χλωρορεσορσινόλη μελετήθηκε πιο πρόσφατα (Spirlioroulou et al., 2021) και αποδείχθηκε ότι ο συγκεκριμένος προσδέτης σταθεροποιεί μονοκλινείς φάσεις (P2₁ και C2) σε εύρος τιμών pH. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση των συγκεκριμένων πολυμόρφων έχει επιβεβαιωθεί και από πειράματα κρυσταλλώσεων με την χρήση της μεθόδου διάχυσης ατμών, κατά τα οποία προέκυψαν μονοκρυσταλλοί

των ίδιων φάσεων σε αντίστοιχα pH κρυστάλλωσης, οδηγώντας στην επίλυση των δομών μερικών από αυτά, συγκεκριμένα των πολυμόρφων $P2_1(\beta)$ και $C2$ τα οποία έχουν μοριακή διαμόρφωση R_6 (Εικόνα 5-39) (Σπηλιοπούλου, 2023). Όλες αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι μικρές διαφοροποιήσεις στον φαινολικό δακτύλιο, όπως για παράδειγμα η υποκατάσταση της θέσης 4 με ένα μόριο Cl, επηρεάζουν άμεσα το μοτίβο εμφάνισης κρυσταλλικών πολυμόρφων σε εύρος pH.



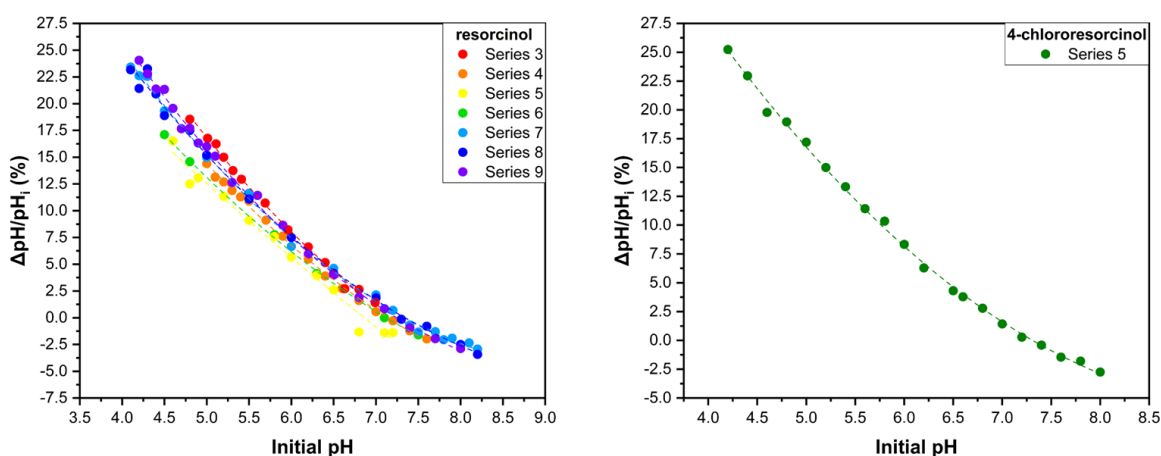
Εικόνα 5-39. Τα δομικά μοντέλα των κρυσταλλικών πολυμόρφων $C2$ (αριστερά) και $P2_1(\beta)$ (δεξιά) της ανθρώπινης ινσουλίνης σε σύμπλοκο με 4-χλωρορεσορσινόλη. Οι δομές προέκυψαν από πειράματα περίθλασης SCXRD, και διαπιστώθηκε η R_6 μοριακή διαμόρφωση και για τα δύο πολύμορφα (Πηγή: Σπηλιοπούλου, 2023 - Τροποποιημένο).

Η διαμόρφωση των εξαμερών της ινσουλίνης μπορεί να εξαρτάται άμεσα από την ιοντική ισχύ και την εξέλιξη του pH κατά την κρυστάλλωση, ακόμη και χωρίς την παρουσία οργανικού προσδέτη, όπως έδειξε η επίλυση της δομής της κυβικής ινσουλίνης (Triandafillidis et al., 2023). Η ίδια παράμετρος εξετάστηκε συστηματικά για τις σειρές με ρεσορσινόλη και με 4-χλωρορεσορσινόλη, συγκρίνοντας την αρχική τιμή pH των διαλυμάτων κρυστάλλωσης με την τελική πριν από τη συλλογή δεδομένων. Τα σχετικά διαγράμματα (Εικόνα 5-40) δείχνουν ότι οι μεγαλύτερες μεταβολές εμφανίζονται στο όξινο εύρος pH, όπου πράγματι παρατηρείται και η μεγαλύτερη πολυμορφική αστάθεια, με συχνές εμφανίσεις διαφορετικών φάσεων και συνυπάρξεων αυτών. Αντίθετα, σε υψηλότερες τιμές pH οι αποκλίσεις μειώνονται σημαντικά, καθώς τα διαλύματα λειτουργούν πιο ρυθμιστικά.

Τα δεδομένα από τις σειρές 7, 8 και 9 με ρεσορσινόλη επιβεβαίωσαν την έντονη pH-εξαρτώμενη συμπεριφορά της ινσουλίνης, σε συμφωνία με τα διαγράμματα φάσης που έχουν ήδη δημοσιευθεί, αλλά με την κρίσιμη διαφοροποίηση ότι, στα όξινα pH της σειράς 8, όπου χρησιμοποιήθηκε διπλάσια συγκέντρωση προσδέτη, παρατηρήθηκε η εμφάνιση του νέου πολυμόρφου $P2_1(\gamma)$. Η εμφάνιση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της 9ης σειράς, όπου επαναλήφθηκε η διπλάσια συγκέντρωση ρεσορσινόλης (Εικόνα 5-41), καθώς και από μετρήσεις SCXRD κατά τις οποίες ταυτοποιήθηκε δείγμα της ίδιας φάσης. Αντίστοιχα, για την 5η σειρά ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης, τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τις ήδη υπάρχουσες παρατηρήσεις (Εικόνα 5-42). Η παρατήρηση αυτή συνάδει με παλαιότερες αναφορές ότι μικρές αλλαγές στους εξωτερικούς παράγοντες, όπως η παρουσία

χαοτροπικών ή οργανικών μορίων με διαφορετική χημική φύση, μπορούν να μετατοπίσουν τις ισορροπίες και να οδηγήσουν στην εμφάνιση νέων φάσεων (Norrman & Schluckebier, 2007). Ωστόσο, στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για μια αλλαγή ποσοτική και όχι ποιοτική, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ισορροπία των πολυμόρφων είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην συγκέντρωση του προσδέτη. Είναι πιθανό η αυξημένη συγκέντρωση να προκαλεί πλήρωση και δευτερευουσών θέσεων πρόσδεσης ή να ενισχύει ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ εξαμερών, οδηγώντας σε εναλλακτικό κρυσταλλικό πακετάρισμα. Παρ' όλα αυτά, οι επιλύσεις των κρυσταλλικών πολυμόρφων $P21(\gamma)$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία m-κρεσόλης (Karavassili et al., 2020) και 4-βρωμορεσορσινόλης (Σπηλιοπούλου, 2023) έδειξαν προσδέσεις των προαναφερθέντων μορίων βάσει του κλασσικού προτύπου πρόσδεσής τους, δηλαδή έξι μόρια προσδέτη ανά εξαμερές R_6 μοριακής διαμόρφωσης. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη και η επίλυση δομής του νέου πολυμόρφου που αναφέρεται στην παρούσα εργασία, ώστε να επιβεβαιωθεί ή απορριφθεί ή παραπάνω θέση.

Η ταυτοποίηση του $P21(\gamma)$ πολυμόρφου με αυξημένη συγκέντρωση ρεσορσινόλης αποτελεί επομένως σημαντική συμβολή στην περαιτέρω κατανόηση του πολυμορφισμού της ινσουλίνης. Η παρουσία νέων μορφών που εξαρτώνται από τον λόγο [ινσουλίνη]:[προσδέτη] μπορεί να έχει πρακτική σημασία στην φαρμακευτική ανάπτυξη, καθώς δείχνει ότι η συγκέντρωση του προσδέτη ίσως να έχει και ανάλογο έλεγχο στον πολυμορφισμό με αυτόν του pH.

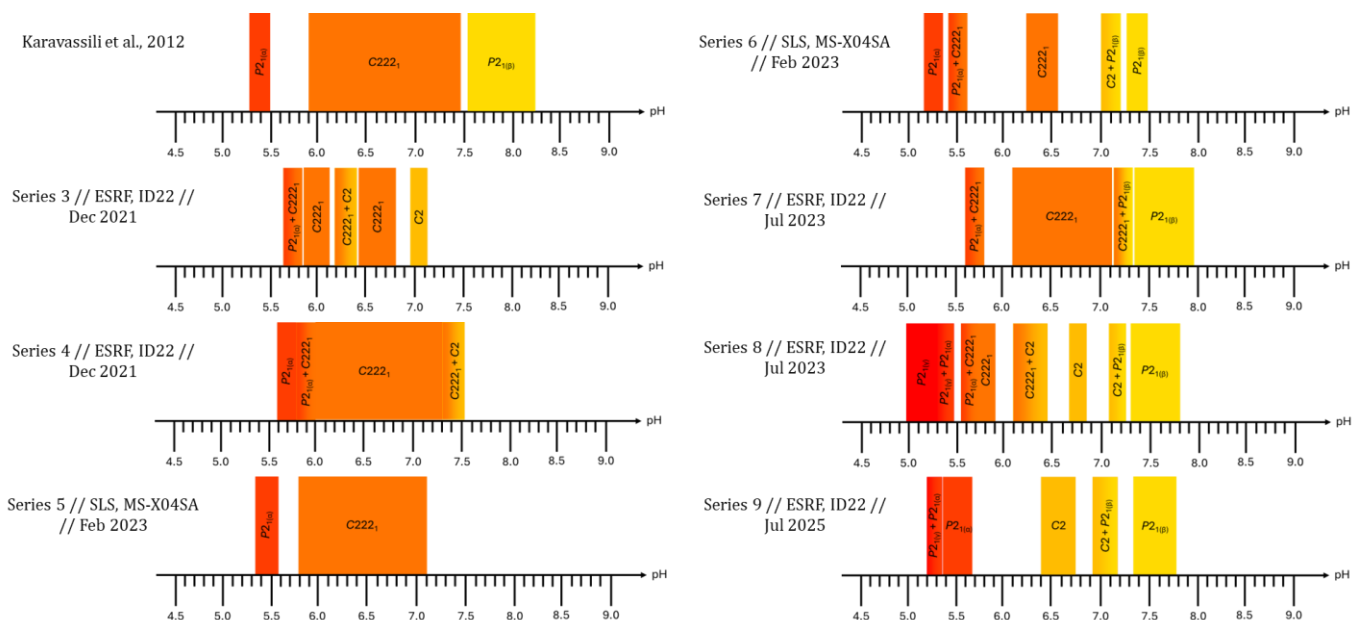


Εικόνα 5-40. Διαγράμματα ποσοστιαίας μεταβολής του pH συναρτήσει της αρχικής τιμής pH. Οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρούνται στα όξινα pH, ενώ κοντά στα ουδέτερα και βασικά τα διαλύματα φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη ρυθμιστική ικανότητα. Στα αριστερά απεικονίζονται οι μεταβολές για την περίπτωση της ρεσορσινόλης, ενώ στα δεξιά απεικονίζονται οι μεταβολές για την περίπτωση της 4-χλωρορεσορσινόλης.

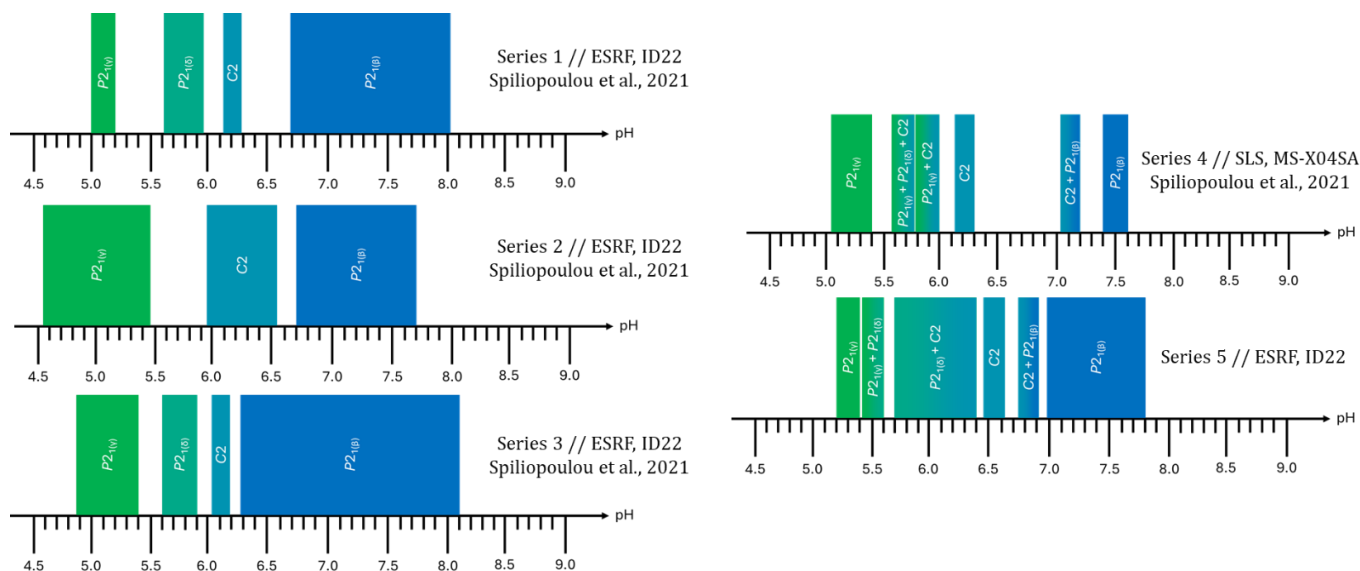
Συνολικά, η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι ο πολυμορφισμός της ανθρώπινης ινσουλίνης αποτελεί ένα ιδιαίτερα δυναμικό φαινόμενο, το οποίο ρυθμίζεται όχι μόνο από τον παράγοντα pH αλλά και από την παρουσία και τη συγκέντρωση φαινολικών προσδετών. Οι σειρές συγκρυστάλλωσης αποκάλυψαν ήδη γνωστά κρυσταλλικά πολύμορφα, αλλά και νέες φάσεις, όπως η $P21(\gamma)$, η οποία δεν είχε καταγραφεί προηγουμένως στα διαγράμματα φάσεων της ρεσορσινόλης. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει ότι ο χάρτης πολυμορφισμού της ινσουλίνης δεν είναι στατικός αλλά συνεχώς επεκτεινόμενος, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες.

Μελλοντικά, αξίζει να συνεχιστεί η συστηματική χαρτογράφηση των πολυμόρφων της ινσουλίνης, μελετώντας ευρύτερη γκάμα προσδετών, συγκεντρώσεων και πειραματικών συνθηκών. Ιδιαίτερα σημαντικές προοπτικές ανοίγονται με την χρήση συνδυαστικών τεχνικών περίθλασης ακτίνων-X υψηλής ανάλυσης για την πλήρη επίλυση νέων δομών. Παράλληλα, η διερεύνηση της σταθερότητας των

πολυμόρφων υπό ελεγχόμενες μεταβολές σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας αναμένεται να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την συμπεριφορά τους σε συνθήκες που προσομοιάζουν την αποθήκευση και την χορήγηση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Μια τέτοια κατεύθυνση, όπως παρουσιάζεται στο επόμενο κεφάλαιο, θα συμβάλει ουσιαστικά στον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων κρυσταλλικών μορφών ινσουλίνης με βελτιωμένη σταθερότητα και φαρμακοκινητική συμπεριφορά.



Εικόνα 5-41. Διαγράμματα φάσεων σειρών συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη ρεσορσινόλη ως συνάρτηση του τελικού pH. Τα δεδομένα για το πρώτο διάγραμμα φάσης (άνω αριστερά) πάρθηκαν από την δημοσίευση των Karavassili et al. (2012).



Εικόνα 5-42. Διαγράμματα φάσεων σειρών συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη ως συνάρτηση του τελικού pH. Τα δεδομένα για τα διαγράμματα φάσης των τεσσάρων πρώτων σειρών πάρθηκαν από την δημοσίευση των Spiliopoulou et al. (2021).

6. *In situ* XRPD κρυσταλλογραφική μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας σε κρυστάλλους πρωτεϊνών

Η μελέτη της συμπεριφοράς των πρωτεϊνικών κρυστάλλων υπό ελεγχόμενες μεταβολές **σχετικής υγρασίας** (*relative humidity, rH*) αποτελεί κρίσιμο εργαλείο για την κατανόηση της σταθερότητας και της διαμόρφωσης των βιομορίων στην στερεά κατάσταση. Η σχέση πρωτεϊνών και νερού έχει αναγνωριστεί ήδη από τις πρώτες κρυσταλλογραφικές μελέτες, καθώς η ενυδάτωση επηρεάζει άμεσα την σταθερότητα και την λειτουργικότητα των μακρομορίων (Boyes-Watson et al., 1947; Huxley & Kendrew, 1953). Το νερό που βρίσκεται στο εσωτερικό των κρυστάλλων ρυθμίζει τις κρυσταλλικές διεπαφές και καθορίζει την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική τους (Kuntz & Kauzmann, 1974). Ακόμα και μικρές μεταβολές στο περιεχόμενο νερού μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές των πλεγματικών σταθερών, σε μεταβολές της κρυσταλλικής συμμετρίας ή ακόμη και σε πλήρη αναδιάταξη της δομής (Salunke et al., 1985).

Η ανάπτυξη τεχνικών ελεγχόμενης αφυδάτωσης και ενυδάτωσης κατά την συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ έδωσε την δυνατότητα μελέτης δομικών αλλαγών σε πραγματικό χρόνο. Οι *in situ* μετρήσεις έχουν δείξει ότι οι κρύσταλλοι πρωτεϊνών μπορούν να παρουσιάσουν είτε αναστρέψιμες είτε μη αναστρέψιμες μεταβολές, αντικατοπτρίζοντας την δυναμική ισορροπία μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και των μορίων του διαλύτη (Dobrianov et al., 2001). Ειδικότερα, η HEWL έχει αποτελέσει κλασσικό μοντέλο για την κατανόηση αυτών των διεργασιών. Οι μεταβολές στην σχετική υγρασία έχουν δείξει ότι επηρεάζουν το κρυσταλλικό πλέγμα επιφέροντας σταδιακές αλλαγές στις πλεγματικές σταθερές της τετραγωνικής λυσοζύμης (Logotheti et al., 2019), όπως και στις πλεγματικές σταθερές μονοκλινούς λυσοζύμης, ένα νέο πολύμορφο που ταυτοποιήθηκε με την χρήση της τεχνικής XRPD (Trampani et al., 2018). Παράλληλα, μελέτες σε μοριακό επίπεδο ανέδειξαν ότι η ενυδάτωση και η θερμοκρασία επιδρούν στην ευκαμψία και την ετερογένεια των πλευρικών αλυσίδων της λυσοζύμης, γεγονός που επίσης υπογραμμίζει την στενή σχέση ανάμεσα στις δυναμικές των πρωτεϊνών και των συνθηκών του περιβάλλοντος (Atakisi et al., 2018).

Εκτός των πρωτεϊνών μοντέλα, η ελεγχόμενη μεταβολή της υγρασίας έχει χρησιμοποιηθεί και στην μελέτη φαρμακευτικών πεπτιδίων, αναδεικνύοντας την σημασία αυτής της προσέγγισης σε εφαρμοστικά πλαίσια. Στην περίπτωση του πεπτιδίου οκτρεοτίδη (*octreotide*), παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές δομικές αποκρίσεις υπό συνθήκες ελεγχόμενων μεταβολών σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας, με άμεσες προεκτάσεις για την φαρμακευτική του σταθερότητα (Athanasiadou et al., 2024). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η κατανόηση των επιδράσεων της υγρασίας δεν περιορίζεται στην θεμελιώδη βιοφυσική, αλλά επεκτείνεται και στην βελτίωση της φαρμακευτικής συμπεριφοράς.

Η ανθρώπινη ινσουλίνη, ως μια από τις σημαντικότερες θεραπευτικές πρωτεΐνες, αποτελεί ιδιαίτερη περίπτωση για την μελέτη του πολυμορφισμού και της σταθερότητας υπό διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες. Είναι γνωστό ότι η παρουσία φαινολικών προσδετών επηρεάζει καθοριστικά τον σχηματισμό και την επικράτηση συγκεκριμένων πολυμόρφων, ωστόσο όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες (Παπαευθυμίου, 2024; Κονταρίνης 2024; Kontarinis, Papaefthymiou et al., 2025), η σχετική υγρασία επιφέρει σταδιακές αλλαγές στις πλεγματικές σταθερές των συμπλόκων ινσουλίνης αλλά και στην κρυσταλλικότητα.

Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα εργασία εστιάζει στην μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας στο κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας $P2_1(\beta)$ της ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του

προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη (**Εικόνα 5-39**) (Spiliopoulou et al., 2021; Σπηλιοπούλου, 2023) υπό συνθήκες ελεγχόμενων σταδιακών μεταβολών, και στην τετραγωνική λυσοζύμη (**Εικόνα 6-30**) (Datta et al., 2001) υπό συνθήκες ελεγχόμενων διαδοχικών αυξομειώσεων. Μέσω *in situ* XRPD πειραμάτων και εφαρμογής πρωτοκόλλων ελεγχόμενων μεταβολών της υγρασίας διερευνώνται οι δομικές αποκρίσεις και οι αλλαγές των πλεγματικών σταθερών.

6.1. Υλικά & Μέθοδοι

6.1.1. Πειράματα κρυσταλλώσεων

6.1.1.1. Κρυσταλλώσεις ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του οργανικού προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη

Η συγκρυστάλλωση της ανθρώπινης ινσουλίνης με τον οργανικό προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο batch (*salting-out*; Hofmeister, 1888), με σκοπό την παραγωγή πολυκρυσταλλικού δείγματος. Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε δύο φορές με το ίδιο πρωτόκολλο για λόγους επαναληψιμότητας, την πρώτη φορά τον Ιούλιο 2024 και την δεύτερη φορά τον Ιούλιο 2025. Το πρωτόκολλο κρυστάλλωσης που ακολουθήθηκε έχει εφαρμοστεί σε προηγούμενες μελέτες συγκρυστάλλωσης της ανθρώπινης ινσουλίνης με οργανικούς προσδέτες (Karavassili et al., 2012; Valmas et al., 2015; Fili et al., 2015; Triandafillidis, Parthenios et al., 2020; Spiliopoulou et al., 2021) και παραχωρήθηκε από την προμηθεύτρια εταιρεία της ανθρώπινης ινσουλίνης *Novo Nordisk*.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την παραγωγή του διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε διάλυμα ΗΙ συγκέντρωσης 19 mg/mL και όγκου 3 mL, διαλύοντας 57 mg λυοφιλοποιημένης σκόνης ΗΙ σε ddH₂O. Στο διάλυμα ΗΙ προστέθηκε όγκος 0.345 mL διαλύματος ZnAc₂ συγκέντρωσης 10 mM, ώστε να δημιουργηθούν τα εξαμερή ινσουλίνης. Στο διάλυμα εξαμερών ινσουλίνης προστέθηκε όγκος 0.179 mL διαλύματος 4-χλωρορεσορσινόλης συγκέντρωσης 1 M (η 4-χλωρορεσορσινόλη διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο - DMSO) και επήλθε αναμονή πέντε λεπτών με σκοπό να υπάρξει σίγουρη πρόσδεση της 4-χλωρορεσορσινόλης στα εξαμερή ινσουλίνης. Μετά την παύση πέντε λεπτών, προστέθηκε όγκος 0.045 mL NaSCN συγκέντρωσης 1 M, με σκοπό την σταθεροποίηση των εξαμερών ΗΙ και ρεσορσινόλης. Το τελικό διάλυμα πρωτεΐνης που προέκυψε είχε τελικό όγκο 3.569 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 6-1**.

Πίνακας 6-1. Η σύσταση του διαλύματος πρωτεΐνης για την δημιουργία συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης.

Διάλυμα πρωτεΐνης					
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	HI	ZnAc ₂	chl	NaSCN
Αρχική συγκέντρωση	6	19 mg/mL	10 mM	1 M	1 M
Αρχικός όγκος		3 mL	0.345 mL	0.179 mL	0.045 mL
Τελική συγκέντρωση		15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM
Τελικό όγκος		3.569 mL			

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δύο stock διαλύματα ρυθμιστικών NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 2 M και K₂HPO₄ συγκέντρωσης 2 M, τα οποία αναμείχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες για να δημιουργηθεί ρυθμιστικό διάλυμα (PO₄ buffer) με τιμή pH=7.10. Η τιμή αυτή επιλέχθηκε καθώς βρίσκεται στο εύρος όπου αναμένεται το κρυσταλλικό πολύμορφο μονοκλινούς συμμετρίας P2₁(β).

Για την παρασκευή 6 πολυκρυσταλλικών δειγμάτων, αναμείχθηκαν 0.5 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.125 mL του PO₄ buffer. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.625 mL και οι τελικές

συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 6-2**.

Πίνακας 6-2. Η σύσταση των διαλυμάτων κρυστάλλωσης του συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης.

Διάλυμα κρυστάλλωσης					
Αντιδραστήριο	HI	ZnAc ₂	resorcinol	NaSCN	PO ₄ buffer [pHi=7.10]
Αρχική συγκέντρωση	15.97 mg/mL	0.97 mM	50.1 mM	12.6 mM	2 M
Αρχικός όγκος	0.5 mL				0.125 mL
Τελική συγκέντρωση	12.78 mg/mL	0.77 mM	40.06 mM	10.09 mM	0.4 M
Τελικός όγκος	0.625 mL				

6.1.1.2. **Κρυσταλλώσεις HEWL**

Η κρυστάλλωση της HEWL πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο batch, με σκοπό την παραγωγή πολυκρυσταλλικού δείγματος. Η πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε τρεις φορές, ώστε τις δύο πρώτες να συλλεχθούν δεδομένα περίθλασης διαφορετικών πρωτοκόλλων, τα οποία θα συζητηθούν παρακάτω, και ακόμη μία φορά που αποτέλεσε την επανάληψη αυτών. Τα πειράματα διεξήχθησαν τον Ιανουάριο 2024, τον Απρίλιο 2024 και τον Σεπτέμβριο 2024.

Η διαδικασία ξεκίνησε με την δημιουργία διαλύματος πρωτεΐνης. Προετοιμάστηκε stock διάλυμα HEWL συγκέντρωσης 200 mg/mL και όγκου 1.1 mL, διαλύοντας 220 mg HEWL σε ddH₂O. Στην συνέχεια προετοιμάστηκαν stock διαλύματα χλωριούχου νατρίου (NaCl) συγκέντρωσης 5 M, πολυαιθυλενογλυκόλης 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG-6000) συγκέντρωσης 60% w/v και οξικού νατρίου (sodium acetate, NaOAc) συγκέντρωσης 1 M. Για την παραγωγή stock διαλύματος παραγόντων καθίζησης αναμείχθηκαν 0.9 mL NaCl [5 M], 0.5 mL PEG-6000 [60% w/v] και 0.075 mL NaOAc [1 M], ενώ τελικά προστέθηκαν 0.025 mL ddH₂O. Το stock διάλυμα παραγόντων καθίζησης είχε τελικό όγκο 1.5 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστηρίου αναγράφονται στον **Πίνακα 6-3**.

Πίνακας 6-3. Η σύσταση του διαλύματος παραγόντων καθίζησης για την κρυστάλλωση της HEWL.

Διάλυμα παραγόντων καθίζησης					
Αντιδραστήριο	Αριθμός δειγμάτων	NaCl	PEG-6000	NaOAc	ddH ₂ O
Αρχική συγκέντρωση	4	5 M	60% w/v	1 M	
Αρχικός όγκος		0.9 mL	0.5 mL	0.075 mL	0.025 mL
Τελική συγκέντρωση		3 M	20% w/v	50 mM	
Τελικός όγκος		1.5 mL			

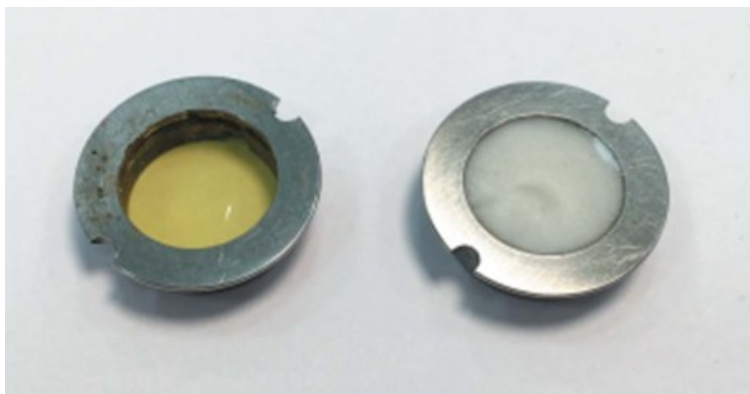
Για την παρασκευή 4 πολυκρυσταλλικών δειγμάτων, αναμείχθηκαν 0.25 mL του διαλύματος πρωτεΐνης με 0.25 mL του διαλύματος παραγόντων καθίζησης. Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 0.5 mL και οι τελικές συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων του διαλύματος κρυστάλλωσης αναγράφονται στον **Πίνακα 6-4**.

Πίνακας 6-4. Η σύσταση των διαλυμάτων κρυστάλλωσης της HEWL.

Διάλυμα κρυστάλλωσης				
Αντιδραστήριο	HEWL	NaCl	PEG-6000	NaOAc
Αρχική συγκέντρωση	200 mg/mL	3 M	20% w/v	50 mM
Αρχικός όγκος	0.25 mL	0.25 mL		
Τελική συγκέντρωση	100 mg/mL	1.5 M	10% w/v	25 mM
Τελικός όγκος	0.5 mL			

6.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Και στις δύο περιπτώσεις, τα πολυκρυσταλλικά ιζήματα συγκεντρώθηκαν μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του μητρικού υγρού (*mother liquor*). Για την τοποθέτησή τους χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί δειγματοφορείς διαμέτρου 12 mm, οι οποίοι καλύφθηκαν με φύλλο πολυαμιδίου (*kapton foil*) πάχους 125 μm . Η χρήση του kapton επιλέχθηκε καθώς μειώνει τη συμβολή του υποβάθρου στα προφίλ περίθλασης (Trampari et al., 2018; Logotheti et al., 2019; Athanasiadou et al., 2024; Kontarinis, Paraefthymiou et al., 2025). Κατά την μεταφορά, οι κρύσταλλοι τοποθετούνται στον δειγματοφορέα με την μικρότερη δυνατή καταπόνησή τους, χρησιμοποιώντας είτε σπάτουλα είτε πιπέτα. Οι κρύσταλλοι δεν είναι απόλυτα αφυδατωμένοι και παραμένει λιγοστό μητρικό υγρό ώστε να μην καταστραφούν, και για αυτόν τον λόγο πρέπει να έχει εξασφαλιστεί η σωστή συναρμολόγηση του δειγματοφορέα προκειμένου να μην υπάρχουν τυχούσες διαρροές (**Εικόνα 6-1**).



Εικόνα 6-1. Δειγματοφορέας με πολυμερές kapton. Στα αριστερά φαίνεται ένας άδειος δειγματοφορέας αμέσως μετά την συναρμολόγησή του, ενώ στα δεξιά φαίνεται ένας δειγματοφορέας γεμισμένος με δείγμα ακριβώς πριν την μέτρησή του.

6.1.3. Συλλογή δεδομένων περίθλασης

Τόσο για την περίπτωση της ινσουλίνης όσο και της HEWL, συλλέχθηκαν κάποια πρωταρχικά δεδομένα XRPD στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro (*Malvern Panalytical*), προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα πολύμορφα-στόχος και να εξαχθούν ακριβείς τιμές πλεγματικών σταθερών. Οι διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων και συλλογής δεδομένων πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στα **Υποκεφάλαια 5.1.2 & 5.1.3**.

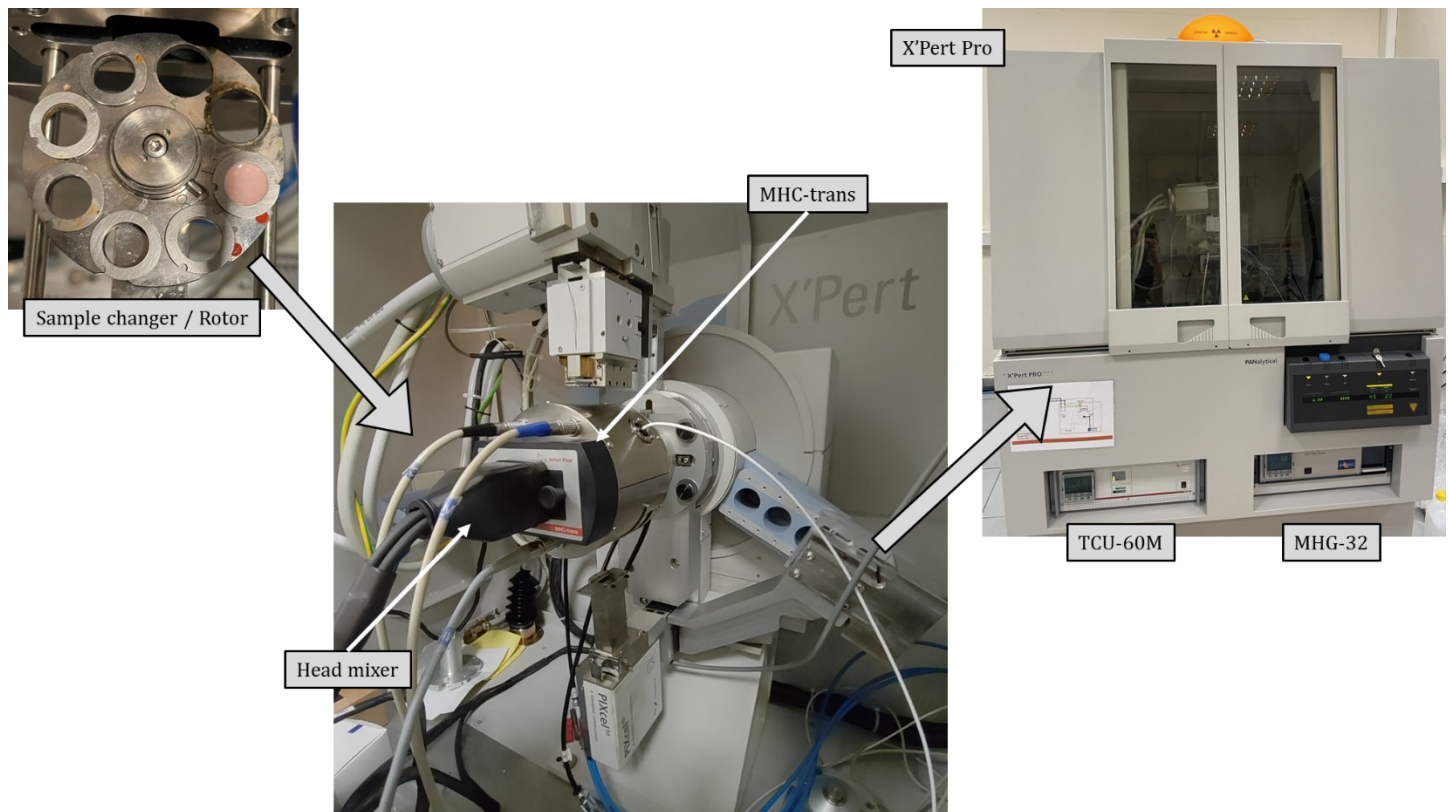
6.1.3.1. Θάλαμος σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας (MHC-trans, Anton Paar)

Για τη μελέτη της επίδρασης της σχετικής υγρασίας και της θερμοκρασίας σε πολυκρυσταλλικά δείγματα πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο θάλαμος MHC-trans (*Multi-sample Humidity Chamber, Anton Paar*), ο οποίος έχει ενσωματωθεί στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο. Ο θάλαμος αυτός είναι ειδικά σχεδιασμένος για *in situ* XRPD μετρήσεις και παρέχει προηγμένες δυνατότητες ελέγχου των περιβαλλοντικών παραμέτρων του δείγματος. Συγκεκριμένα, προσφέρει πλήρη ρύθμιση της σχετικής υγρασίας σε εύρος μεταξύ 5% και 95% rH για θερμοκρασίες μεταξύ 10 °C και 60 °C.

Ο έλεγχος των συνθηκών πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο εξωτερικών μονάδων, της MHG-32 (*Modular Humidity Generator*) η οποία είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της υγρασίας, και της TCU-60M (*Temperature Control Unit*) η οποία είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της θερμοκρασίας. Για την δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος εντός του θαλάμου χρησιμοποιείται ξηρός αέρας που τροφοδοτείται από αεροσυμπιεστή με ρυθμιζόμενη ροή έως 250 mL/min, ενώ η θερμοκρασία του περιβλήματος

σταθεροποιείται με κυκλοφορητή νερού ώστε να αποφεύγεται η υπερθέρμανση. Η σταθερότητα των συνθηκών διασφαλίζεται από αισθητήρες υψηλής ακρίβειας.

Στο εσωτερικό του θαλάμου, τα δείγματα τοποθετούνται σε περιστρεφόμενο δίσκο (*sample changer - rotor*) με οκτώ θέσεις, γεγονός που επιτρέπει την ταυτόχρονη προετοιμασία πολλών δειγμάτων και την διαδοχική συλλογή δεδομένων υπό εναλλασσόμενες συνθήκες.



Εικόνα 6-2. Ο θάλαμος σχετικής υγρασίας και θερμοκρασίας MHC-trans, που είναι εγκατεστημένος στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro. Απεικονίζονται επίσης ο ρότορας που τοποθετείται στο εσωτερικό του θαλάμου κατά την διάρκεια μιας μέτρησης, καθώς και οι μονάδες ελέγχου θερμοκρασίας και υγρασίας.

Η διάταξη του θαλάμου επιτρέπει μετρήσεις σε γεωμετρία διάδοσης (*transmission geometry*), με την πηγή ακτίνων-X, το δείγμα και τον ανιχνευτή να είναι τοποθετημένοι σε ευθεία διάταξη. Στην πλευρά της προσπίπτουσας δέσμης τοποθετούνται οπτικά στοιχεία όπως κάτοπτρο εστίασης, σχισμή αντισκέδασης $1/4^\circ$, σχισμή soller 0.04 rad και σχισμή απόκλισης $1/4^\circ$, ενώ στην πλευρά της περιθλούσας δέσμης χρησιμοποιείται ο ψηφιακός ανιχνευτής PIXcel1D, εξοπλισμένος με σχισμή αντισκέδασης 7.5 mm και σχισμή soller 0.04 rad . Το γωνιακό εύρος συλλογής δεδομένων περιορίζεται σε 2θ από $\sim 1.2^\circ$ έως 30° , καθώς η παρουσία του beam-stop και η γεωμετρία του θαλάμου δεν επιτρέπουν την ανίχνευση σήματος περίθλασης σε μικρότερες γωνίες. Ολόκληρη η διάταξη φαίνεται στην **Εικόνα 6-2**.

6.1.3.2. Πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων για το σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης

Όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων, διεξάχθηκαν δύο σειρές πειραμάτων για το σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης. Η πρώτη σειρά *in situ* συλλογής δεδομένων XRPD υπό μεταβαλλόμενη σχετική υγρασία αποφασίστηκε να αποτελείται συνολικά από τέσσερις κύκλους διαδοχικών αφυδατώσεων και ενυδατώσεων του δείγματος. Οι πρώτοι τρεις κύκλοι ξεκινούσαν από rH 95% και έφθαναν σε κατώτερη τιμή rH 75%, ενώ τελικά ακολούθησε ο τέταρτος κύκλος, ο οποίος έφθανε μέχρι την κατώτερη τιμή rH 50%, ώστε να

διερευνηθεί αν η κρυσταλλικότητα του δείγματος διατηρείται ακόμη και σε τόσο χαμηλά επίπεδα υγρασίας. Σε όλους του κύκλους το βήμα αφυδάτωσης και ενυδάτωσης ήταν 5-10%, ενώ ο χρόνος αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο rH αποφασίστηκε να είναι 60 λεπτά της ώρας, ώστε να προλάβει να εξισορροπηθεί το δείγμα.

Η δεύτερη σειρά αποτελούταν από δύο κύκλους διαδοχικών αφυδατώσεων και ενυδατώσεων του δείγματος. Ο πρώτος κύκλος είχε ως αρχική τιμή rH το 95% και έφθανε μέχρι την κατώτερη τιμή rH 75% με βήμα 5% και χρόνο αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο υγρασίας 60 λεπτά της ώρας. Ο δεύτερος κύκλος αποφασίστηκε να φθάνει έως την τιμή rH 50% προκειμένου να επαναληφθεί ο τέταρτο κύκλος της πρώτης σειράς. Το βήμα αφυδάτωσης και ενυδάτωσης ήταν 10-15% και ο χρόνος αναμονής σε κάθε επίπεδο rH ήταν 60 λεπτά τα ώρας.

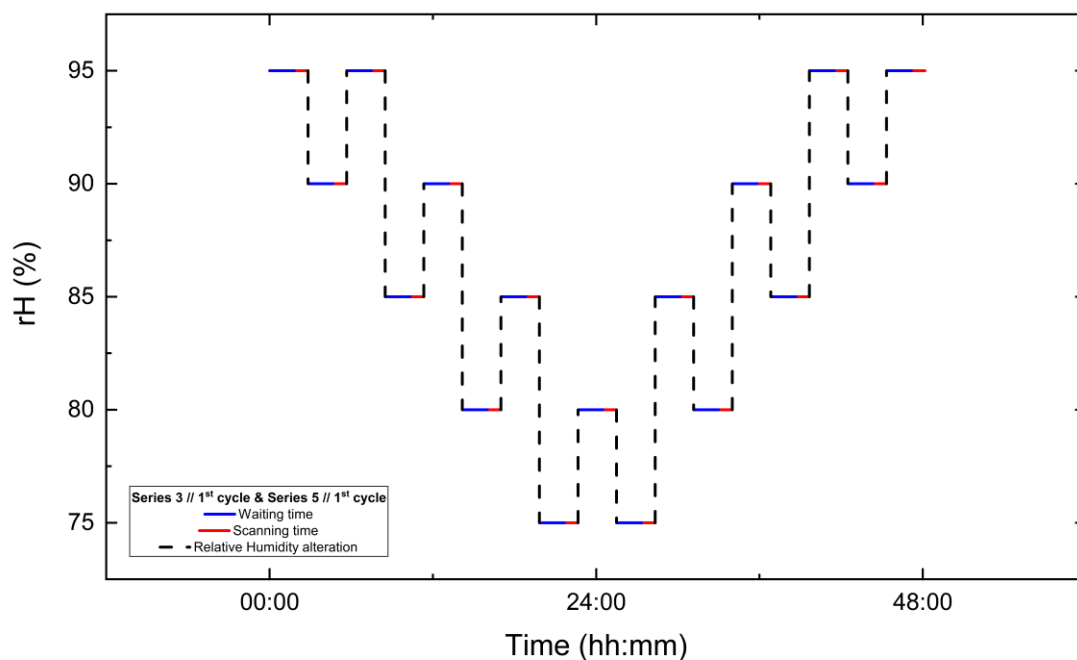
Ο αριθμός σαρώσεων για τους πρώτους τρεις κύκλους ήταν οκτώ σε κάθε επίπεδο υγρασίας, ενώ για τον τέταρτο κύκλο της πρώτης σειράς και τους κύκλους της δεύτερης σειράς αποφασίστηκε να είναι έξι. Όλες οι σαρώσεις είχαν διάρκεια 10 λεπτά της ώρας, και πραγματοποιήθηκαν σε εύρος 2θ 0°-30°. Τέλος, η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 21 °C. Οι συνθήκες συλλογής δεδομένων φαίνονται αναλυτικά στον **Πίνακα 6-5**.

Πίνακας 6-5. Το πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων για τις δύο σειρές πειραμάτων.

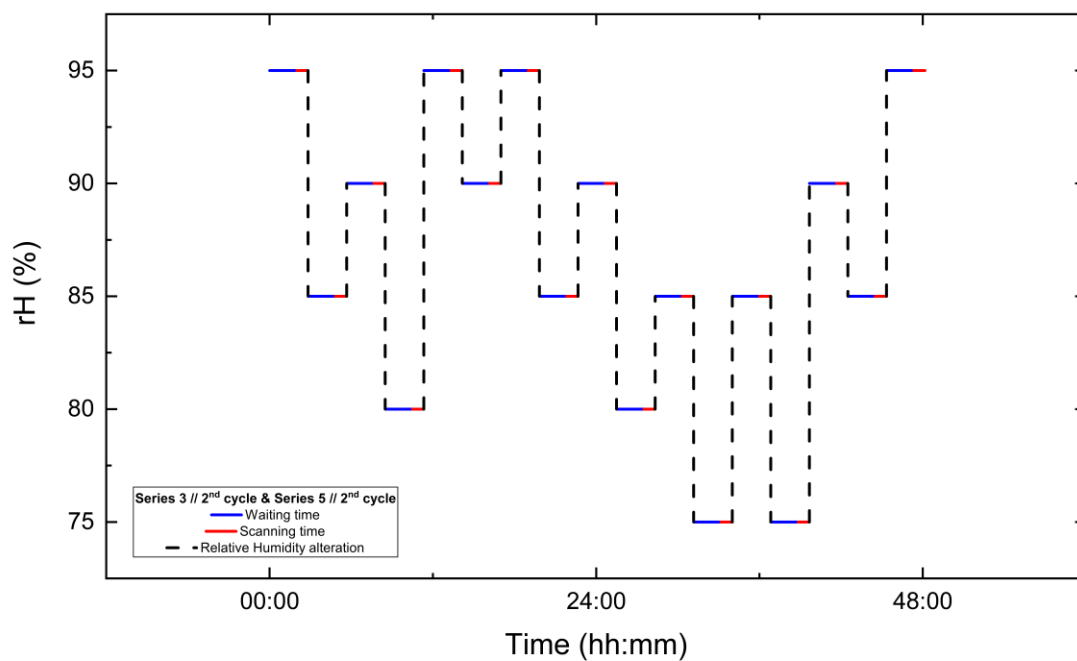
Σειρά	Κύκλος	Αρχικό επίπεδο rH (%)	Βήμα αφυδάτωσης (%)	Ελάχιστη rH (%)	Βήμα ενυδάτωσης (%)	Τελικό επίπεδο rH (%)	# επιπέδων rH	# σαρώσεων (10') ανά επίπεδο	Χρόνος αναμονής (')	Θερμοκρασία (°C)
1	1	95	5	75	5	95	9	8	60	21
	2	95	5	75	5	95	9	8	60	
	3	95	5	75	5	95	9	8	60	
	4	95	5, 10	50	5, 10	95	15	6	60	
2	1	95	5	75	5	95	9	6	60	
	2	95	10, 15	50	10, 15	95	9	6	60	

6.1.3.3. Πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων για την HEWL

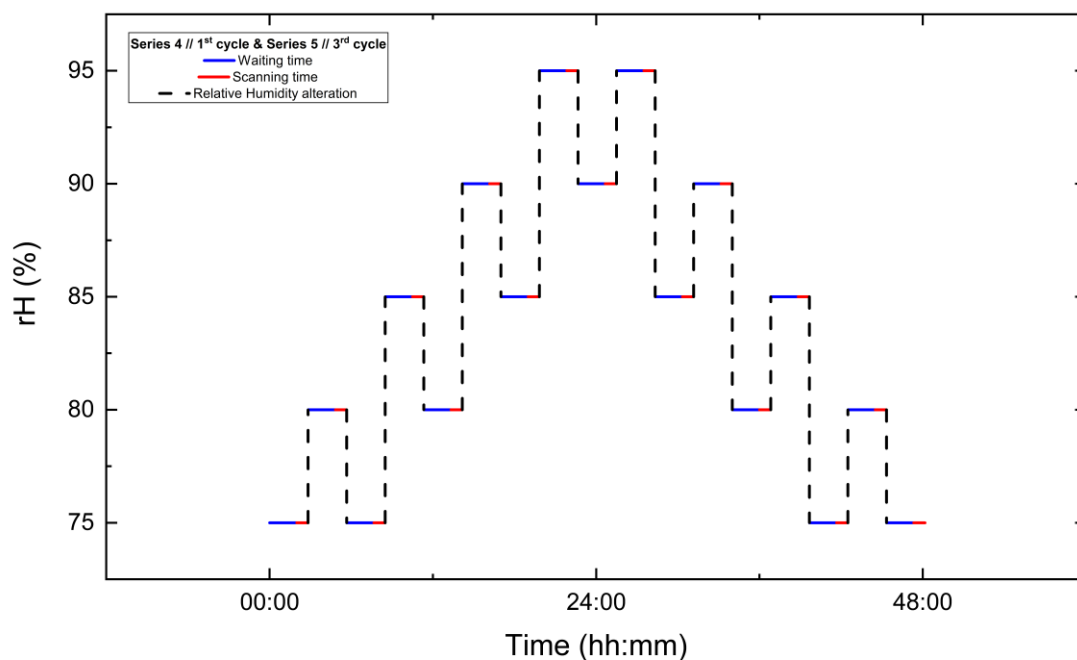
Όσον αφορά τα πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων για την περίπτωση της HEWL, αποφασίστηκε να μην ακολουθήσει την τυπική πορεία διαδοχικών αφυδατώσεων και ενυδατώσεων, αλλά κύκλοι διαδοχικών αυξομειώσεων, καθώς υπήρχαν ήδη κάποιες παρατηρήσεις συμπεριφοράς της λυσοζύμης σε κύκλους ομαλών μεταβολών (Trampari et al., 2018; Logotheti et al., 2019; Καφετζή, 2025). Για τον λόγο αυτόν αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν τρεις σειρές πειραμάτων συλλογής δεδομένων, οι σειρές 3, 4 και 5. Οι σειρές 3 και 4 αποτελούνταν από δύο κύκλους αυξομειώσεων η κάθε μία, οι οποίοι είχαν σαν ανώτερο επίπεδο rH το 95% και κατώτερο επίπεδο rH το 73%. Το 73% δεν επιλέχθηκε τυχαία, καθώς κάποια πρώτα πειράματα έδειξαν πως οι κρύσταλλοι τετραγωνικής λυσοζύμης διατηρούν την κρυσταλλικότητά τους μέχρι αυτό το επίπεδο rH. Η σειρά 5 αποτελούσε την επανάληψη των σειρών 3 και 4, ενώ εκτός από αυτούς τους τέσσερεις κύκλους αυξομειώσεων, η συλλογή δεδομένων περίθλασης συνεχίστηκε για ακόμη τρεις κύκλους ομαλών μεταβολών rH (Καφετζή, 2025). Όλοι οι κύκλοι αποτελούνταν από 17 επίπεδα rH. Το δείγμα είχε χρόνο αναμονής 120 λεπτά της ώρας σε κάθε επίπεδο rH. Ο αριθμός σαρώσεων σε κάθε επίπεδο ήταν πέντε, με κάθε σάρωση να έχει διάρκεια δέκα λεπτά και να συλλέγεται σε εύρος 2θ 0°-30°. Τέλος, η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 21 °C. Τα πρωτόκολλα συλλογής δεδομένων απεικονίζονται διαγραμματικά στις **Εικόνες 6-3, 6-4, 6-5 & 6-6**.



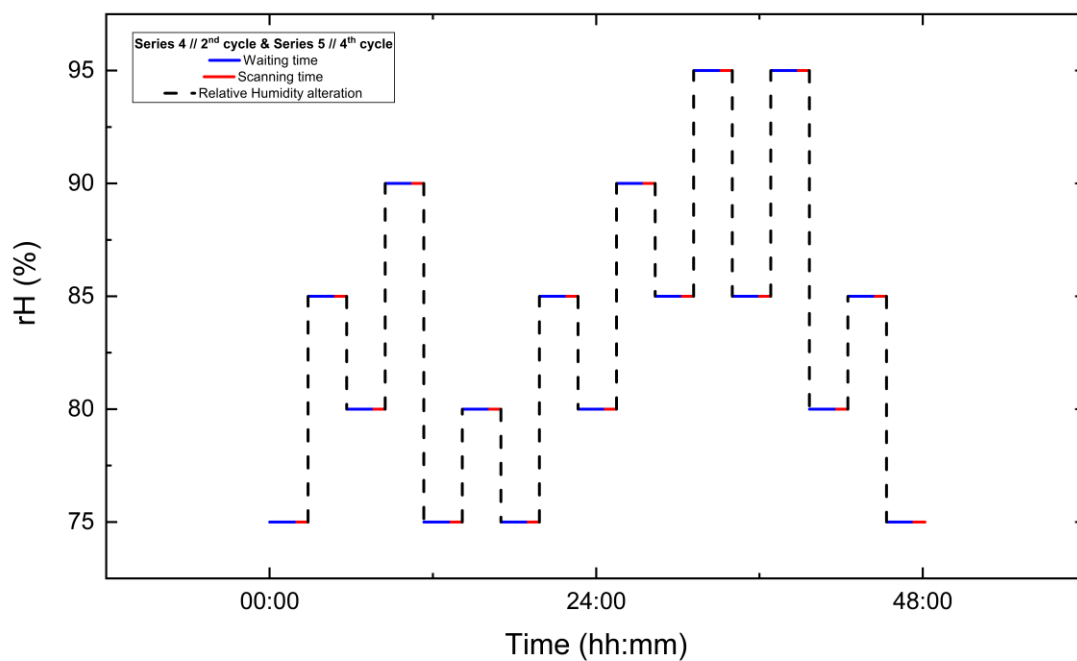
Εικόνα 6-3. Πειραματική πορεία της *in situ* συλλογής XRPD δεδομένων σε συνθήκες αυξομειώσεων της σχετικής υγρασίας, για τον 1^ο κύκλο της 3^{ης} σειράς, και της επανάληψης αυτού 1^{ου} κύκλου της 5^{ης} σειράς. Οι γραμμές με μπλε χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο rH, οι γραμμές με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο σαρώσεων και οι μαύρες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στην μεταβολή της σχετικής υγρασίας.



Εικόνα 6-4. Πειραματική πορεία της *in situ* συλλογής XRPD δεδομένων σε συνθήκες αυξομειώσεων της σχετικής υγρασίας, για τον 2^ο κύκλο της 3^{ης} σειράς, και της επανάληψης αυτού 2^{ου} κύκλου της 5^{ης} σειράς. Οι γραμμές με μπλε χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο rH, οι γραμμές με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο σαρώσεων και οι μαύρες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στην μεταβολή της σχετικής υγρασίας.



Εικόνα 6-5. Πειραματική πορεία της *in situ* συλλογής XRPD δεδομένων σε συνθήκες αυξομειώσεων της σχετικής υγρασίας, για τον 1^ο κύκλο της 4^{ης} σειράς, και της επανάληψης αυτού 3^{ου} κύκλου της 5^{ης} σειράς. Οι γραμμές με μπλε χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο rH, οι γραμμές με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο σαρώσεων και οι μαύρες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στην μεταβολή της σχετικής υγρασίας.



Εικόνα 6-6. Πειραματική πορεία της *in situ* συλλογής XRPD δεδομένων σε συνθήκες αυξομειώσεων της σχετικής υγρασίας, για τον 2^ο κύκλο της 4^{ης} σειράς, και της επανάληψης αυτού 4^{ου} κύκλου της 5^{ης} σειράς. Οι γραμμές με μπλε χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο αναμονής του δείγματος σε κάθε επίπεδο rH, οι γραμμές με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν στον χρόνο σαρώσεων και οι μαύρες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στην μεταβολή της σχετικής υγρασίας.

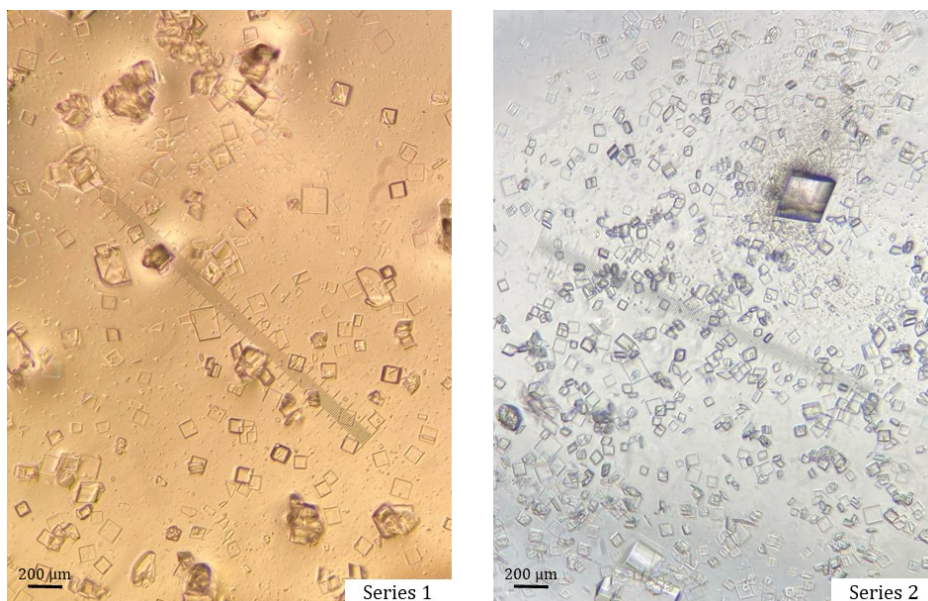
6.1.4. Επεξεργασία & Ανάλυση δεδομένων περίθλασης

Μετά την ολοκλήρωση της *in situ* συλλογής XRPD δεδομένων, η ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε μεμονωμένη για κάθε σάρωση, αλλά για κάθε επίπεδο pH συγκρίθηκαν όλα τα αντίστοιχα διαγράμματα περίθλασης που προέκυψαν από κάθε σάρωση με υπερθέσεις (*overplots*). Οι σαρώσεις που εμφάνιζαν πλήρη συμφωνία ως προς τις θέσεις των κορυφών Bragg συνδυάστηκαν, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ενιαίου μοτίβου περίθλασης με βελτιωμένα στατιστικά και υψηλότερο λόγο signal-to-noise. Η περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται αναλυτικά στο **Υποκεφάλαιο 5.1.4**.

6.2. Αποτελέσματα

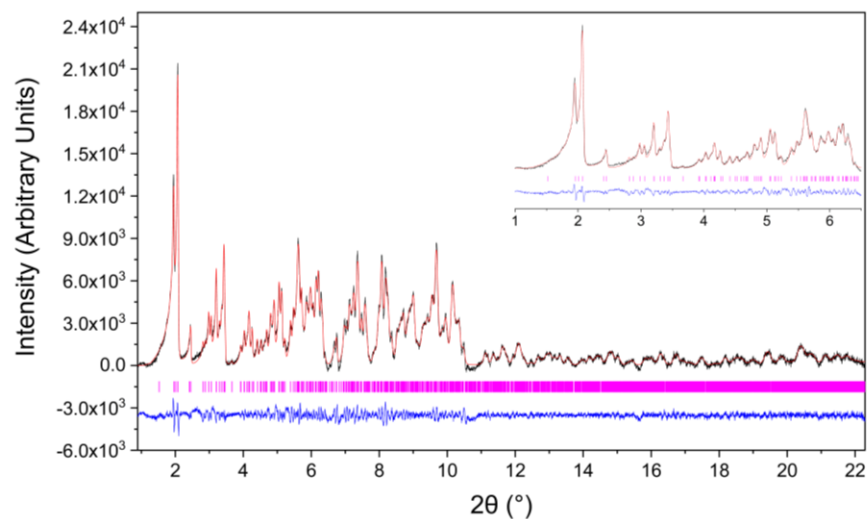
6.2.1. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στο σύμπλοκο ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης

Η παρατήρηση των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της 1^{ης} και της 2^{ης} σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης με τον προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη, επιβεβαίωσε την επιτυχία των πειραμάτων και την δημιουργία πολυκρυσταλλικού ιζήματος (**Εικόνα 6-7**). Επιπλέον, μετρήθηκαν οι τελικές τιμές pH για τα δείγματα των δύο σειρών και για την πρώτη σειρά η τελική τιμή ήταν pH=7.06, ενώ για την δεύτερη σειρά η τελική τιμή ήταν pH=7.17.

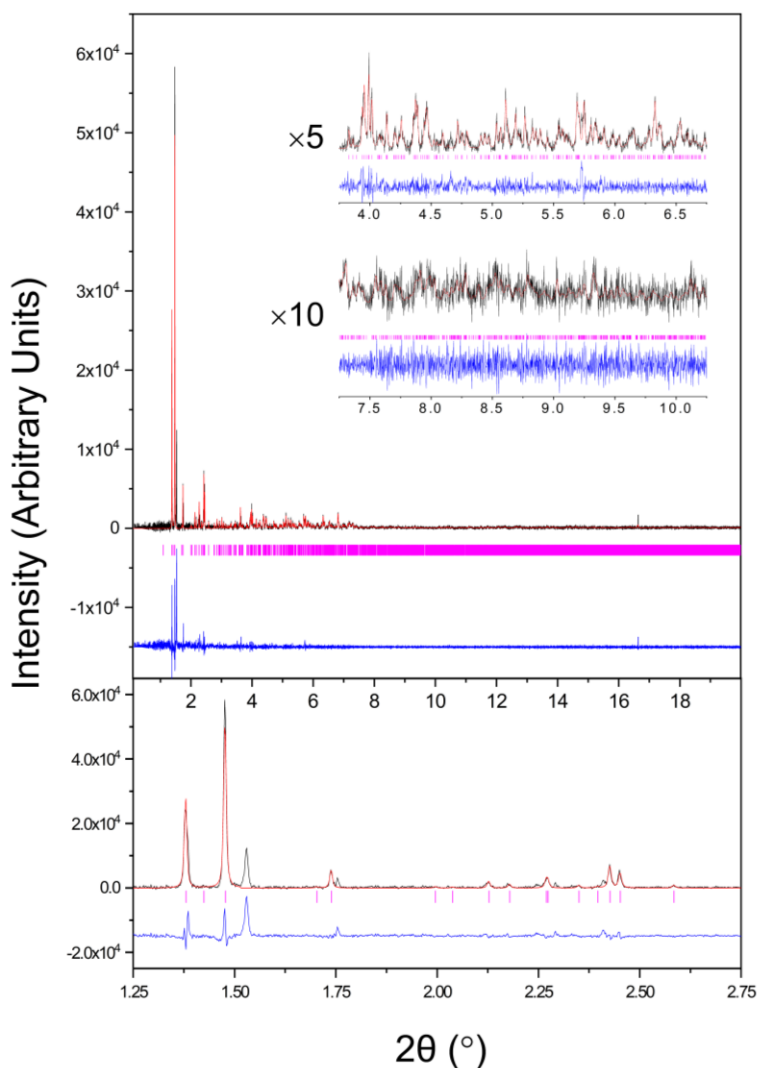


Εικόνα 6-7. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας των δειγμάτων συμπλόκου ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-χλωρορεσορσινόλης, σε pH κρυστάλλωσης 7.10. Η ομοιότητα των δειγμάτων της 1^{ης} σειράς (αριστερά) και της 2^{ης} σειράς (δεξιά) γίνεται αισθητή από την μορφολογία και το μέγεθος των κρυστάλλων.

Η μέτρηση σε capillary στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο έδειξε πως οι κρύσταλλοι ανήκουν στο κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\beta)$ μονοκλινούς συμμετρίας, με πλεγματικές σταθερές $a=61.384(1)$ Å, $b=61.931(1)$ Å, $c=47.8976(9)$ Å, $\beta=110.6297(3)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=8.2182\%$ και $\chi^2=1.37348$ (**Εικόνα 6-8**). Την μέτρηση αυτή επαλήθευσε ακόμη μια στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF (Ιούλιος 2025), όπου και πάλι ταυτοποιήθηκε το κρυσταλλικό πολύμορφο $P2_1(\beta)$ με πλεγματικές σταθερές $a=60.622(5)$ Å, $b=61.917(3)$ Å, $c=47.858(3)$ Å, $\beta=110.696(2)^\circ$, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=8.4750\%$ και $\chi^2=1.79053$ (**Εικόνα 6-9**).



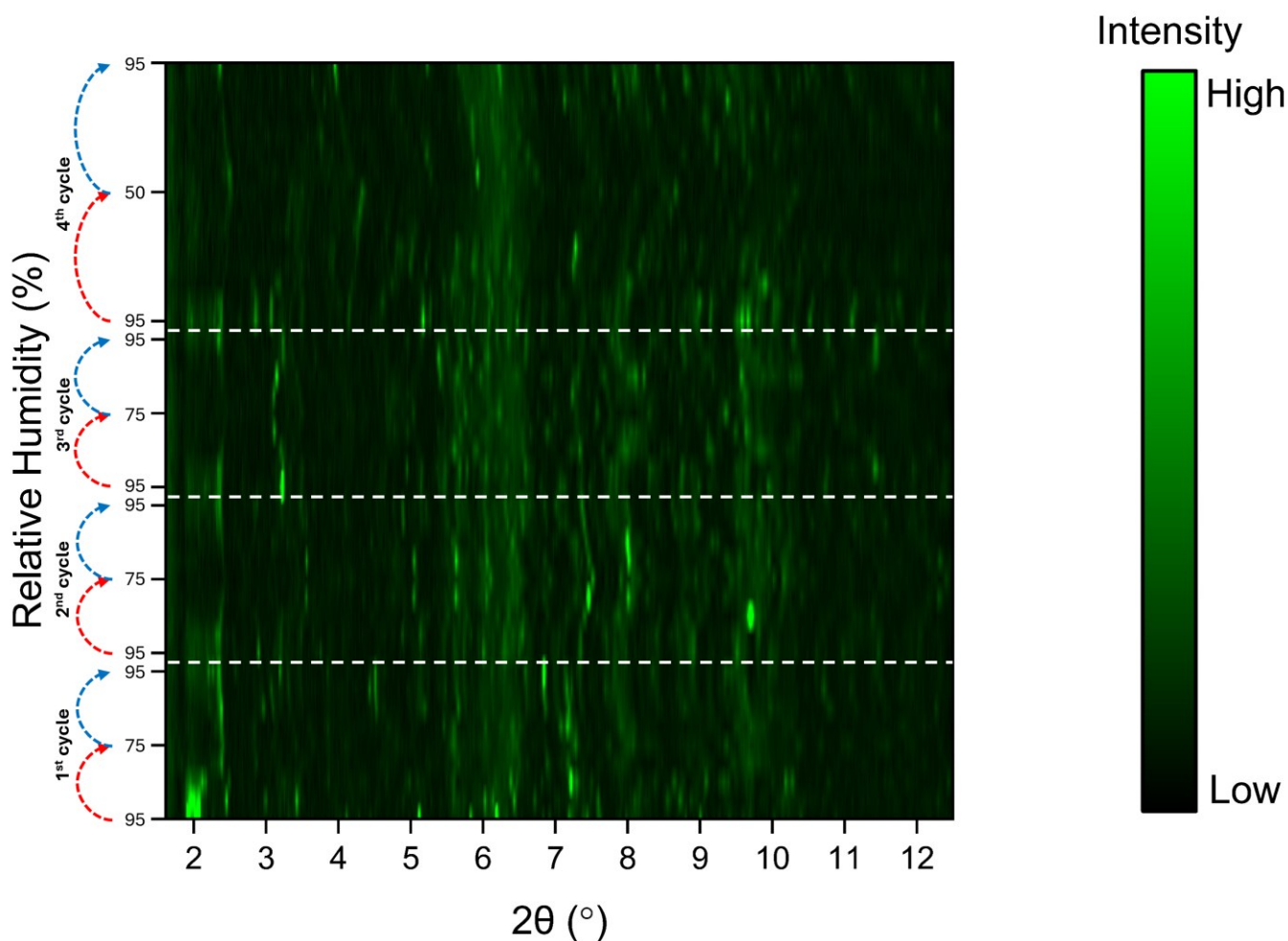
Εικόνα 6-8. Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη. Τα δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι φούξια κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P21(\beta)$.



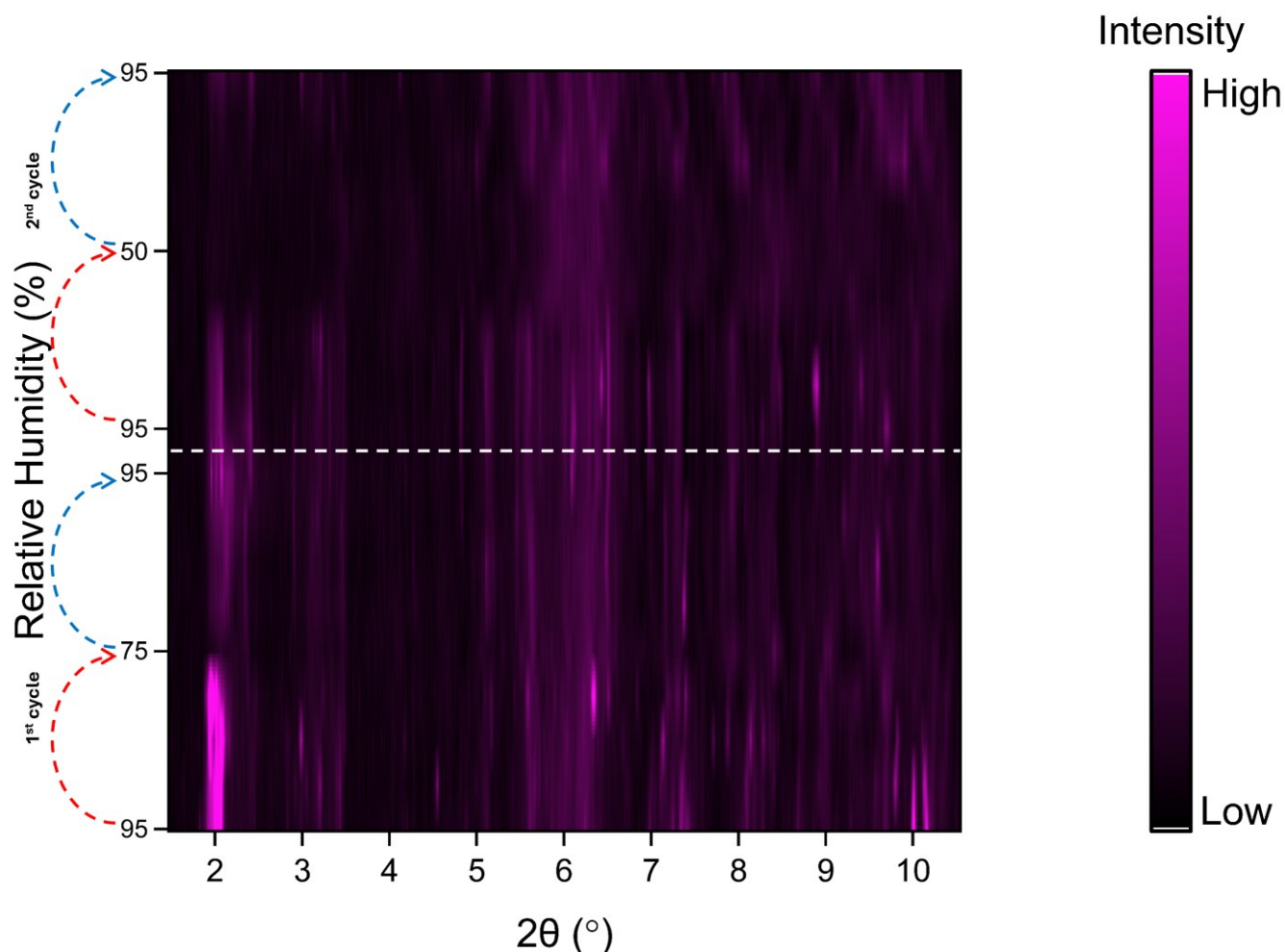
Εικόνα 6-9. (Άνω) Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD ανθρώπινης ινσουλίνης συγκρυσταλλωμένης με τον προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη σε pH=7.10. Τα δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν στον πειραματικό σταθμό ID22 στο ESRF. Η μαύρη

και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι φούξια κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για την κρυσταλλική φάση $P2_{1(\beta)}$. Οι κορυφές περίθλασης έχουν πολλαπλασιαστεί τμηματικά $\times 5$ και $\times 10$ (ένθετα) ώστε να αναδειχθεί η ποιότητα της ανάλυσης. (Κάτω) Εστίαση του μοτίβου σε χαμηλό εύρος γωνίας 2θ ώστε να αναδειχθεί η υψηλή γωνιακή ευκρίνεια σε εκείνες τις γωνίες.

Στις **Εικόνες 6-10 & 6-11** όπου παρατίθενται τα surface plots που δημιουργήθηκαν για τα δεδομένα περίθλασης των δύο σειρών, παρατηρούνται μετατοπίσεις κορυφών (*peak shifts*) με τις μεταβολές της rH, γεγονός το οποίο δικαιολογεί τις αλλαγές που υφίσταται το κρυσταλλικό πλέγμα. Το μοτίβο περίθλασης παραμένει το ίδιο, οπότε δεν παρατηρείται μετάβαση φάσης και διατηρείται η $P2_{1(\beta)}$ σε όλη την διάρκεια μετρήσεων των δύο σειρών. Το σήμα περίθλασης φαίνεται να φθίνει κατά την μείωση της rH, ειδικά στα χαμηλά επίπεδα rH του δεύτερου κύκλου της 2^{ης} σειράς, και αυτό γίνεται αντιληπτό από την μείωση των εντάσεων των κορυφών, ενώ φαίνεται να επανέρχεται κατά την ενυδάτωση του δείγματος. Παρά τις μεταβολές αυτές τα δείγματα διατήρησαν την κρυσταλλικότητά τους κατά την διάρκεια και των δύο σειρών πειραμάτων.



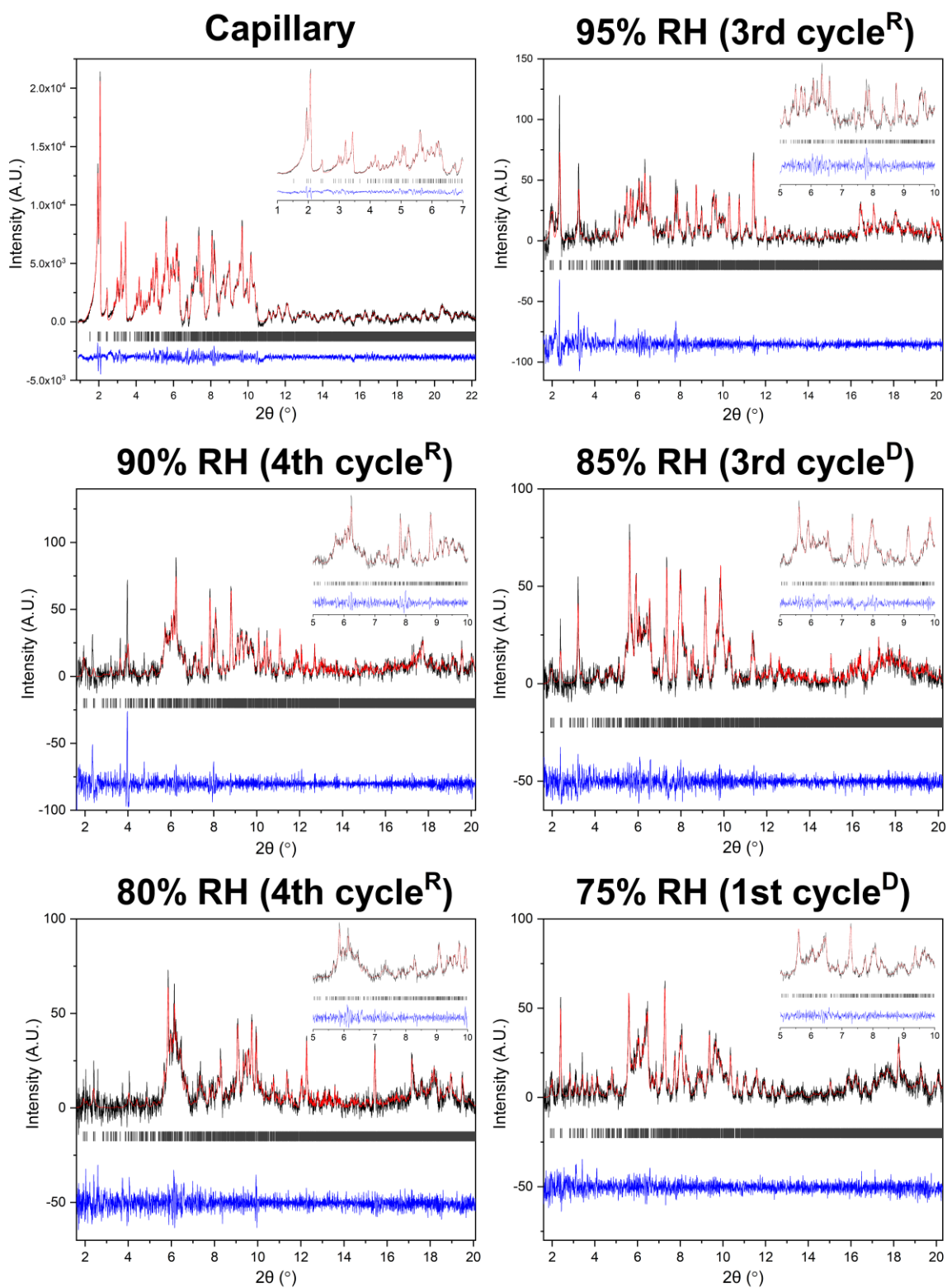
Εικόνα 6-10. Διάγραμμα επιφανείας για την πρώτη σειρά πειραμάτων *in situ* συλλογής δεδομένων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη rH. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση των επιπέδων rH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης.



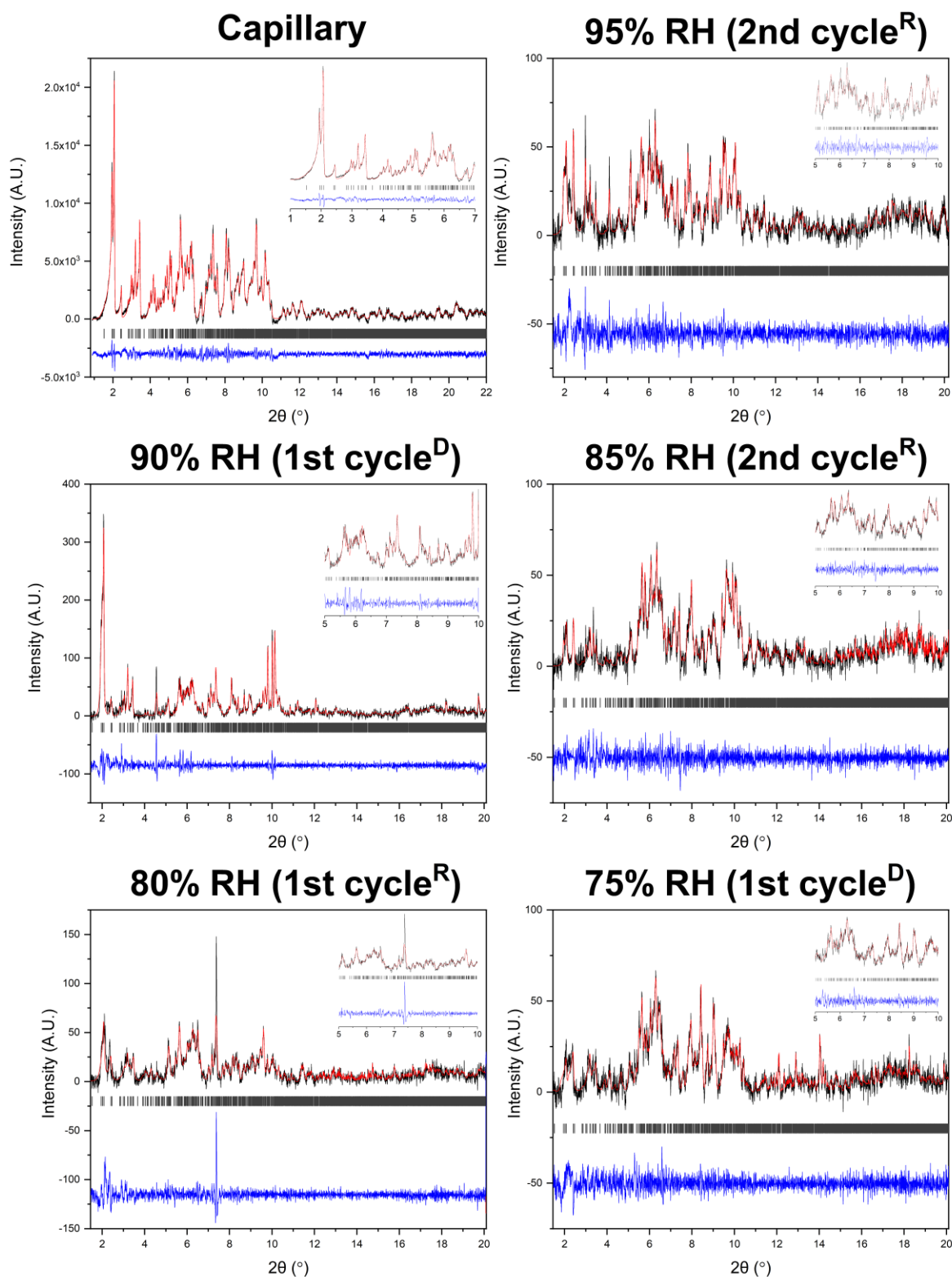
Εικόνα 6-11. Διάγραμμα επιφανείας για την δεύτερη σειρά πειραμάτων *in situ* συλλογής δεδομένων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη rH. Το διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση των επιπέδων rH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης.

Η ανάλυση κατά Pawley όλων των δεδομένων XRPD επιβεβαίωσε επίσης την παρουσία του $P2_1(\beta)$ κρυσταλλικού πολυμόρφου καθώς και την διατήρησή του καθόλη την πορεία των δύο πειραματικών διαδικασιών. Στην **Εικόνα 6-12** παρουσιάζονται επιλεγμένα Pawley fits σε διάφορα επίπεδα rH για την πρώτη σειρά, ενώ στην **Εικόνα 6-13** παρουσιάζονται επιλεγμένα Pawley fits σε διάφορα επίπεδα rH για την δεύτερη σειρά.

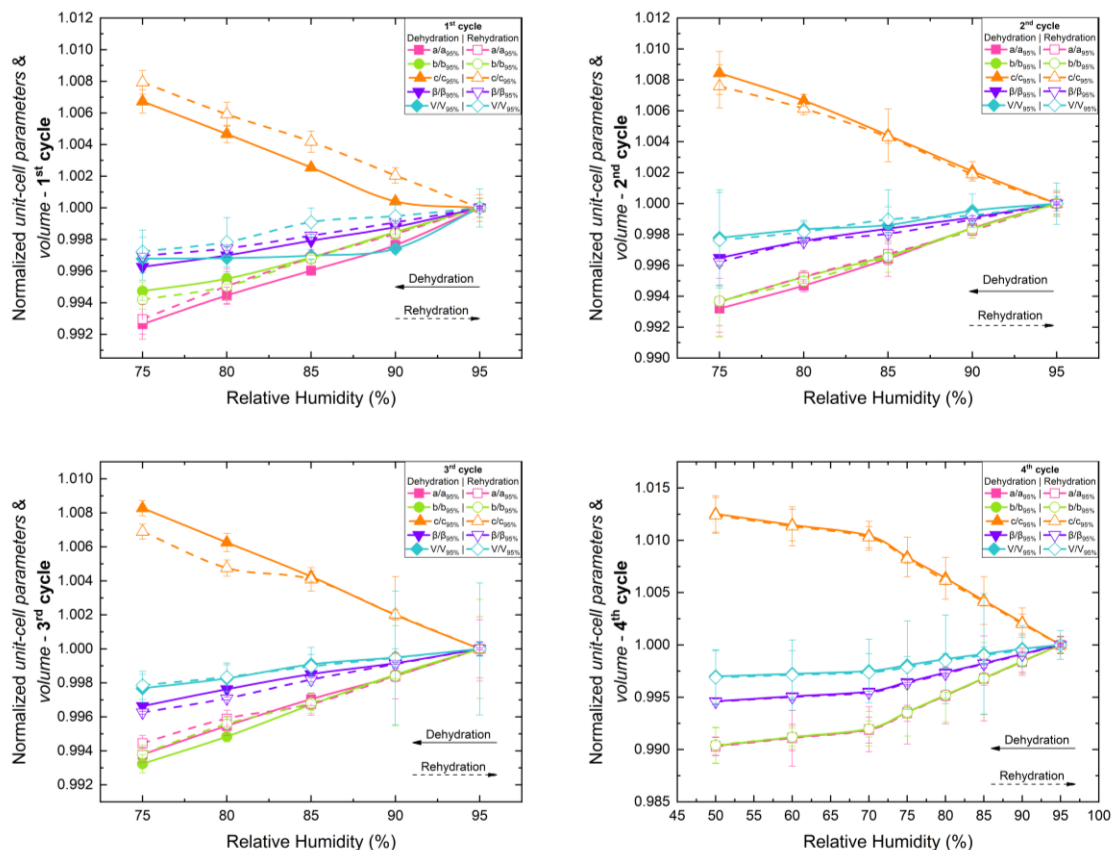
Από την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης, διαπιστώθηκε πως όντως η rH επηρεάζει τις πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στις **Εικόνες 6-14 & 6-15**, κατά την μείωση της rH παρατηρήθηκε μείωση του άξονα a , του άξονα b , της γωνίας β και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, ενώ ο άξονας c αυξήθηκε. Κατά την ενυδάτωση παρατηρήθηκαν οι αντίθετες μεταβολές. Η ανισοτροπική μεταβολή του άξονα c σε σχέση με τις υπόλοιπες πλεγματικές σταθερές επιβεβαιώνει και τις ανισοτροπικές μετατοπίσεις κορυφών που παρατηρήθηκαν στα διαγράμματα επιφανείας.



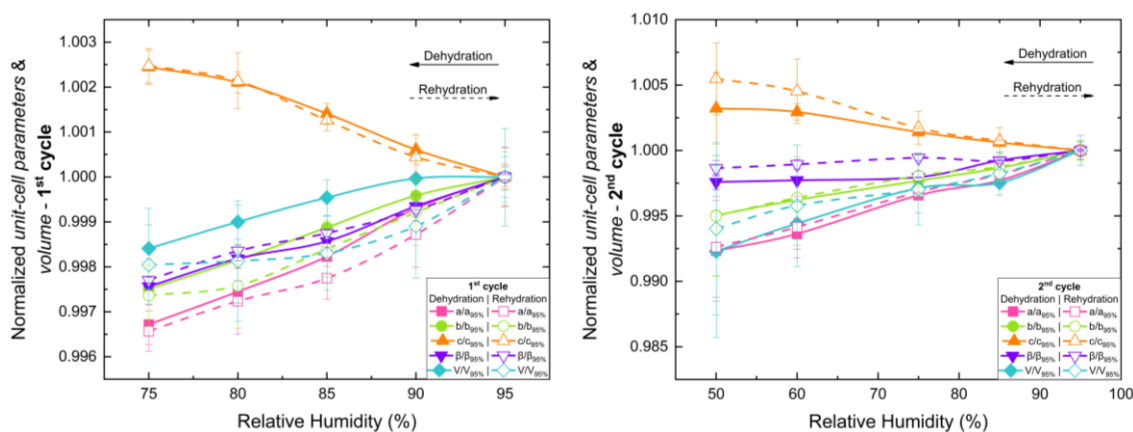
Εικόνα 6-12. Διαγράμματα αναλύσεων κατά Pawley για ενδεικτικά επίπεδα rH των τεσσάρων κύκλων της πρώτης σειράς. Η μαύρη, η κόκκινη και η μπλε καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα, το θεωρητικό προφίλ και την διαφορά μεταξύ τους αντίστοιχα. Οι γκρι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στις προβλεπόμενες ανακλάσεις Bragg για την φάση $P2_1(\beta)$.



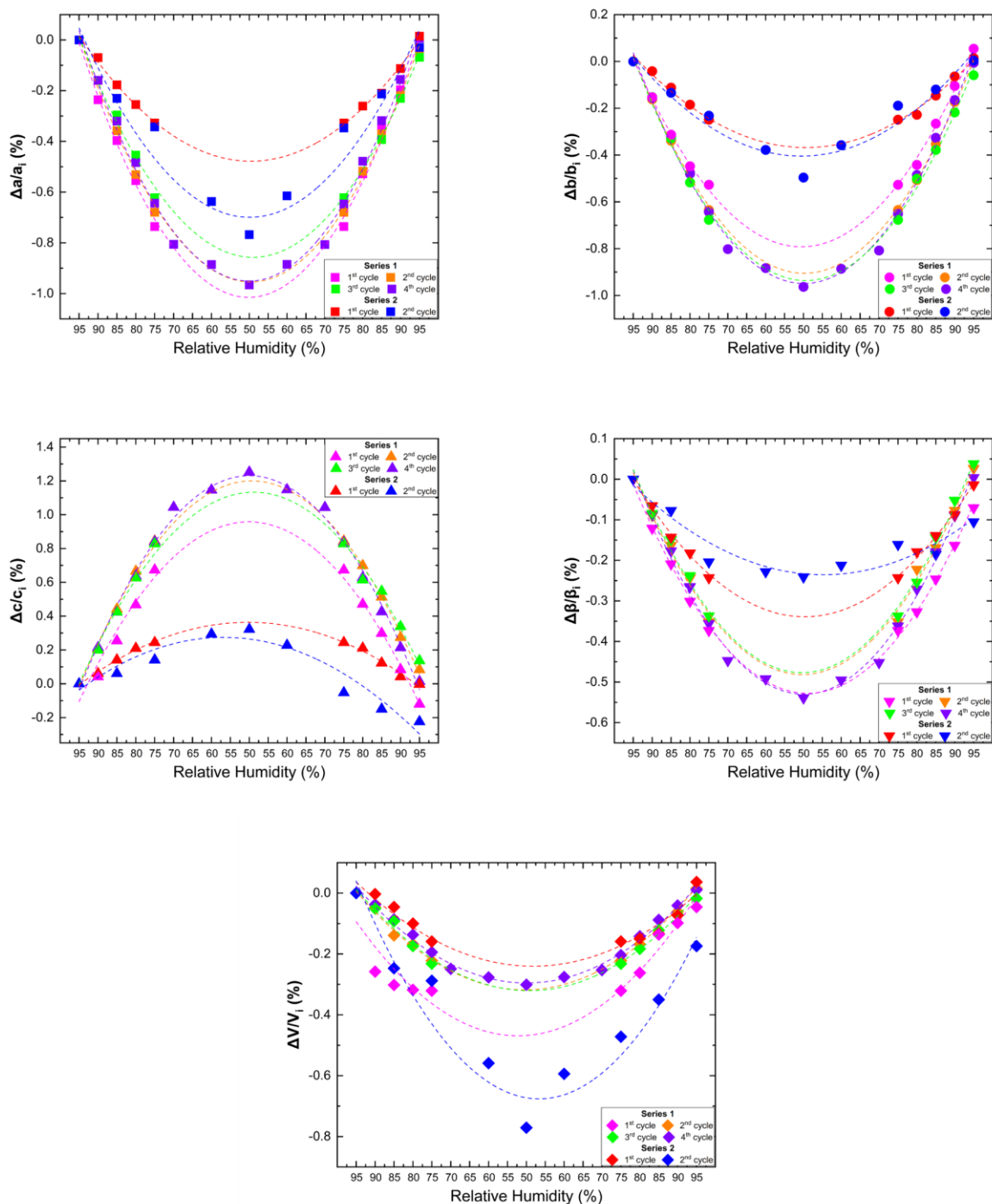
Εικόνα 6-13. Διαγράμματα από αναλύσεις Pawley για ενδεικτικά επίπεδα gH των δύο κύκλων της δεύτερης σειράς. Η μαύρη, η κόκκινη και η μπλε καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα, το θεωρητικό προφίλ και την διαφορά μεταξύ τους αντίστοιχα. Οι γκρι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στις προβλεπόμενες ανακλάσεις Bragg για την φάση $P2_{1(\beta)}$.



Εικόνα 6-14. Διαγράμματα των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, των κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης της πρώτης σειράς. Σε όλα τα διαγράμματα οι τιμές της αφυδάτωσης απεικονίζονται με γεμάτο σύμβολο και ενιαία γραμμή, ενώ οι τιμές της ενυδάτωσης απεικονίζονται με ανοιχτό σύμβολο και διακεκομμένη γραμμή. Η κανονικοποίηση των τιμών των πλεγματικών σταθερών που αντιστοιχούν σε αφυδάτωση πραγματοποιήθηκε ως προς τις τιμές που κατείχαν οι πλεγματικές σταθερές κατά την έναρξη κάθε κύκλου σε rH 95%, ενώ η κανονικοποίηση των τιμών των πλεγματικών σταθερών που αντιστοιχούν σε ενυδάτωση πραγματοποιήθηκε ως προς τις τιμές που κατείχαν οι πλεγματικές σταθερές κατά την rH 95% της ενυδάτωσης.



Εικόνα 6-15. Διαγράμματα των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, των κύκλων αφυδάτωσης και ενυδάτωσης της δεύτερης σειράς. Σε όλα τα διαγράμματα οι τιμές της αφυδάτωσης απεικονίζονται με γεμάτο σύμβολο και ενιαία γραμμή, ενώ οι τιμές της ενυδάτωσης απεικονίζονται με ανοιχτό σύμβολο και διακεκομμένη γραμμή. Η κανονικοποίηση των τιμών των πλεγματικών σταθερών που αντιστοιχούν σε αφυδάτωση πραγματοποιήθηκε ως προς τις τιμές που κατείχαν οι πλεγματικές σταθερές κατά την έναρξη κάθε κύκλου σε rH 95%, ενώ η κανονικοποίηση των τιμών των πλεγματικών σταθερών που αντιστοιχούν σε ενυδάτωση πραγματοποιήθηκε ως προς τις τιμές που κατείχαν οι πλεγματικές σταθερές κατά την rH 95% της ενυδάτωσης.



Εικόνα 6-16. Διαγράμματα των ποσοστιαίων μεταβολών $[(\Delta x/x_i) \times 100\%]$ των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας για τους κύκλους αφυδατώσεων και ενυδατώσεων και των δύο σειρών. Οι διακεκομμένες γραμμές είναι οπτικοί οδηγό για την πορεία των ποσοστιαίων μεταβολών.

Οι μεγαλύτερες ποσοστιαίες μεταβολές για όλες τις πλεγματικές σταθερές παρατηρήθηκαν στην αφυδάτωση του δείγματος κατά τον τέταρτο κύκλο της πρώτης σειράς. Πιο συγκεκριμένα, ο άξονας a μειώθηκε κατά 0.966%, ο άξονας b μειώθηκε κατά 0.963%, ο άξονας c αυξήθηκε κατά 1.252% και η γωνία β μειώθηκε κατά 0.539%. Αντιθέτως ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας υπέστη την μεγαλύτερη μεταβολή κατά την αφυδάτωση του δείγματος της δεύτερης σειράς στο 50% rH, το οποίο ήταν το χαμηλότερο επίπεδο του 2^{ου} κύκλου. Συγκεκριμένα, μειώθηκε κατά 0.771% (Πίνακας 6-6).

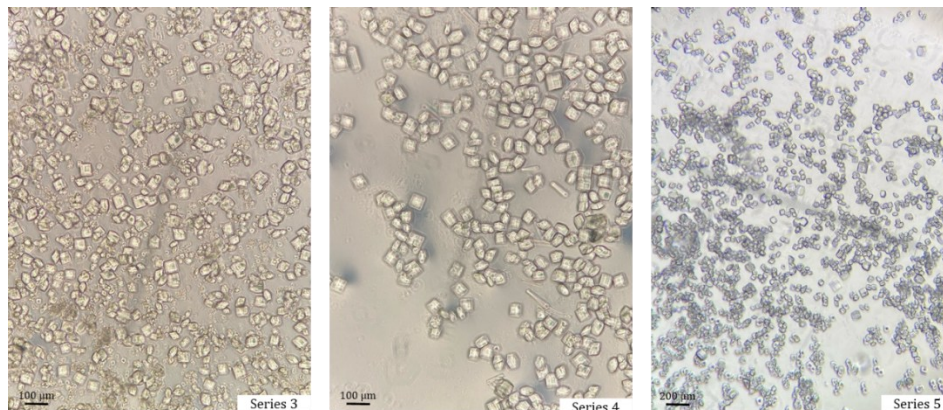
Κατά τη σταδιακή επανενυδάτωση των δειγμάτων στο αρχικό επίπεδο σχετικής υγρασίας, οι πλεγματικές σταθερές είχαν την τάση να επανέλθουν στις αρχικές τιμές τους. Στην πρώτη σειρά, ο άξονας a και η γωνία β υστέρησαν καθώς δεν επανήλθαν ποτέ τις αρχικές τιμές τους, ο άξονας b έφθασε και πάλι την αρχική τιμή του, ενώ ο άξονας c ξεπέρασε την αρχική τιμή, επηρεάζοντας και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας στον οποίο παρατηρήθηκε απειροελάχιστη αύξηση. Στην δεύτερη σειρά δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στις πλεγματικές σταθερές μετά το πέρας των δύο κύκλων (Εικόνα 6-16).

Πίνακας 6-6. Οι επί τοις εκατό μεταβολές των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας, κατά την αφυδάτωση όλων των κύκλων μεταβολής της rH.

Series	Cycle	$\Delta a/a_i$	$\Delta b/b_i$	$\Delta c/c_i$	$\Delta \beta/\beta_i$	$\Delta V/V_i$
1	1 (95% → 75%)	-0.736%	-0.527%	0.673%	-0.373%	-0.321%
	2 (95% → 75%)	-0.680%	-0.635%	0.844%	-0.352%	-0.222%
	3 (95% → 75%)	-0.622%	-0.677%	0.828%	-0.337%	-0.232%
	4 (95% → 50%)	-0.966%	-0.963%	1.252%	-0.539%	-0.301%
2	1 (95% → 75%)	-0.328%	-0.249%	0.244%	-0.243%	-0.159%
	2 (95% → 50%)	-0.768%	-0.496%	0.322%	-0.241%	-0.771%

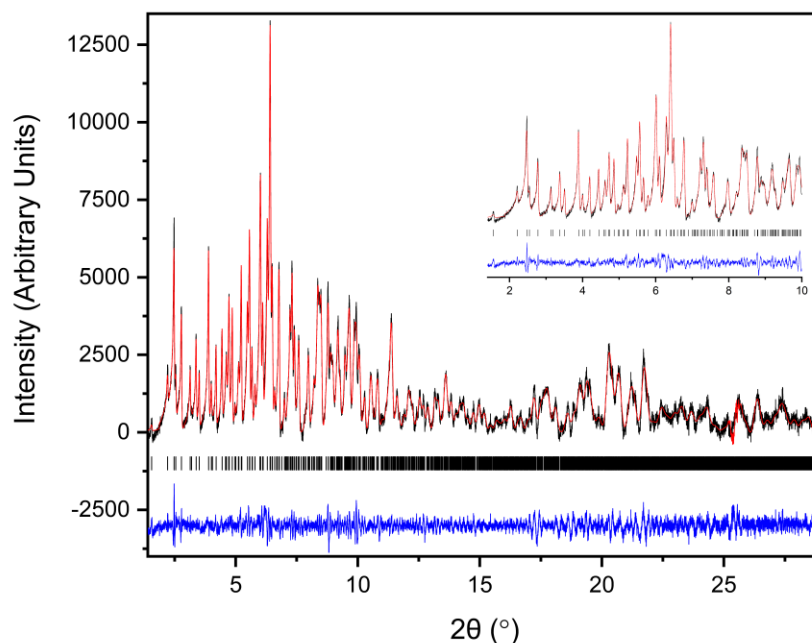
6.2.2. Επίδραση της σχετικής υγρασίας στην HEWL

Η παρατήρηση των πολυκρυσταλλικών δειγμάτων της 3^{ης}, 4^{ης} και 5^{ης} σειράς κρυστάλλωσης της HEWL, επιβεβαίωσε την επιτυχία των πειραμάτων και την δημιουργία πολυκρυσταλλικού ιζήματος (Εικόνα 6-17).



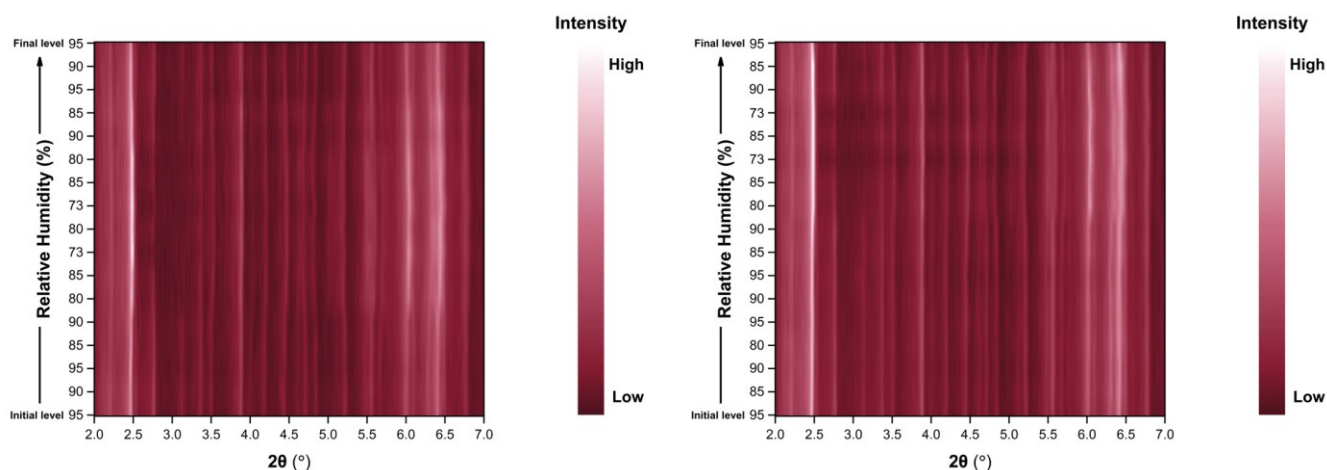
Εικόνα 6-17. Εικόνες οπτικής μικροσκοπίας των πολυκρυσταλλικών ιζημάτων HEWL. Η ομοιότητα των δειγμάτων της 3^{ης} σειράς (αριστερά), της 4^{ης} σειράς (μέση) και της 5^{ης} σειράς (δεξιά) γίνεται αισθητή από την μορφολογία και το μέγεθος των κρυστάλλων.

Η μέτρηση σε capillary έδειξε πως οι κρύσταλλοι ανήκουν στο space group $P4_32_12$ τετραγωνικής συμμετρίας, με πλεγματικές σταθερές $a=b=79.105(4)$ Å, $c=38.231(2)$ Å, με δείκτες αξιοπιστίας $R_{wp}=1.3749\%$ και $\chi^2=1.98421$ (Εικόνα 6-18).

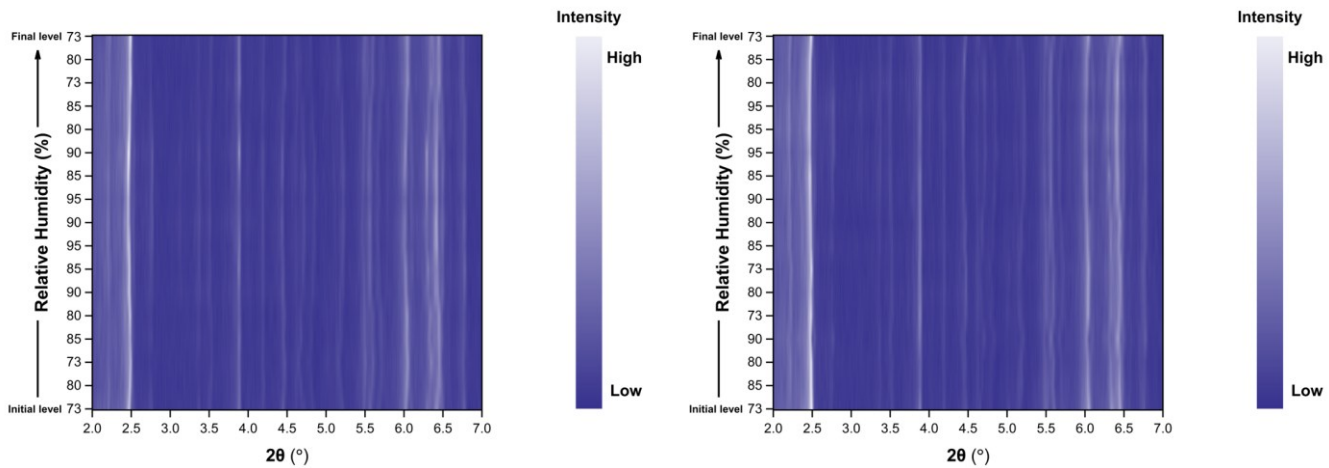


Εικόνα 6-18. Ανάλυση κατά Pawley των δεδομένων XRPD της HEWL. Η μαύρη και η κόκκινη καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα και το θεωρητικό μοντέλο αντίστοιχα, ενώ η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει την μεταξύ τους διαφορά. Οι μαύρες κατακόρυφες γραμμές δείχνουν τις ανακλάσεις Bragg που αναμένονται για το πολύμορφο στο space group $P4_32_12$.

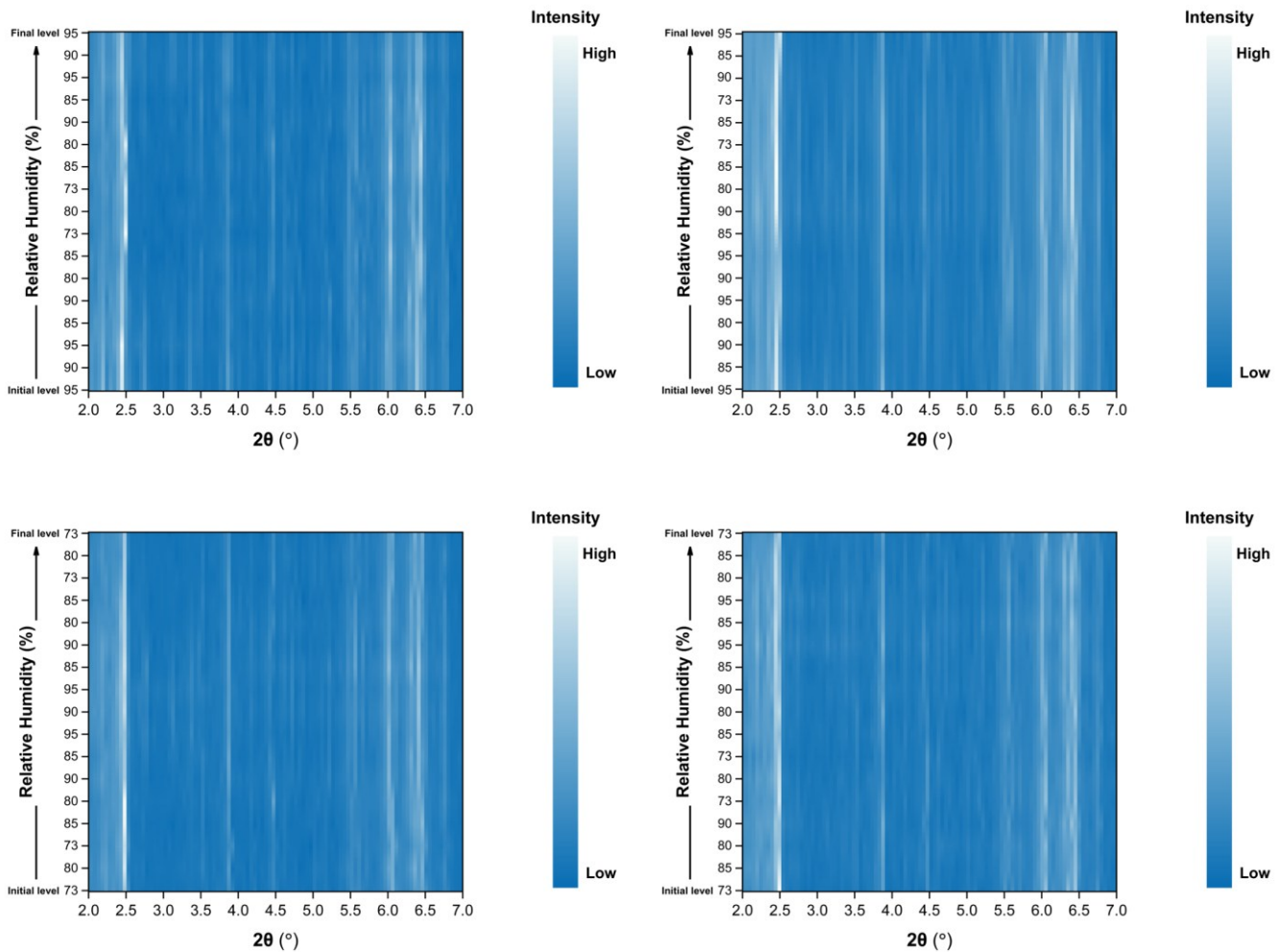
Στις **Εικόνες 6-19, 6-20 & 6-21**, όπου παρατίθενται τα surface plots που δημιουργήθηκαν για τα δεδομένα περίθλασης των τριών σειρών, παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις κορυφών με τις αυξομειώσεις της rH. Το μοτίβο περίθλασης παραμένει το ίδιο, οπότε δεν παρατηρείται μετάβαση φάσης και διατηρείται η $P4_32_12$ σε όλη την διάρκεια μετρήσεων των τριών σειρών. Δεν παρατηρείται μείωση του σήματος περίθλασης και τα δείγματα διατήρησαν την κρυσταλλικότητά τους κατά την διάρκεια και των τριών σειρών πειραμάτων.



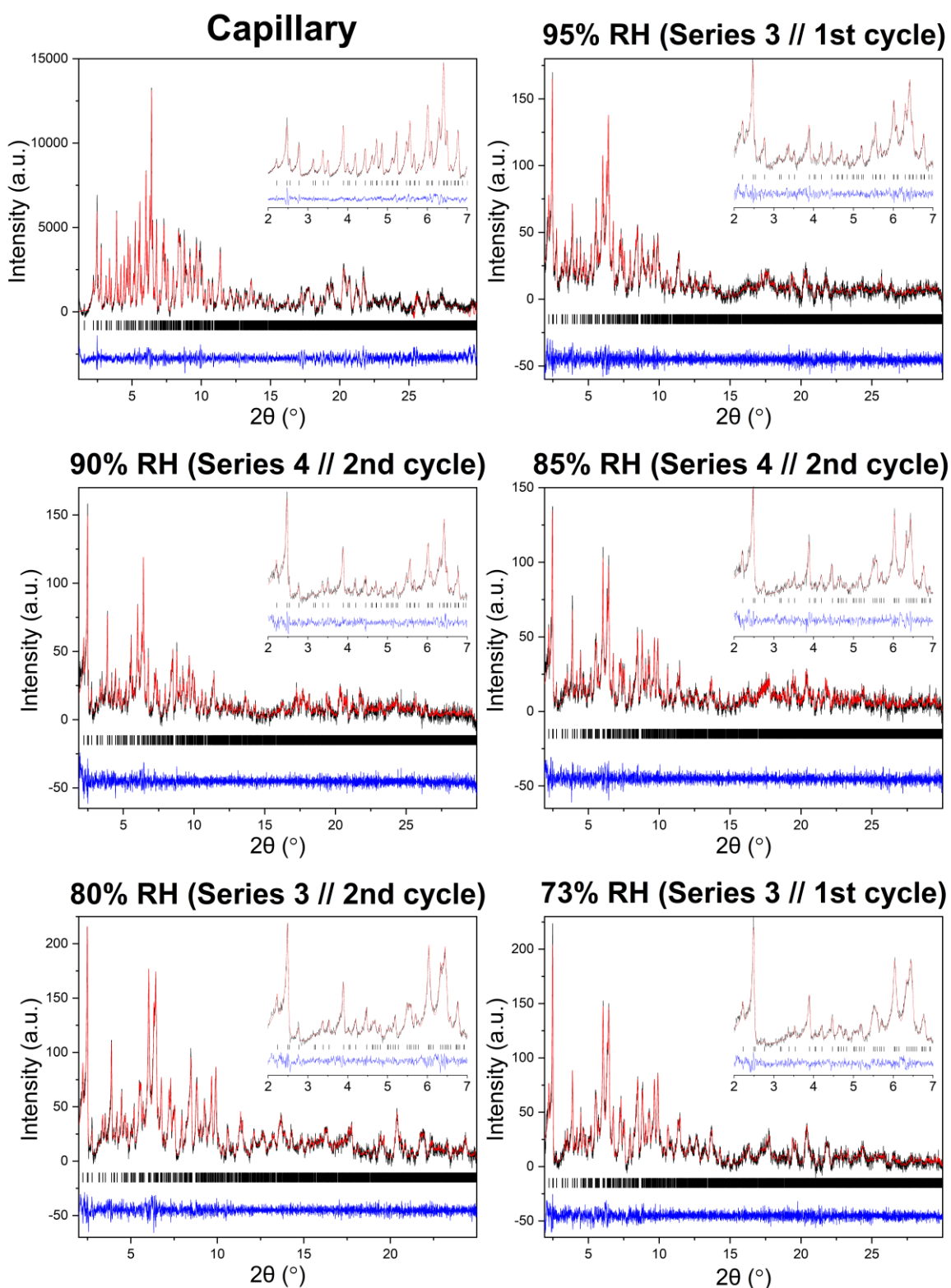
Εικόνα 6-19. Διαγράμματα επιφανείας για την τρίτη σειρά πειραμάτων *in situ* συλλογής δεδομένων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη rH (**αριστερά:** πρώτος κύκλος, **δεξιά:** δεύτερος κύκλος). Κάθε διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση των επιπέδων rH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης.



Εικόνα 6-20. Διαγράμματα επιφανείας για την τέταρτη σειρά πειραμάτων *in situ* συλλογής δεδομένων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη rH (αριστερά: πρώτος κύκλος, δεξιά: δεύτερος κύκλος). Κάθε διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση των επιπέδων rH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης.



Εικόνα 6-21. Διαγράμματα επιφανείας για την πέμπτη σειρά πειραμάτων *in situ* συλλογής δεδομένων περίθλασης υπό μεταβαλλόμενη rH (άνω αριστερά: πρώτος κύκλος, άνω δεξιά: δεύτερος κύκλος, κάτω αριστερά: τρίτος κύκλος, κάτω δεξιά: τέταρτος κύκλος). Κάθε διάγραμμα απεικονίζει την συνάρτηση των επιπέδων rH, της γωνίας περίθλασης 2θ και της έντασης.

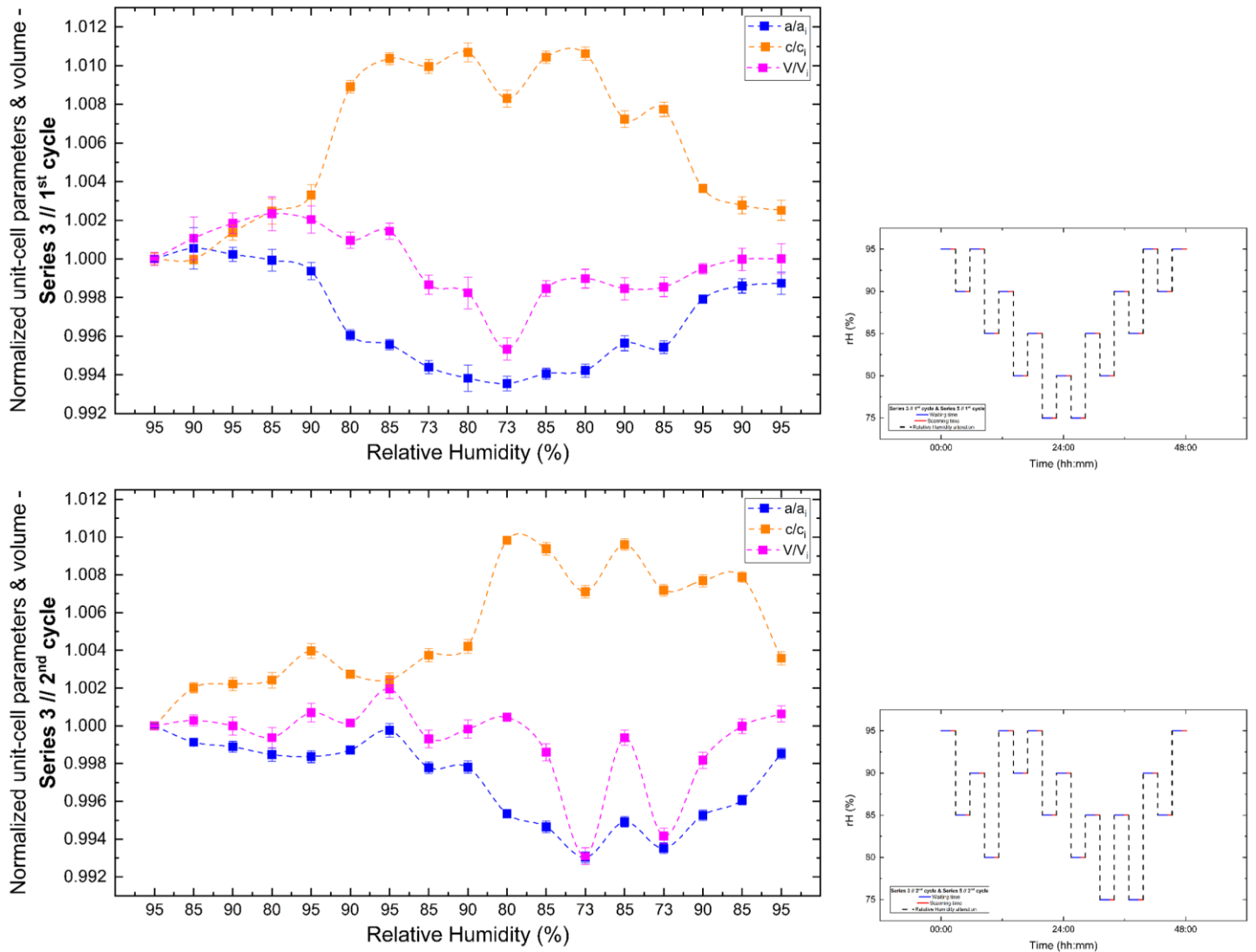


Εικόνα 6-22. Διαγράμματα αναλύσεων κατά Pawley για ενδεικτικά επίπεδα rH των τριών σειρών. Η μαύρη, η κόκκινη και η μπλε καμπύλη αναπαριστούν τα πειραματικά δεδομένα, το θεωρητικό προφίλ και την διαφορά μεταξύ τους αντίστοιχα. Οι μαύρες κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στις προβλεπόμενες ανακλάσεις Bragg για την φάση $P4_3212$.

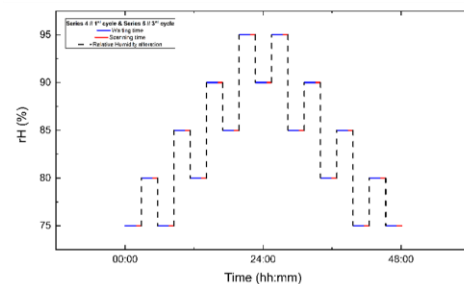
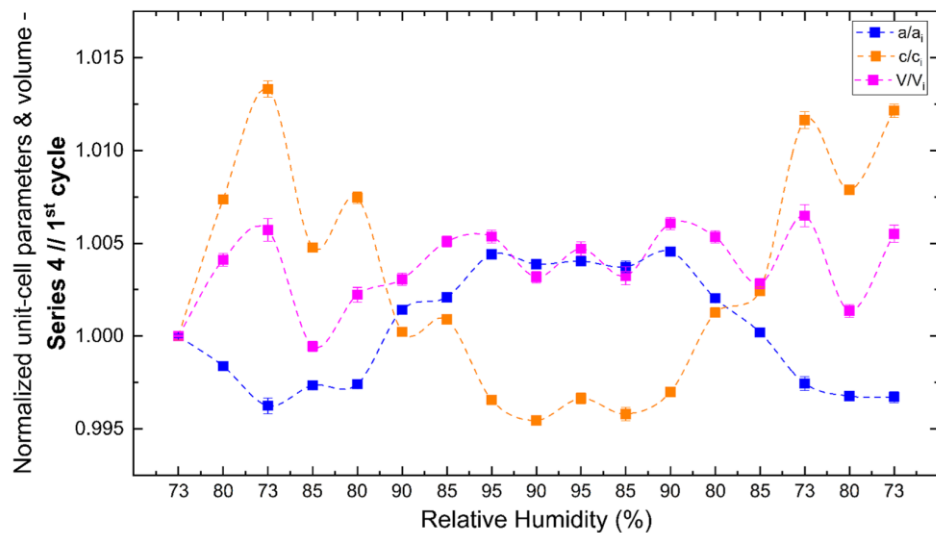
Η ανάλυση κατά Pawley όλων των δεδομένων XRPD επιβεβαίωσε επίσης την παρουσία του $P4_3212$ κρυσταλλικού πολυμόρφου καθώς και την διατήρησή του καθόλη την πορεία των τριών πειραματικών

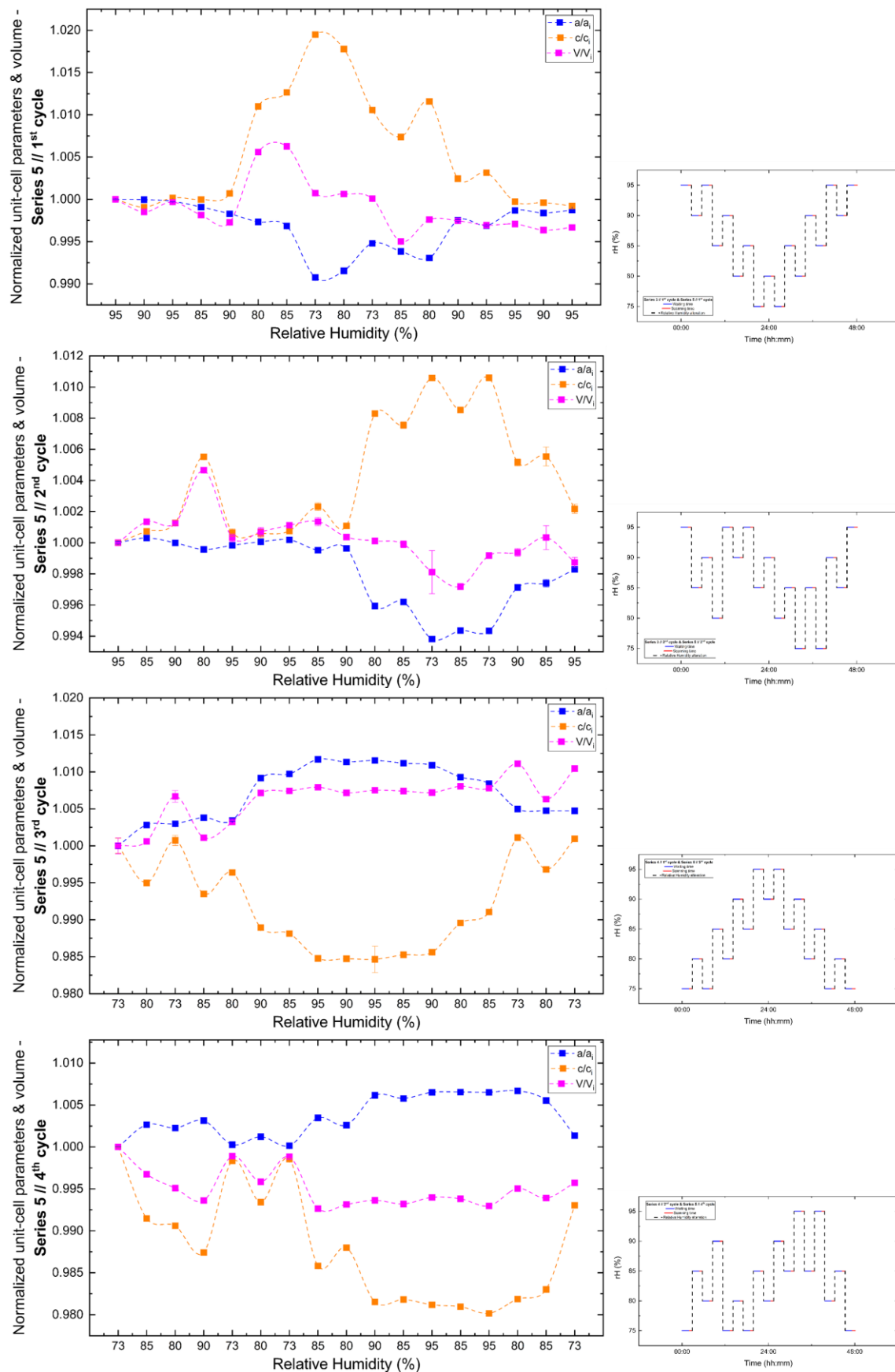
διαδικασιών. Στην **Εικόνα 6-22** παρουσιάζονται επιλεγμένα Pawley fits σε διάφορα επίπεδα rH για όλες τις σειρές πειραμάτων.

Μετά την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης, διαπιστώθηκε πως η rH επηρεάζει τις πλεγματικές σταθερές της μοναδιαίας κυψελίδας. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στις **Εικόνες 6-23, 6-24 & 6-25**, οι πλεγματικές σταθερές $a(=b)$ και c μεταβάλλονται ανισοτροπικά, με την μείωση της rH να επιφέρει μείωση του άξονα a και αύξηση του άξονα c , ενώ κατά την αύξηση της rH παρατηρείται η αντίστροφη επίδραση.



Εικόνα 6-23. Διαγράμματα των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του πρώτου και του δεύτερου κύκλου αυξομειώσεων της rH της τρίτης σειράς. Η κανονικοποίηση για κάθε πλεγματική σταθερά έχει πραγματοποιηθεί ως προς την τιμή που αυτή είχε στο αρχικό επίπεδο rH του κάθε κύκλου. Στο πλάι κάθε διαγράμματος φαίνεται η πορεία αυξομειώσεων της rH για τον κάθε κύκλο.





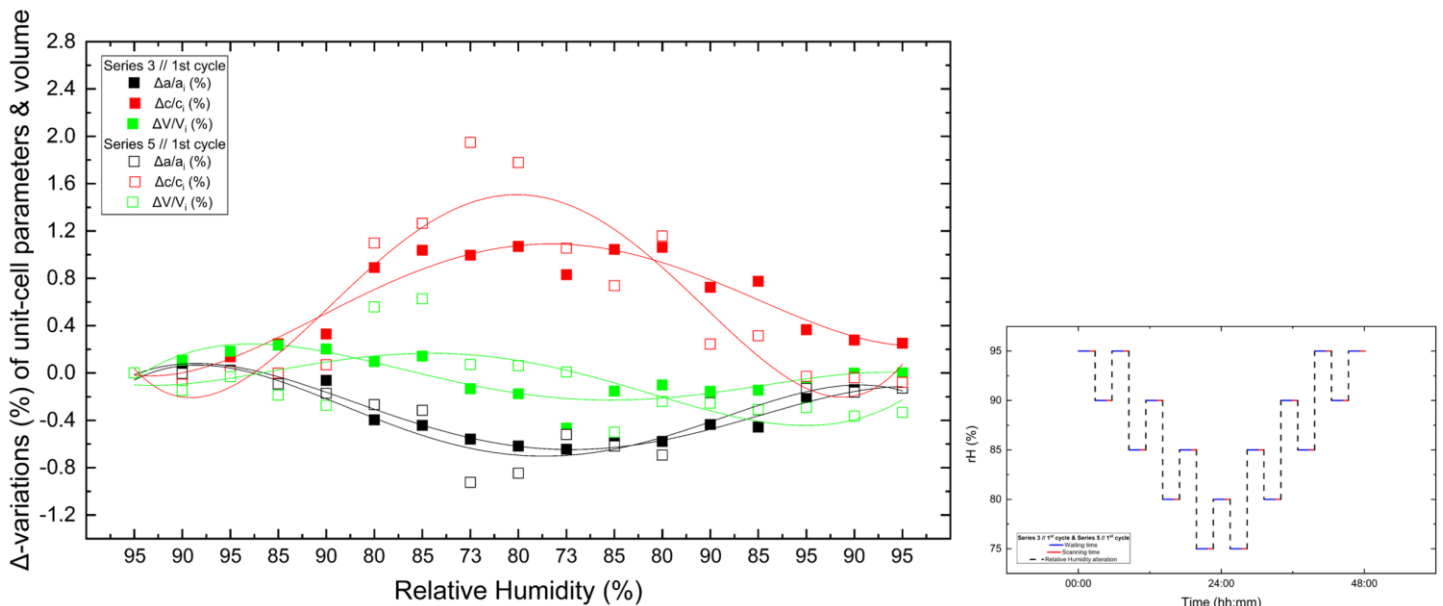
Εικόνα 6-25. Διαγράμματα των κανονικοποιημένων πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας του πρώτου, του δεύτερου, του τρίτου και του τέταρτου κύκλου αυξομειώσεων της rH της πέμπτης σειράς. Η κανονικοποίηση για κάθε πλεγματική σταθερά έχει πραγματοποιηθεί ως προς την τιμή που αυτή είχε στο αρχικό επίπεδο rH του κάθε κύκλου. Στο πλάι κάθε διαγράμματος φαίνεται η πορεία αυξομειώσεων της rH για τον κάθε κύκλο.

Οι ποσοστιαίες μεταβολών των πλεγματικών σταθερών και του όγκου της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων αυξομείωσης της rH ανέδειξε ορισμένα σταθερά και επαναλαμβανόμενα χαρακτηριστικά (**Εικόνες 6-26, 6-27, 6-28 & 6-29**). Συνολικά, οι παρατηρούμενες μεταβολές ήταν περιορισμένες, της τάξεως του $\pm 2\%$, γεγονός που καταδεικνύει ότι η τετραγωνική HEWL παρουσιάζει σημαντική σταθερότητα έναντι των διαδοχικών εναλλαγών αφυδάτωσης και ενυδάτωσης.

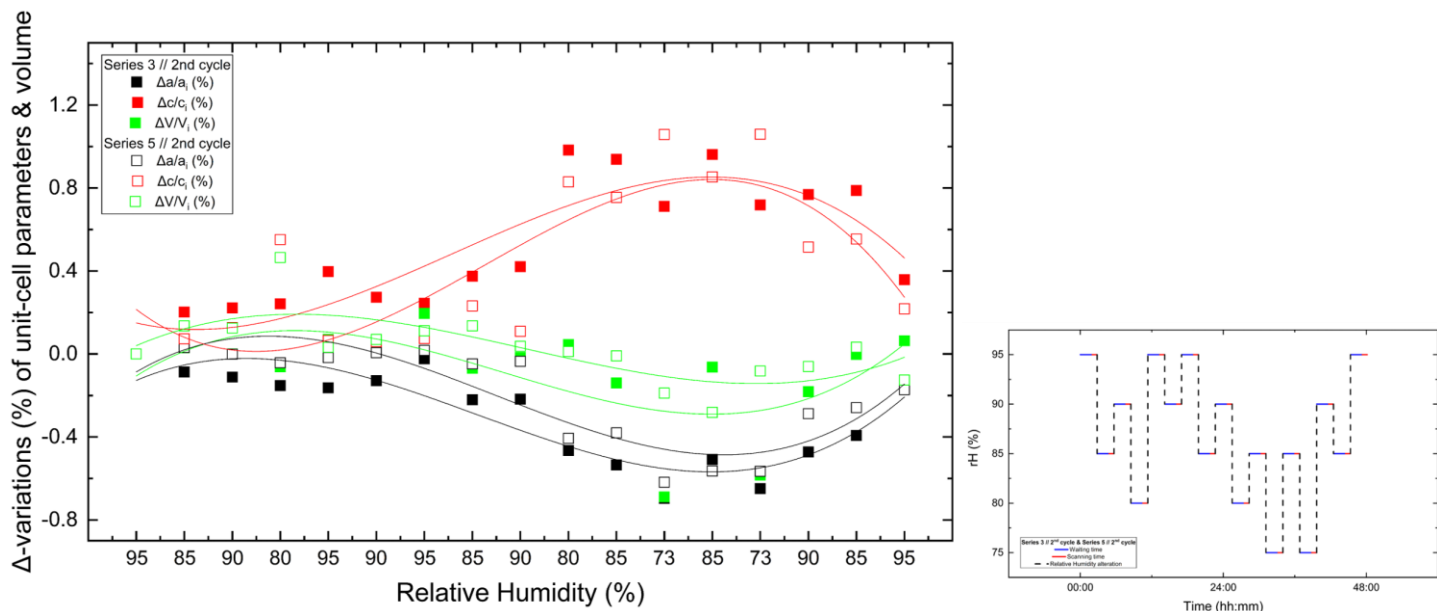
Σε όλους τους κύκλους, η πλεγματική σταθερά c εμφάνισε τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις συγκριτικά με την a , γεγονός που υποδηλώνει ότι η κρυσταλλική δομή είναι περισσότερο ευαίσθητη στην διεύθυνση αυτή. Ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας V φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από τον άξονα a , οπότε και παρατηρήθηκε αντίστοιχη πορεία του με σχετικά ομαλές αυξομειώσεις χωρίς απότομες διαταραχές.

Η σύγκριση αρχικών και επαναληπτικών μετρήσεων σε κάθε κύκλο έδειξε υψηλό βαθμό αναπαραγωγιμότητας. Οι γενικές τάσεις των καμπυλών παρέμειναν παρόμοιες, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκαν μικρές αποκλίσεις ή υστέρηση στην αποκατάσταση των παραμέτρων μετά από κάθε αυξομείωση της υγρασίας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι δομικές αποκρίσεις της λυσοζύμης είναι σε μεγάλο βαθμό αναστρέψιμες, αλλά ίσως εμπεριέχουν ήπιες αναπροσαρμογές λόγω του ιστορικού αφυδάτωσης και ενυδάτωσης. Την παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει το γεγονός πως στον τρίτο κύκλο της πέμπτης σειράς παρατηρούνται μεγαλύτερες ποσοστιαίες μεταβολές του άξονα c σε σχέση με τον πρώτο κύκλο της τέταρτης σειράς, όπου το πρωτόκολλο συλλογής δεδομένων και η ακολουθία των επιπέδων rH ήταν τα ίδια, το οποίο οφείλεται στο ότι το δείγμα της πέμπτης σειράς υπέστη όλες τις αυξομειώσεις της rH όλων των κύκλων, ενώ οι μετρήσεις της τρίτης και της τέταρτης σειράς έγιναν σε δύο διαφορετικά δείγματα.

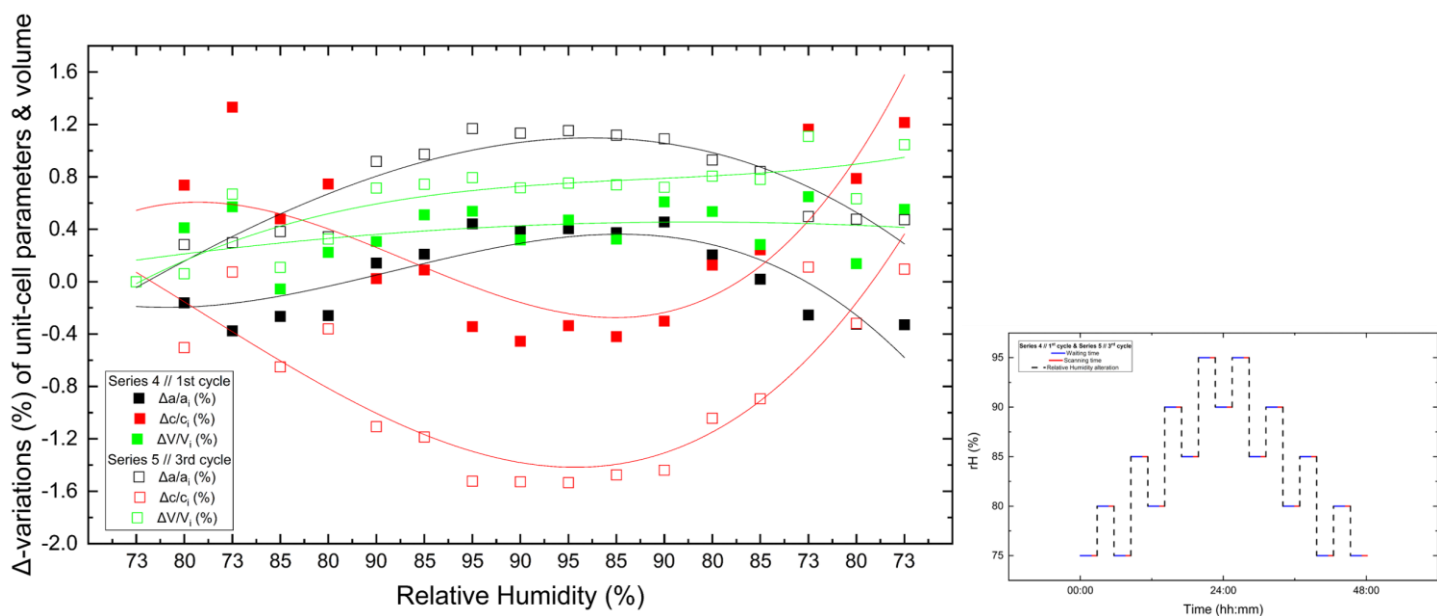
Τέλος, δεν εντοπίστηκαν ενδείξεις μεταβάσεων φάσης σε κανέναν από τους κύκλους. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν ήταν συνεχείς και ανισοτροπικές, χωρίς να οδηγούν σε απότομες αναδιατάξεις της δομής. Συνεπώς, η τετραγωνική μορφή της λυσοζύμης διατηρήθηκε σε όλα τα πρωτόκολλα αυξομείωσης της σχετικής υγρασίας, επιβεβαιώνοντας την ανθεκτικότητά της σε συνθήκες περιβαλλοντικών αλλαγών.



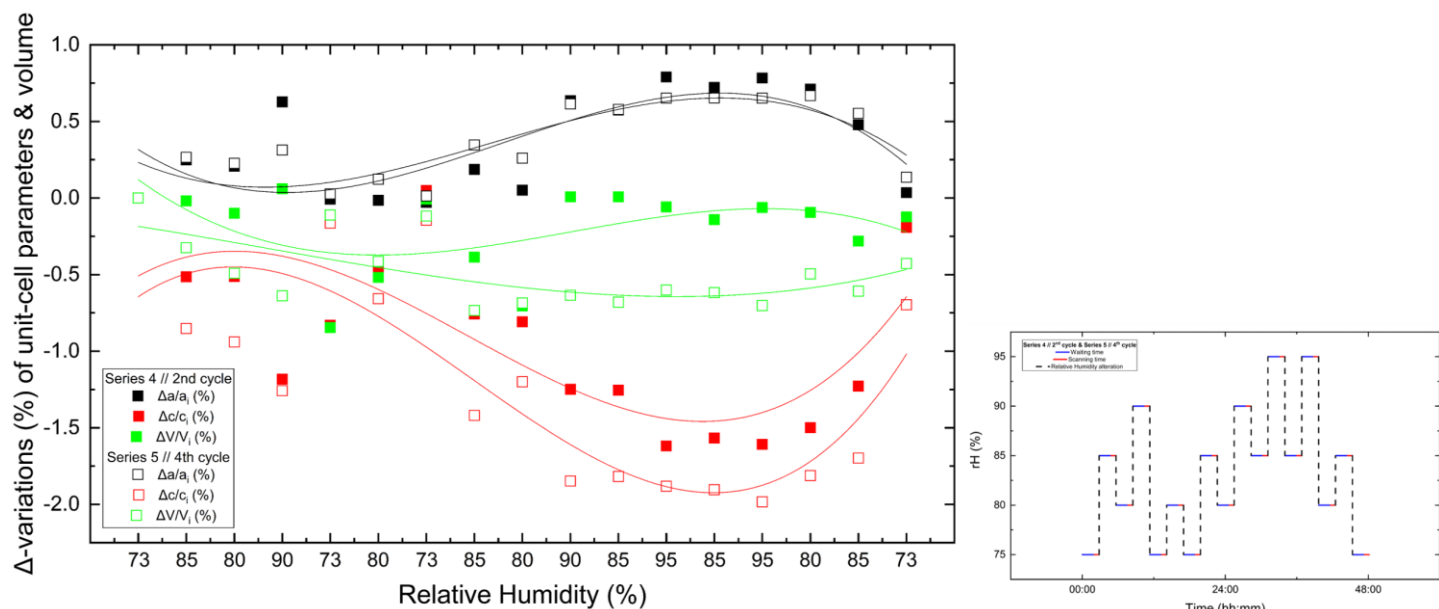
Εικόνα 6-26. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών $[(\Delta x/x_i) \times 100\%]$ για τις πλεγματικές σταθερές και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τις αυξομειώσεις του πρώτου κύκλου της τρίτης σειράς (γεμάτα σύμβολα) και του πρώτου κύκλου της πέμπτης σειράς (ανοιχτά σύμβολα). Στο πλάι φαίνεται η πορεία των αυξομειώσεων της rH, η οποία ήταν και η ίδια για τους δύο κύκλους.



Εικόνα 6-27. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών $[(\Delta x/x_i) \times 100\%]$ για τις πλεγματικές σταθερές και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τις αυξομειώσεις του δεύτερου κύκλου της τρίτης σειράς (γεμάτα σύμβολα) και του δεύτερου κύκλου της πέμπτης σειράς (ανοιχτά σύμβολα). Στο πλάι φαίνεται η πορεία των αυξομειώσεων της rH, η οποία ήταν και η ίδια για τους δύο κύκλους.



Εικόνα 6-28. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών $[(\Delta x/x_i) \times 100\%]$ για τις πλεγματικές σταθερές και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τις αυξομειώσεις του πρώτου κύκλου της τέταρτης σειράς (γεμάτα σύμβολα) και του τρίτου κύκλου της πέμπτης σειράς (ανοιχτά σύμβολα). Στο πλάι φαίνεται η πορεία των αυξομειώσεων της rH, η οποία ήταν και η ίδια για τους δύο κύκλους.



Εικόνα 6-29. Διάγραμμα ποσοστιαίων μεταβολών $[(\Delta x/x_i) \times 100\%]$ για τις πλεγματικές σταθερές και τον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας κατά τις αυξομειώσεις του δεύτερου κύκλου της τέταρτης σειράς (γεμάτα σύμβολα) και του τέταρτου κύκλου της πέμπτης σειράς. Στο πλάι φαίνεται η πορεία των αυξομειώσεων της rH, η οποία ήταν και η ίδια για τους δύο κύκλους.

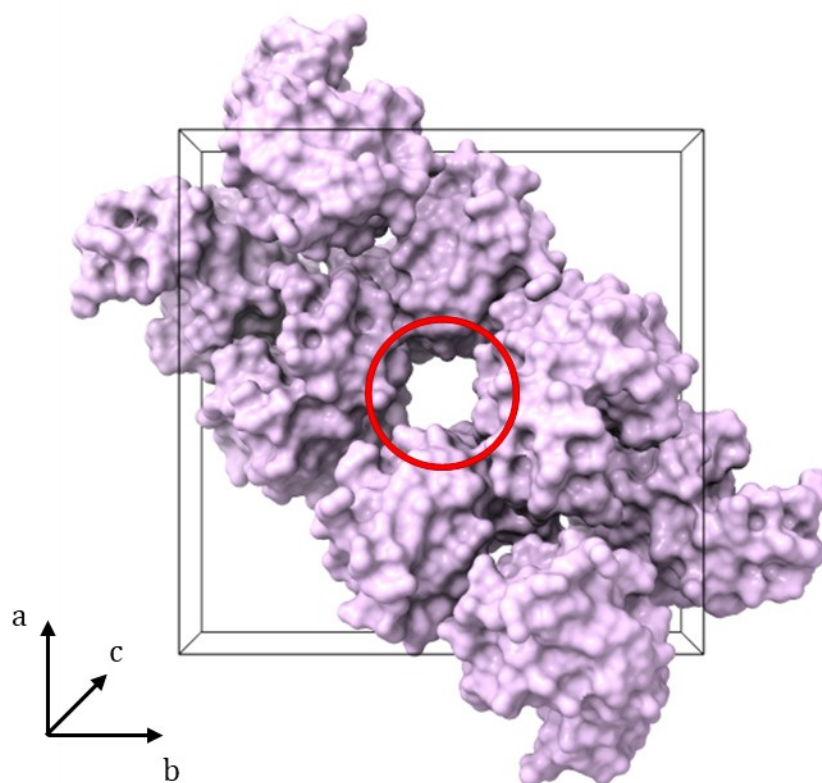
6.3. Συμπεράσματα & Συζήτηση

Η μελέτη της επίδρασης της rH στην συμπεριφορά πρωτεϊνικών κρυστάλλων προσφέρει κρίσιμες πληροφορίες για τον μηχανισμό σταθεροποίησης των πολυμόρφων τους και την ευρύτερη φαρμακευτική αξιοποίησή τους. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν σε αυτόν τον άξονα της παρούσας εργασίας για την ανθρώπινη ινσουλίνη σε σύμπλοκο με 4-χλωρορεσορσινόλη, καθώς και για την τετραγωνική λυσοζύμη υπό πρωτόκολλα διαδοχικών αυξομειώσεων της υγρασίας, αναδεικνύουν την σημασία της κατανόησης και συνεκτίμησης των περιβαλλοντικών παραμέτρων, τόσο για την μελέτη των πρωτεϊνικών κρυστάλλων όσο και για την ανάπτυξη και αποθήκευση φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Στην περίπτωση της ανθρώπινης ινσουλίνης, η μελέτη του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ αποκάλυψε ότι η κρυσταλλική δομή διατηρείται σταθερή σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αφυδάτωσης και ενυδάτωσης, χωρίς να υπάρχει μετάβαση φάσης. Βέβαια, παρατηρήθηκε μείωση της έντασης του σήματος περίθλασης στα χαμηλά επίπεδα rH (<70%), το οποίο είναι ένδειξη της υποβάθμισης της κρυσταλλικότητας του δείγματος. Ομοίως για την περίπτωση του πολυμόρφου $P2_{1(\beta)}$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία 4-βρωμορεσορσινόλης, η κρυσταλλικότητα του πολυμόρφου διατηρείται επίσης μέχρι και rH 50%, όμως υποβαθμίζεται αρκετά στα χαμηλά επίπεδα rH (Κούτουλας, 2025). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα ρομβοεδρικά πολύμορφα $R3$ ανθρώπινης ινσουλίνης απουσία προσδότη μοριακών διαμορφώσεων T_6 και T_3Rf_3 , έδειξε, για το πρώτο πολύμορφο, πως η κρυσταλλικότητα του δείγματος χάνεται από rH 80% και κάτω, ενώ δεν επανενυδατώνεται με την επανενυδάτωση του δείγματος. Αντιθέτως, η κρυσταλλικότητα του πολυμόρφου $R3(T_3Rf_3)$ διατηρήθηκε μέχρι και rH 50%, με σοβαρή υποβάθμισή της σε επίπεδα rH <80% (Καφετζή, 2025). Επίσης, αντίστοιχες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για τα ρομβοεδρικά πολύμορφα $R3$ ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία των προσδετών m-κρεσόλη και m-νιτροφαινόλη (μοριακές διαμορφώσεις R_6), στις οποίες η κρυσταλλικότητα του δείγματος φαίνεται επίσης να υποβαθμίζεται σε επίπεδα rH κάτω του 80% (Κονταρίνης, 2024; Παπαευθυμίου, 2024; Kontarinis, Papaefthymiou et al., 2025). Σε όλες τις περιπτώσεις μελετών, όπως και στην περίπτωση της παρούσας εργασίας, η επανενυδάτωση των δειγμάτων φαίνεται να επιδρά θετικά, καθώς η κρυσταλλικότητα αποκαθίσταται εν μέρει.

Επίσης, παρατηρήθηκε ανισοτροπία στην συμπεριφορά των αξόνων της μοναδιαίας κυψελίδας, με τον άξονα c να εμφανίζει μεγαλύτερες αποκλίσεις σε σύγκριση με τους άξονες a και b , το οποίο παρατηρήθηκε και στην μελέτη του $R3$ κρυσταλλικού πολυμόρφου ανθρώπινης ινσουλίνης και m -νιτροφαινόλης (Κονταρίνης, 2024; Kontarinis, Papaefthymiou et al., 2025). Η ανισοτροπική αυτή απόκριση πιθανώς συνδέεται με το πακετάρισμα του εξαμερούς της ινσουλίνης, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις του εκάστοτε προσδέτη με το περιβάλλον του. Η παρατήρηση της ανισοτροπικής απόκρισης έρχεται σε αντίθεση με την περίπτωση της μελέτης της επίδρασης της σχετικής υγρασίας στο μονοκλινές πολύμορφο $P2_1(\beta)$ ανθρώπινης ινσουλίνης και 4-βρωμορεσορσινόλης, στην οποία παρατηρήθηκε ισοτροπία στις μεταβολές των πλεγματικών σταθερών (Κούτουλας, 2025). Παρά την υποκατάσταση του 4^{ου} άνθρακα του φαινολικού δακτυλίου με ένα άτομο αλογόνου και στις δύο περιπτώσεις προσδετών, η συμπεριφορά του κρυσταλλικού πλέγματος διαφοροποιείται. Δεδομένου ότι οι κρυσταλλικές δομές με τις δύο ενώσεις είναι λυμένες και παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα (Σπηλιοπούλου, 2023), η διαφοροποίηση δεν μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικό τρόπο πακεταρίσματος του εξαμερούς της ινσουλίνης. Αντίθετα, η διαφορά που παρατηρήθηκε είναι πιο πιθανό να οφείλεται σε τοπικές αλληλεπιδράσεις, όπως ο τρόπος με τον οποίο το χλώριο σε σχέση με το βρώμιο επηρεάζει το δίκτυο δεσμών υδρογόνου γύρω από το σύμπλοκο.

Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες της ομάδας (Spiliouroulou et al., 2021), όπου αναδείχθηκε για πρώτη φορά η παρουσία του πολυμόρφου $P2_1(\beta)$ της ινσουλίνης σε σύμπλοκο με 4-χλωρορεσορσινόλη. Ενώ στην παρούσα εργασία η μελέτη επικεντρώθηκε σε συνθήκες μεταβαλλόμενης rH , η παρατήρηση ότι η κρυσταλλική φάση παραμένει σταθερή ακόμη και υπό κύκλους αφυδατώσεων και ενυδατώσεων ενισχύει την υπόθεση ότι η 4-χλωρορεσορσινόλη δρα ως ισχυρός σταθεροποιητής της συγκεκριμένης δομής.



Εικόνα 6-30. Το πακετάρισμα της HEWL στην μοναδιαία κυψελίδα τετραγωνικής συμμετρίας. Το μαύρο τρισδιάστατο πλαίσιο απεικονίζει την μοναδιαία κυψελίδα και με μωβ είναι χρωματισμένα τα οκτώ μόρια HEWL που βρίσκονται εντός της. Ο κόκκινος κύκλος καταδεικνύει το κανάλι διαλύτη που βρίσκεται κατά μήκος του άξονα c (PDB ID: 1jis; Datta et al., 2001).

Η μελέτη στην τετραγωνική HEWL προσέφερε μια διαφορετική οπτική. Σε αντίθεση με τις σταδιακές αφυδατώσεις και ενυδατώσεις που έχουν παρουσιαστεί στην βιβλιογραφία σε διάφορα κρυσταλλικά πολύμορφα της HEWL (Logotheti et al., 2019; Trampari et al., 2018), στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα διαδοχικών αυξομειώσεων της υγρασίας, τα οποία προσομοιάζουν περισσότερο σε ρεαλιστικές συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι οι πλεγματικές σταθερές μεταβάλλονται μεν κατά τις εναλλαγές της rH , ωστόσο η κρυσταλλική συμμετρία παρέμεινε αναλλοίωτη χωρίς να παρατηρηθεί μετάβαση φάσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ανάλυση των δεδομένων XRPD έδειξε ανισοτροπία στην συμπεριφορά των αξόνων της μοναδιαίας κυψελίδας. Συγκεκριμένα, ο άξονας c εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεταβολές της υγρασίας, σε σχέση με τον άξονα a ($=b$). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία καναλιών διαλύτη κατά μήκος του άξονα c , τα οποία διευκολύνουν την πρόσληψη ή αποβολή μορίων νερού (**Εικόνα 6-30**) (Datta et al., 2001), δείχνοντας ότι οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι δεν είναι ομοιόμορφοι στην συμπεριφορά τους, αλλά επηρεάζονται από την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων και των εσωτερικών καναλιών τους.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των δύο συστημάτων καταδεικνύουν ότι η επίδραση της υγρασίας στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους δεν μπορεί να ερμηνευτεί με γενικευμένους κανόνες, αλλά εξαρτάται από το μόριο, τον προσδέτη, καθώς και την κρυσταλλική συμμετρία. Η ινσουλίνη παρουσία 4-χλωρορεσορσινόλης παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα, με μικρές μόνο μεταβολές στις πλεγματικές σταθερές ακόμη και μετά από πολλαπλούς κύκλους μεταβολών. Η λυσοζύμη, αν και διατηρεί επίσης την κρυσταλλικότητά της, παρουσιάζει πιο έντονες ανισοτροπικές αποκρίσεις, που συνδέονται πιθανότατα με την εσωτερική τοποθέτηση των καναλιών διαλύτη. Η φαρμακευτική σημασία αυτών των παρατηρήσεων είναι διττή. Αφενός, η σταθερότητα των κρυσταλλικών μορφών της ινσουλίνης υπό μεταβολές υγρασίας ενισχύει την δυνατότητα αξιοποίησής τους σε εμπορικά σκευάσματα, όπου η μακροχρόνια σταθερότητα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση. Αφετέρου, η μελέτη της λυσοζύμης αναδεικνύει ότι η παρουσία καναλιών διαλύτη και η ανισοτροπία στην δομική απόκριση μπορεί να αποτελέσουν καθοριστικούς παράγοντες στην διαμόρφωση της σταθερότητας και, κατ' επέκταση, στην σχεδίαση πιο ανθεκτικών φαρμακευτικών μορφών.

Μελλοντικά, η συστηματική μελέτη της επίδρασης όχι μόνο της υγρασίας αλλά και της θερμοκρασίας μπορεί να προσφέρει βαθύτερη κατανόηση των παραγόντων που καθορίζουν την σταθερότητα των πρωτεϊνικών κρυστάλλων. Επιπλέον, η επέκταση των μελετών σε άλλα πολύμορφα της ινσουλίνης παρουσία διαφορετικών οργανικών προσδετών θα συμβάλει στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι συνθήκες του περιβάλλοντος επηρεάζουν τις δομικές διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται. Στο φαρμακευτικό πλαίσιο, τέτοιες γνώσεις μπορούν να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη νέων σκευασμάτων με αυξημένη σταθερότητα και καλύτερη φαρμακοκινητική. Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει ότι η μελέτη των πρωτεϊνικών κρυστάλλων υπό συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας αποτελεί ισχυρό εργαλείο για την κατανόηση της σταθερότητας και της ανθεκτικότητάς τους. Οι παρατηρήσεις στην ινσουλίνη με 4-χλωρορεσορσινόλη και στην λυσοζύμη παρέχουν νέα δεδομένα για την συζήτηση γύρω από την αλληλεπίδραση των προσδετών, των κρυσταλλικών αλληλεπιδράσεων και των περιβαλλοντικών παραμέτρων, ενώ ανοίγουν τον δρόμο για στοχευμένες μελέτες που θα ενισχύσουν την ανάπτυξη βελτιωμένων θεραπειών.

Βιβλιογραφία

- Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., & Sheat, S. (1969). Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature*, 224(5218), 491–495. <https://doi.org/10.1038/224491A0>
- Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., & Malik, R. A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 211–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1>
- Ameh, E. S. (2019). A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 105(7-8), 3289–3302. <https://doi.org/10.1007/s00170-019-04508-1>
- Andrali, S. S., Sampley, M. L., Vanderford, N. L., & Ozcan, S. (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *The Biochemical Journal*, 415(1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BJ20081029>
- Artymiuk, P. J., Blake, C. C. F., Rice, D. W., & Wilson, K. S. (1982). The structures of the monoclinic and orthorhombic forms of hen egg-white lysozyme at 6 Å resolution. *Acta Crystallographica Section B*, 38(3), 778–783. <https://doi.org/10.1107/S0567740882004075>
- Askeland, D. R., Fulay, P. P., & Wright, W. J. (2010). *THE SCIENCE AND ENGINEERING OF MATERIALS* (6th ed.). CL Engineering.
- Atakisi, H., Moreau, D. W., & Thorne, R. E. (2018). Effects of protein-crystal hydration and temperature on side-chain conformational heterogeneity in monoclinic lysozyme crystals. *Acta Crystallographica Section D*, 74(4), 264–278. <https://doi.org/10.1107/S2059798318000207>
- Athanasiadou, M., Papaefthymiou, C., Kontarinis, A., Spiliopoulou, M., Koutoulas, D., Konstantopoulos, M., Kafetzi, S., Barlos, K., Barlos, K. K., Dadivanyan, N., Beckers, D., Degen, T., Fitch, A. N., & Margiolaki, I. (2024). Structural Evolution of the Pharmaceutical Peptide Octreotide upon Controlled Relative Humidity and Temperature Variation. *SynBio*, 2(2), 205–222. <https://doi.org/10.3390/synbio2020012>
- Balerna, A., & Mobilio, S. (2015). Introduction to Synchrotron Radiation. In S. Mobilio, F. Boscherini, & C. Meneghini (Eds.), *Synchrotron Radiation: Basics, Methods and Applications* (pp. 3–28). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55315-8_1
- Basnet, M. (2023). *Production of X-rays*.
- Basso, S., Fitch, A. N., Fox, G. C., Margiolaki, I., & Wright, J. P. (2005). High-throughput phase-diagram mapping via powder diffraction: A case study of HEWL versus pH. *Acta Crystallographica Section D*, 61(12), 1612–1625. <https://doi.org/10.1107/S0907444905031963>
- Bauer, I., Rimbach, G., Cordeiro, S., Bosy-Westphal, A., Weghuber, J., Ipharraguerre, I. R., & Lüersen, K. (2024). A comprehensive in-vitro/in-vivo screening toolbox for the elucidation of glucose homeostasis modulating properties of plant extracts (from roots) and its bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, Volume 15-2024. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1396292>
- Beals, J. M., DeFelippis, M. R., Paavola, C. D., Allen, D. P., Garg, A., & Baldwin, D. B. (2019). Insulin. In D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical biotechnology* (pp. 403–427). Springer Nature Switzerland, https://doi.org/10.1007/978-3-030-007-2_18
- Bergamo, A., & Sava, G. (2023). Pharmacological Modulation of Host Immunity with Hen Egg White Lysozyme (HEWL)—A Review. *Molecules*, 28(13). <https://doi.org/10.3390/molecules28135027>
- Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00039-X)
- Bergfors, T. M. (2021). *Protein Crystallization* (3rd ed.). International University Line.
- Berthou, J., Lifchitz, A., Artymiuk, P., & Jollès, P. (1983). An X-ray study of the physiological-temperature form of hen egg-white lysozyme at 2 Å resolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 217(1209), 471–489. <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0021>
- Bharti, A., & Goyal, N. (2019). Fundamental of Synchrotron Radiations. In D. Joseph (Ed.), *Synchrotron Radiation*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82202>
- Bhatnagar, S., Srivastava, D., Jayadev, M. S. K., & Dubey, A. K. (2006). Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 91(3), 199–228. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.012>

- BLAKE, C. C. F., KOENIG, D. F., MAIR, G. A., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C., & SARMA, V. R. (1965). Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. *Nature*, 206(4986), 757–761. <https://doi.org/10.1038/206757a0>
- Boer, J., & Jemec, G. B. (2010). Resorcinol peels as a possible self-treatment of painful nodules in hidradenitis suppurativa. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35(1), 36–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03377.x>
- Boultif, A., & Louër, D. (1991). Indexing of powder diffraction patterns for low-symmetry lattices by the successive dichotomy method. *Journal of Applied Crystallography*, 24(6), 987–993. <https://doi.org/10.1107/S0021889891006441>
- BOYES-WATSON, J., DAVIDSON, E., & PERUTZ, M. F. (1947). An X-ray study of horse methaemoglobin. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 191(1024), 83–132. <https://doi.org/10.1098/rspa.1947.0104>
- Bragg, W. H. & Bragg W. L. (1913). The reflection of X-rays by crystals. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 88: 428–438 <http://doi.org/10.1098/rspa.1913.0040>
- Brandenburg, D. (2008). History and Diagnostic Significance of C-Peptide. *Journal of Diabetes Research*, 2008(1), 576862. <https://doi.org/10.1155/2008/576862>
- Brange, J., & Langkjøer, L. (1993). Insulin Structure and Stability. In Y. J. Wang & R. Pearlman (Eds.), *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories* (pp. 315–350). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1236-7_11
- Caglioti, G., Paoletti, A., & Ricci, F. P. (1958). Choice of collimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction. *Nuclear Instruments*, 3(4), 223–228. [https://doi.org/10.1016/0369-643X\(58\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0369-643X(58)90029-X)
- Chang, R., & Thoman, J. W. (2021). ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑ (I. Δ. Καπόλος, Α. Ν. Κολιαδήμα, Χ. Γ. Κοντογιάννης, Γ. Μαρούλης, Σ. Β. Σκούλικα, Σ. Θ. Σωτηρόπουλος, Δ. Γ. Τζέλη & Δ. Θ. Τσιπακλίδης, Trans., Α. Ν. Κολιαδήμα, Ed.). Broken Hill Publishers LTD.
- Chayen, N. E. (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(5), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.08.002>
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5(2), 147–153. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>
- Chayen, N. E., Boggon, T. J., Cassetta, A., Deacon, A., Gleichmann, T., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Nieh, Y. P., Peterson, M. R., Raftery, J., Snell, E. H., Hädener, A., Niemann, A. C., Siddons, D. P., Stojanoff, V., Thompson, A. W., Ursby, T., & Wulff, M. (1996). Trends and challenges in experimental macromolecular crystallography. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 29(3), 227–278. <https://doi.org/10.1017/s0033583500005837>
- Cianci, M., Bourenkov, G., Pompidor, G., Karpics, I., Kallio, J., Bento, I., Roessle, M., Cipriani, F., Fiedler, S., & Schneider, T. R. (2017). P13, the EMBL macromolecular crystallography beamline at the low-emittance PETRA III ring for high- and low-energy phasing with variable beam focusing. *Journal of Synchrotron Radiation*, 24(1), 323–332. <https://doi.org/10.1107/S1600577516016465>
- Ciszak, E., & Smith, G. D. (1994). Crystallographic evidence for dual coordination around zinc in the T3R3 human insulin hexamer. *Biochemistry*, 33(6), 1512–1517. <https://doi.org/10.1021/bi00172a030>
- Cullity, B. D. (1956). *Elements of X-ray diffraction*. Addison-Wesley. <https://archive.org/details/elementsofxraydi030864mbp>
- D'Arcy, A., Sweeney, A. M., & Haber, A. (2004). Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(3), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.023>
- Datta, S., Biswal, B. K., & Vijayan, M. (2001). The effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: A study involving tetragonal lysozyme. *Acta Crystallographica Section D*, 57(11), 1614–1620. <https://doi.org/10.1107/S090744490101280X>
- Degen, T., Sadki, M., Bron, E., König, U., & Nénert, G. (2014). The HighScore suite. *Powder Diffraction*, 29. <https://doi.org/10.1017/S0885715614000840>
- Dejoie, C., Coduri, M., Petitdemange, S., Giacobbe, C., Covacci, E., Grimaldi, O., Autran, P.-O., Mogodi, M. W., Šišak Jung, D., & Fitch, A. N. (2018). Combining a nine-crystal multi-analyser stage with a two-dimensional detector for high-resolution powder X-ray diffraction. *Journal of Applied Crystallography*, 51(6), 1721–1733. <https://doi.org/10.1107/S1600576718014589>
- Delagenière, S., Brechereau, P., Launer, L., Ashton, A. W., Leal, R., Veyrier, S., Gabadinho, J., Gordon, E. J., Jones, S. D., Levik, K. E., McSweeney, S. M., Monaco, S., Nanao, M., Spruce, D., Svensson, O., Walsh, M. A., & Leonard, G. A. (2011). ISPyB: an information management system for synchrotron macromolecular crystallography. *Bioinformatics*, 27(22), 3186–3192. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr535>

- Dobrianov, I., Kriminski, S., Caylor, C. L., Lemay, S. G., Kimmer, C., Kisselev, A., Finkelstein, K. D., & Thorne, R. E. (2001). Dynamic response of tetragonal lysozyme crystals to changes in relative humidity: Implications for post-growth crystal treatments. *Acta Crystallographica Section D*, 57(1), 61–68. <https://doi.org/10.1107/S0907444900014578>
- Drenth, J. (2007). *Principles of protein X-ray crystallography* (3rd ed.). Springer.
- Dunn, M. F. (2005). Zinc–Ligand Interactions Modulate Assembly and Stability of the Insulin Hexamer – A Review. *Biometals*, 18(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3685-y>
- Durairaj, R. B. (2005). Resorcinol: Chemistry, technology and applications. Springer. <https://doi.org/10.1007/3-540-28090-1>
- Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(Pt 4), 282–92. <https://doi.org/10.1107/S090744491003982X>
- Ferraboschi, P., Ciceri, S., & Grisenti, P. (2021). Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>
- Fili, S., Valmas, A., Norrman, M., Schluckebier, G., Beckers, D., Degen, T., Wright, J., Fitch, A., Gozzo, F., Giannopoulou, A. E., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2015). Human insulin polymorphism upon ligand binding and pH variation: The case of 4-ethylresorcinol. *IUCr*, 2(5), 534–544. <https://doi.org/10.1107/S2052252515013159>
- Final Report on the Safety Assessment of 4-Chlororesorcinol. (1996). *Journal of the American College of Toxicology*, 15(4), 284–294. <https://doi.org/10.3109/10915819609008720>
- Finger, L., Cox, D., & Jephcoat, A. (1994). A Correction for Powder Diffraction Peak Asymmetry Due to Axial Divergence. *Journal of Applied Crystallography*, 27, 892–900. <https://doi.org/10.1107/S0021889894004218>
- Fitch, A. (2019). Synchrotron radiation and powder diffraction. In C. J. Gilmore, J. A. Kaduk, & H. Schenk (Eds.), *International tables for crystallography: Vol. H. Powder diffraction* (pp. 51–65). International Union of Crystallography. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000937>
- Fitch, A. N. (2004). The High Resolution Powder Diffraction Beam Line at ESRF. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 109(1), 133–142. <https://doi.org/10.6028/jres.109.010>
- Fitch, A., & Dejoie, C. (2021). Combining a multi-analyzer stage with a two-dimensional detector for high-resolution powder X-ray diffraction: Correcting the angular scale. *Journal of Applied Crystallography*, 54(4), 1088–1099. <https://doi.org/10.1107/S1600576721005288>
- Fitch, A., Dejoie, C., Covacci, E., Confalonieri, G., Grendal, O., Claustre, L., Guillou, P., Kieffer, J., de Nolf, W., Petitdemange, S., Ruat, M., & Watier, Y. (2023). ID22 – the high-resolution powder-diffraction beamline at ESRF. *Journal of Synchrotron Radiation*, 30(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1107/S1600577523004915>
- Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653), 306–317. <https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023>
- Gabadinho, J., Beteva, A., Guijarro, M., Rey-Bakaikoa, V., Spruce, D., Bowler, M. W., Brockhauser, S., Flot, D., Gordon, E. J., Hall, D. R., Lavault, B., McCarthy, A. A., McCarthy, J., Mitchell, E., Monaco, S., Mueller-Dieckmann, C., Nurizzo, D., Ravelli, R. B. G., Thibault, X., ... McSweeney, S. M. (2010). It MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *Journal of Synchrotron Radiation*, 17(5), 700–707. <https://doi.org/10.1107/S0909049510020005>
- Ganz, T. (2006). LYSOZYME. In G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.), *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 649–653). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00228-3>
- Giacovazzo, C., Monaco, H. L., Artoli, G., Viterbo, D., Milanesio, M., Gilli, G., Gilli, P., Zanotti, G., Ferraris, G., & Catti, M. (1992). *Fundamentals of Crystallography*. (C., Giacovazzo, Ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199573653.001.0001>
- Harfenist, E. J., & Craig, L. C. (1952). The molecular weight of insulin. *Journal of the American Chemical Society*, 74(13), 3087–3089.
- Held, J., & van Smaalen, S. (2014). The active site of hen egg-white lysozyme: Flexibility and chemical bonding. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 70(Pt 4), 1136–1146. <https://doi.org/10.1107/S1399004714001928>
- Hermann, C. (1928). Zur systematischen Strukturtheorie. *Zeitschrift für Kristallographie – Crystalline Materials*, 68, 257–287. <https://archive.org/details/zeitschrift-fuer-kristallographie-crystalline-materials-1928-68/page/274/mode/2up>
- Hofmeister, F. (1888). Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 24(4), 247–260. <https://doi.org/10.1007/BF01918191>

- Hogle, J., Rao, S., Mallikarjunan, M., Beddell, C., McMullan, R., & Sundaralingam, M. (1981). Studies of monoclinic hen egg white lysozyme. I. Structure solution at 4 Å resolution and molecular-packing comparisons with tetragonal and triclinic lysozymes. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 37, 591–597. <https://doi.org/10.1107/S0567740881003634>
- Huxley, H. E., & Kendrew, J. C. (1953). Discontinuous lattice changes in haemoglobin crystals. *Acta Crystallographica*, 6(1), 76–80. <https://doi.org/10.1107/S0365110X5300017X>
- Kabsch, W. (2010). It XDS. *Acta Crystallographica Section D*, 66(2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Karavassili, F., Giannopoulou, A. E., Kotsiliti, E., Knight, L., Norrman, M., Schluckebier, G., Drube, L., Fitch, A. N., Wright, J. P., & Margiolaki, I. (2012). Structural studies of human insulin cocrystallized with phenol or resorcinol via powder diffraction. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 68(Pt 12), 1632–1641. <https://doi.org/10.1107/S0907444912039339>
- Karavassili, F., Valmas, A., Dimarogona, M., Giannopoulou, A. E., Fili, S., Norrman, M., Schluckebier, G., Beckers, D., Fitch, A. N., & Margiolaki, I. (2020). Exploring the complex map of insulin polymorphism: A novel crystalline form in the presence of it m-cresol. *Acta Crystallographica Section D*, 76(4), 366–374. <https://doi.org/10.1107/S2059798320002545>
- Karavassili, F., Valmas, A., Fili, S., Georgiou, C. D., & Margiolaki, I. (2017). In Quest for Improved Drugs against Diabetes: The Added Value of X-ray Powder Diffraction Methods. *Biomolecules*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/biom7030063>
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 181(4610), 662–666. <https://doi.org/10.1038/181662a0>
- Khorshidian, N., Khanniri, E., Koushki, M. R., Sohrabvandi, S., & Yousefi, M. (2022). An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese. *Frontiers in Nutrition, Volume 9-2022*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.833618>
- Kontarinis, A., Papaefthymiou, C., Kafetzi, S., Konstantopoulos, M., Koutoulas, D., Nanao, M., Schluckebier, G., Norrman, M., Dadivanyan, N., Beckers, D., Degen, T., Rosmaraki, E., Fitch, A., & Margiolaki, I. (2025). Exploring humidity effects on polycrystalline human insulin–ligand complexes: Preliminary crystallographic insights. *Journal of Applied Crystallography*, 58(6). <https://doi.org/10.1107/S1600576725007484>
- Kuntz, I. D., & Kauzmann, W. (1974). *Hydration of Proteins and Polypeptides* (C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, & F. M. Richards, Eds.; Vol. 28, pp. 239–345). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60232-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60232-6)
- Lanza, A., Margheritis, E., Mugnaioli, E., Cappello, V., Garau, G., & Gemmi, M. (2019). Nanobeam precession-assisted 3D electron diffraction reveals a new polymorph of hen egg-white lysozyme. *IUCr*, 6(2), 178–188. <https://doi.org/10.1107/S2052252518017657>
- Laue, M. (1913). Eine quantitative Prüfung der Theorie für die Interferenzerscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Annalen Der Physik*, 346(10), 989–1002. <https://doi.org/10.1002/andp.19133461005>
- Le Bail, A. (2004). Monte Carlo indexing with McMaille. *Powder Diffraction*, 19, 249–254. <https://doi.org/10.1154/1.1763152>
- Lemaire, K., Ravier, M. A., Schraenen, A., Creemers, J. W. M., Plas, R. V. de, Granvik, M., Lommel, L. V., Waelkens, E., Chimienti, F., Rutter, G. A., Gilon, P., Veld, P. A. in't, & Schuit, F. C. (2009). Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 14872–14877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906587106>
- Logotheti, S., Valmas, A., Trampari, S., Fili, S., Saslis, S., Spiliopoulou, M., Beckers, D., Degen, T., Nénert, G., Fitch, A. N., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2019). Unit-cell response of tetragonal hen egg white lysozyme upon controlled relative humidity variation. *Journal of Applied Crystallography*, 52(4), 816–827. <https://doi.org/10.1107/S1600576719009919>
- Margiolaki, I. (2019). Macromolecular powder diffraction. In C. J. Gilmore, J. A. Kaduk, & H. Schenk (Eds.), *International tables for crystallography: Vol. H. Powder diffraction* (pp. 718–736). International Union of Crystallography. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000115>
- Margiolaki, I., & Wright, J. (2008). Powder crystallography on macromolecules. *Acta Crystallographica. Section A, Foundations of Crystallography*, 64(Pt 1), 169–180. <https://doi.org/10.1107/s0108767307043735>
- Margiolaki, I., Wright, J. P., Fitch, A. N., Fox, G. C., & Von Dreele, R. B. (2005). Synchrotron X-ray powder diffraction study of hexagonal turkey egg-white lysozyme. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 61(Pt 4), 423–432. <https://doi.org/10.1107/s0907444905001393>
- Margiolaki, I., Wright, J., Fitch, A., Fox, G., Labrador, A., Dreele, R., Miura, K., Gozzo, F., Schiltz, M., Besnard, C., Camus, F., Pattison, P., Beckers, D., & Degen, T. (2007). Powder diffraction studies on proteins: An overview of data collection approaches. *Zeitschrift Fur Kristallographie, Supplement*, 1. <https://doi.org/10.1524/zksu.2007.2007.suppl.26.1>

- Mauguin, C. (1931). Sure le symbolism des groupes de repetition on de symetrie des assemblages cristallins. *Zeitschrift Für Kristallographie – Crystalline Materials*, 76(1), 542-558. <https://doi.org/doi:10.1524/zkri.1931.76.1.542>
- McPherson, A. (1991). A brief history of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, 110(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(91\)90859-4](https://doi.org/10.1016/0022-0248(91)90859-4)
- McPherson, A. (1999). *Crystallization of biological macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(3), 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.019>
- McPherson, A. (2009). Chapter 1 Introduction to the Crystallization of Biological Macromolecules. In *Current Topics in Membranes, Volume 63* (Vol. 63, pp. 5–23). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(09\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(09)63001-5)
- McPherson, A. (2017). Protein Crystallization. In A. Wlodawer, Z. Dauter, & M. Jaskolski (Eds.), *Protein Crystallography: Methods and Protocols* (pp. 17–50). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_2
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 70(Pt 1), 2–20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Moult, J., Yonath, A., Traub, W., Smilansky, A., Podjarny, A., Rabinovich, D., & Saya, A. (1976). The structure of triclinic lysozyme at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 100(2), 179–195. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80147-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80147-7)
- Nanao, M., Basu, S., Zander, U., Giraud, T., Surr, J., Guijarro, M., Lentini, M., Felisaz, F., Sinoir, J., Morawe, C., Vivo, A., Beteva, A., Oscarsson, M., Caserotto, H., Dobias, F., Flot, D., Nurizzo, D., Gimes, J., Foos, N., ... Leonard, G. (2022). ID23-2: An automated and high-performance microfocus beamline for macromolecular crystallography at the ESRF. Corrigendum. *Journal of Synchrotron Radiation*, 29(3), 928–929. <https://doi.org/10.1107/S1600577522002818>
- Newman, J. (2013). ΦΥΣΙΚΗ για τις Επιστήμες Ζωής (Κ. Μπεθάνης, Π. Τζαμαλής, Ν. Παπανδρέου & Α. Αναστασόπουλος, Trans.). ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΔΙΑΥΛΟΣ. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77259-2> (Original work published 2008).
- Nishinaga, T. (2016). Thermodynamics -for understanding crystal growth-. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62(2), 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2016.04.001>
- Norrman, M., & Schluckebier, G. (2007). Crystallographic characterization of two novel crystal forms of human insulin induced by chaotropic agents and a shift in pH. *BMC Structural Biology*, 7(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-83>
- Norrman, M., Hubálek, F., & Schluckebier, G. (2007). Structural characterization of insulin NPH formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 30(5), 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.01.003>
- Pawley, G. S. (1981). Unit-cell refinement from powder diffraction scans. *Journal of Applied Crystallography*, 14(6), 357–361. <https://doi.org/10.1107/S0021889881009618>
- Pierret, R. F. (2003). *Advanced semiconductor fundamentals* (2nd ed., Vol. VI, Modular series on solid state devices). Prentice Hall.
- Poynting, J. H. (1884). XV. On the transfer of energy in the electromagnetic field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 175, 343–361. <https://doi.org/10.1098/rstl.1884.0016>
- Roisnel, T., & Rodriguez-Carvajal, J. (2001). WinPLOTR: A Windows Tool for Powder Diffraction Pattern Analysis. *Materials Science Forum*, 378–381, 118–123. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.378-381.118>
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Salunke, D. M., Veerapandian, B., Kodandapani, R., & Vijayan, M. (1985). Structural transformations in protein crystals caused by controlled dehydration. *Journal of Biosciences*, 8(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF02703965>
- Saridakis, E., & Chayen, N. E. (2009). Towards a ‘universal’ nucleant for protein crystallization. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.008>
- Schmiedel, K. W., & Decker, D. (2011). Resorcinol. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a23_111.pub2
- Shankland, K., Pidcock, E., Van De Streek, J., David, W. I. F., Motherwell, W. D. S., & Cole, J. C. (2006). DASH: a program for crystal structure determination from powder diffraction data. *Journal of Applied Crystallography*, 39(6), 910–915. <https://doi.org/10.1107/S0021889806042117>
- Sherwood, L. (2016). Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου: Από τα κύτταρα στα συστήματα (Ε. Μαγκίρης, Χ. Παπαθεοδώρου & Κ. Τζιρογιάννης, Trans.) (1st ed.). Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπασδρά και ΣΙΑ Ο.Ε. (Original work published 2012).

- Smith, G. D., Ciszak, E., Magrum, L. A., Pangborn, W. A., & Blessing, R. H. (2000). R₆ hexameric insulin complexed with m-cresol or resorcinol. *Acta Crystallographica Section D*, 56(12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1107/S0907444900012749>
- Sochi, T. (2010). *High Throughput Software for Powder Diffraction and its Application to Heterogeneous Catalysis*.
- Spiliopoulou, M., Karavassili, F., Triandafillidis, D.-P., Valmas, A., Fili, S., Kosinas, C., Barlos, K., Barlos, K. K., Morin, M., Reinle-Schmitt, M. L., Gozzo, F., & Margiolaki, I. (2021). New perspectives in macromolecular powder diffraction using single-photon-counting strip detectors: High-resolution structure of the pharmaceutical peptide octreotide. *Acta Crystallographica Section A*, 77(3), 186–195. <https://doi.org/10.1107/S2053273321001698>
- Spiliopoulou, M., Triandafillidis, D.-P., Valmas, A., Kosinas, C., Fitch, A. N., Von Dreele, R. B., & Margiolaki, I. (2020). Rietveld Refinement for Macromolecular Powder Diffraction. *Crystal Growth & Design*, 20(12), 8101–8123. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00939>
- Spiliopoulou, M., Valmas, A., Triandafillidis, D.-P., Fili, S., Christopoulou, M., Filopoulou, A. J., Piskopou, A., Papadea, P., Fitch, A. N., Beckers, D., Degen, T., Gozzo, F., Morin, M., Reinle-Schmitt, M. L., Karavassili, F., Rosmaraki, E., Chasapis, C. T., & Margiolaki, I. (2021). High-throughput macromolecular polymorph screening via an NMR and X-ray powder diffraction synergistic approach: The case of human insulin co-crystallized with resorcinol derivatives. *Journal of Applied Crystallography*, 54(3), 963–975. <https://doi.org/10.1107/S160057672100426X>
- Spiliopoulou, M., Valmas, A., Triandafillidis, D.-P., Kosinas, C., Fitch, A., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2020). Applications of X-ray Powder Diffraction in Protein Crystallography and Drug Screening. *Crystals*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/cryst10020054>
- Sreekanth, R., Pattabhi, V., & Rajan, S. S. (2009). Metal induced structural changes observed in hexameric insulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.09.019>
- Steiner, D. F. (2008). The biosynthesis of insulin. In S. Seino & G. I. Bell (Eds.), *Pancreatic beta cell in health and disease* (pp. 31–49). Springer.
- Steiner, D. F. (2011). Adventures with insulin in the islets of Langerhans. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17399–17421. <https://doi.org/10.1074/jbc.X111.244764>
- Steinrauf, L. K. (1998). Structures of monoclinic lysozyme iodide at 1.6 Å and of triclinic lysozyme nitrate at 1.1 Å. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 54(Pt 5), 767–780. <https://doi.org/10.1107/s0907444997016922>
- Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2018). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In L. Szablewski (Ed.), *Blood Glucose Levels*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80402>
- Trampari, S., Valmas, A., Logotheti, S., Saslis, S., Fili, S., Spiliopoulou, M., Beckers, D., Degen, T., Nénert, G., Fitch, A. N., Calamiotou, M., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2018). In situ detection of a novel lysozyme monoclinic crystal form upon controlled relative humidity variation. *Journal of Applied Crystallography*, 51(6), 1671–1683. <https://doi.org/10.1107/S1600576718013936>
- Triandafillidis, D. P., Karavassili, F., Spiliopoulou, M., Valmas, A., Athanasiadou, M., Nikolaras, G., Fili, S., Kontou, P., Bowler, M. W., Chasapis, C. T., Von Dreele, R. B., Fitch, A. N., & Margiolaki, I. (2023). The T₂ structure of polycrystalline cubic human insulin. *Acta Crystallographica Section D*, 79(5), 374–386. <https://doi.org/10.1107/S2059798323001328>
- Triandafillidis, D.-P., Parthenios, N., Spiliopoulou, M., Valmas, A., Kosinas, C., Gozzo, F., Reinle-Schmitt, M., Beckers, D., Degen, T., Pop, M., Fitch, A. N., Wollenhaupt, J., Weiss, M. S., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2020). Insulin polymorphism induced by two polyphenols: New crystal forms and advances in macromolecular powder diffraction. *Acta Crystallographica Section D*, 76(11), 1065–1079. <https://doi.org/10.1107/S205979832001195X>
- Valmas, A., Magioudis, K., Fili, S., Norrman, M., Schluckebier, G., Beckers, D., Degen, T., Wright, J., Fitch, A., Gozzo, F., Giannopoulou, A. E., Karavassili, F., & Margiolaki, I. (2015). Novel crystalline phase and first-order phase transitions of human insulin complexed with two distinct phenol derivatives. *Acta Crystallographica Section D*, 71(4), 819–828. <https://doi.org/10.1107/S1399004715001376>
- Vaney, M. C., Broutin, I., Retailleau, P., Douangamath, A., Lafont, S., Hamiaux, C., Prangé, T., Ducruix, A., & Riès-Kautt, M. (2001). Structural effects of monovalent anions on polymorphic lysozyme crystals. *Acta Crystallographica Section D*, 57(7), 929–940. <https://doi.org/10.1107/S0907444901004504>
- Von Dreele, R. B. (1999). Combined Rietveld and stereochemical restraint refinement of a protein crystal structure. *Journal of Applied Crystallography*, 32(6), 1084–1089. <https://doi.org/10.1107/S002188989901064X>
- Von Dreele, R. B., Stephens, P. W., Smith, G. D., & Blessing, R. H. (2000). The first protein crystal structure determined from high-resolution X-ray powder diffraction data: A variant of T_{3R} human insulin–zinc complex produced by grinding. *Acta Crystallographica Section D*, 56(12), 1549–1553. <https://doi.org/10.1107/S0907444900013901>

- Washburn, R. L., Mueller, K., Kaur, G., Moreno, T., Moustaid-Moussa, N., Ramalingam, L., & Dufour, J. M. (2021). C-Peptide as a Therapy for Type 1 Diabetes Mellitus. *Biomedicines*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030270>
- Weiss, M. A. (2009). Chapter 2 The Structure and Function of Insulin: Decoding the TR Transition. In *Insulin and IGFs* (Vol. 80, pp. 33–49). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00602-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00602-X)
- Werner, P.-E., Eriksson, L., & Westdahl, M. (1985). A Semi-Exhaustive Trial-and-Error Powder Indexing Program for All Symmetries. *Journal of Applied Crystallography - J APPL CRYST*, 18, 367–370. <https://doi.org/10.1107/S0021889885010512>
- Willmott, P. R., Meister, D., Leake, S. J., Lange, M., Bergamaschi, A., Böge, M., Calvi, M., Cancellieri, C., Casati, N., Cervellino, A., Chen, Q., David, C., Flechsig, U., Gozzo, F., Henrich, B., Jäggi-Spielmann, S., Jakob, B., Kalichava, I., Karvinen, P., ... Wulschleger, R. (2013). The Materials Science beamline upgrade at the Swiss Light Source. *Journal of Synchrotron Radiation*, 20(Pt 5), 667–682. <https://doi.org/10.1107/S0909049513018475>
- Willson, T. (2020). Basic Radiation Physics: X-Rays. In T. Van den Wyngaert, G. Gnanasegaran, & K. Strobel (Eds.), *Clinical Atlas of Bone SPECT/CT* (pp. 1–3). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32256-4_2-1
- Wipperman, J., Bragg, D. A., & Litzner, B. (2019). Hidradenitis suppurativa: Rapid evidence review. *American Family Physician*, 100(9), 562–569.
- Wright, J. P. (2004). Extraction and use of correlated integrated intensities with powder diffraction data. *Zeitschrift Für Kristallographie - Crystalline Materials*, 219(12), 791–802. <https://doi.org/doi:10.1524/zkri.219.12.791.55857>
- Wright, J. P., & Forsyth, J. B. (2000). *PRODD: Profile refinement of diffraction data using the Cambridge Crystallographic Subroutine Library (CCSL)* (Rutherford Appleton Laboratory Report RAL-TR-2000-012). Rutherford Appleton Laboratory.
- Wright, J. P., Besnard, C., Margiolaki, I., Basso, S., Camus, F., Fitch, A. N., Fox, G. C., Pattison, P., & Schiltz, M. (2008). Molecular envelopes derived from protein powder diffraction data. *Journal of Applied Crystallography*, 41(2), 329–339. <https://doi.org/10.1107/S0021889808002732>
- Zink, F. E. (1997). X-ray tubes. *RadioGraphics*, 17(5), 1259–1268. <https://doi.org/10.1148/radiographics.17.5.9308113>
- Γλυκός, Ν. Μ. (2015). Μια μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών.
- Καφετζή, Σ. (υπό κατάθεση). Δομική και βιοχημική μελέτη βιολογικών μακρομορίων με στόχο τη βελτιστοποίηση φαρμακευτικών σκευασμάτων. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Κονταρίνης, Α. (2024). Παραγωγή και δομική μελέτη πρωτεϊνικών μακρομορίων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://hdl.handle.net/10889/28489>
- Κούτουλας, Δ. (υπό κατάθεση). Δομική και λειτουργική ανάλυση ικών πρωτεϊνών και φαρμακευτικών στόχων. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Παπαευθυμίου, Χ. (2024). Δομικές μελέτες φαρμακευτικών πρωτεϊνών & πεπτιδίων για την ανάπτυξη φαρμάκων με βελτιωμένες βιοχημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://hdl.handle.net/10889/28499>
- Σπηλιοπούλου, Μ. (2023). Δομική μελέτη βιολογικών μακρομορίων για τη δημιουργία φαρμακευτικών στόχων. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών. <https://hdl.handle.net/10889/25066>

Παράρτημα

Παράρτημα Ι. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της τρίτης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Δεκέμβριο 2021 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.30084(2)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 3 - ESRF//ID22 December 2021

Sample	pH _i	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco31	5.69	<i>P2₁(α)</i>	114.58(3)	334.23(8)	48.82(2)	90(0)	100.789(7)	90(0)	18.37(1)	9.8531	6.12002
		<i>C222₁</i>	60.298(2)	220.97(1)	228.611(9)	90(0)	90(0)	90(0)	30.460(3)		
rco32	5.85	<i>C222₁</i>	60.266(1)	220.903(6)	228.312(6)	90(0)	90(0)	90(0)	30.395(1)	8.9361	4.71827
rco33	5.94	<i>C222₁</i>	60.334(2)	220.960(8)	228.412(8)	90(0)	90(0)	90(0)	30.451(2)	8.6237	3.68429
rco34	5.98	<i>C222₁</i>	60.444(2)	221.55(1)	228.80(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.640(3)	15.4245	5.60705
rco35	6.04	<i>C222₁</i>	60.453(3)	221.43(2)	228.74(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.619(3)	15.9226	7.68106
rco36	6.11	<i>C222₁</i>	60.364(1)	220.979(6)	228.337(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.458(1)	10.7530	5.12292
rco37	6.17	<i>low quality data</i>									
rco38	6.30	<i>C222₁</i>	60.380(4)	220.87(2)	228.17(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.429(3)	10.7517	2.72956
		<i>C2</i>	102.68(2)	61.37(1)	63.40(2)	90(0)	116.970(4)	90(0)	3.560(1)		
rco39	6.45	<i>C222₁</i>	60.42969	220.883(9)	228.169(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.456(2)	10.9997	2.94716
rco310	6.61	<i>C222₁</i>	60.46725	220.84(1)	228.061(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.455(2)	11.6660	3.01578
rco311	6.73	<i>C222₁</i>	60.5424	220.817(9)	228.084(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.492(2)	11.5273	3.81666
rco312	6.81	<i>C222₁</i>	60.5638	220.83(1)	228.078(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.503(2)	11.2152	3.43784
rco313	6.98	<i>C2</i>	102.8994	61.227(1)	63.364(2)	90(0)	116.8701(4)	90(0)	3.5611(2)	9.4772	4.06390
rco314	7.09	<i>C2</i>	103.0554	61.2135(9)	63.389(2)	90(0)	116.8507(4)	90(0)	3.5677(1)	9.1395	3.70213

Παράρτημα ΙΙ. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της τέταρτης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Δεκέμβριο 2021 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.30084(2)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 4 - ESRF//ID22 December 2021

Sample	pH _i	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco41	5.56	<i>low quality data</i>									
rco42	5.72	<i>P2₁(α)</i>	113.84(2)	334.87(1)	49.074(8)	90(0)	101.185(5)	90(0)	18.352(4)	12.2163	17.18970
rco43	5.77	<i>P2₁(α)</i>	112.826(9)	331.19(1)	48.587(2)	90(0)	101.188(3)	90(0)	17.810(2)	16.8319	13.42381
		<i>C222₁</i>	60.206(7)	220.18(4)	227.87(4)	90(0)	90(0)	90(0)	30.207(8)		
rco44	5.86	<i>C222₁</i>	60.207(2)	220.43(1)	227.994(9)	90(0)	90(0)	90(0)	30.258(2)	11.0615	4.39217
rco45	5.93	<i>C222₁</i>	60.299(2)	220.554(7)	228.108(9)	90(0)	90(0)	90(0)	30.337(2)	9.8736	2.97590
rco46	6.01	<i>C222₁</i>	60.271(2)	220.494(9)	228.01(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.301(2)	10.6393	3.23617
rco47	6.1	<i>C222₁</i>	60.349(1)	220.608(5)	228.197(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.381(1)	10.2180	4.44304
rco48	6.22	<i>C222₁</i>	60.442(2)	220.752(8)	228.345(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.468(2)	10.7581	3.03126
rco49	6.35	<i>C222₁</i>	60.443(1)	220.649(6)	228.242(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.440(1)	11.1038	4.19980

rco410	6.54	<i>C222₁</i>	60.486(1)	220.603(6)	228.202(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.450(1)	10.3267	4.43995
rco411	6.65	<i>C222₁</i>	60.547(2)	220.53(1)	228.251(8)	90(0)	90(0)	90(0)	30.477(2)	11.0867	2.98309
rco412	6.78	<i>C222₁</i>	60.633(1)	220.374(7)	228.432(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.523(1)	7.6766	4.29296
rco413	6.91	<i>C222₁</i>	60.619(1)	220.666(8)	228.245(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.532(1)	10.4420	4.55216
rco414	7.04	<i>C222₁</i>	60.653(1)	220.576(7)	228.162(5)	90(0)	90(0)	90(0)	30.525(1)	6.5198	4.86189
rco415	7.18	<i>C222₁</i>	60.599(3)	220.68(1)	227.822(8)	90(0)	90(0)	90(0)	30.466(2)	15.1760	6.54537
rco416	7.31	<i>C222₁</i>	60.743(2)	220.63(1)	228.134(9)	90(0)	90(0)	90(0)	30.575(2)	9.5027	5.02517
rco417	7.45	<i>C222₁</i>	60.743(9)	220.63(4)	228.13(4)	90(0)	90(0)	90(0)	30.575(9)	9.4731	8.13669
		<i>C2</i>	101.63(2)	60.850(6)	69.19(1)	90(0)	116.767(4)	90(0)	3.434(1)		

Παράρτημα III. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της πέμπτης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Φεβρουάριο 2023 στον πειραματικό σταθμό MS-X04SA του SLS, με μήκος κύματος $\lambda=1.3043250(7)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 5 - SLS//MS-X04SA February 2023

Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco51	5.36	<i>P2_{1(a)}</i>	114.04(6)	335.22(8)	49.10(2)	90(0)	101.43(2)	90(0)	18.40(2)	0.3816	2.06866
rco52	5.40	<i>P2_{1(a)}</i>	113.8943(9)	335.102(2)	49.2268(5)	90(0)	101.5039(2)	90(0)	18.4106(3)	4.0813	13.22015
rco53	5.54	<i>P2_{1(a)}</i>	113.9921(6)	335.066(3)	49.2046(3)	90(0)	101.4568(1)	90(0)	18.4192(2)	4.5390	9.42577
rco54	5.79	<i>C222₁</i>	60.2710(2)	220.832(1)	228.2883(8)	90(0)	90(0)	90(0)	30.3846(2)	2.8862	21.96786
rco55	6.00	<i>C222₁</i>	60.311(4)	221.886(9)	228.054(9)	90(0)	90(0)	90(0)	30.520(3)	0.7589	9.33629
rco56	6.24	<i>C222₁</i>	60.36281(6)	220.8736(2)	228.0506(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.40497(5)	3.9047	8.46572
rco57	6.34	<i>C222₁</i>	60.39554(4)	220.9163(2)	227.9925(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.41959(4)	11.1415	33.01049
rco58	6.55	<i>C222₁</i>	60.3836(3)	220.861(1)	227.807(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.3812(3)	3.5291	9.06238
rco59	6.67	<i>C222₁</i>	60.50693(8)	220.8625(2)	228.0371(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.47422(6)	5.4694	28.11224
rco510	6.71	<i>C222₁</i>	60.5812(3)	220.883(1)	228.098(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.5227(3)	4.8140	18.93233
rco511	7.00	<i>C222₁</i>	60.6346(2)	220.8955(7)	228.0518(6)	90(0)	90(0)	90(0)	30.5451(2)	4.8972	35.39657
rco512	7.10	<i>C222₁</i>	60.6467(1)	220.9267(4)	228.0242(3)	90(0)	90(0)	90(0)	30.55175(9)	4.9995	20.63044

Παράρτημα IV. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της έκτης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Φεβρουάριο 2023 στον πειραματικό σταθμό MS-X04SA του SLS, με μήκος κύματος $\lambda=1.3043250(7)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 6 - SLS//MS-X04SA February 2023

Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco61	5.27	<i>P2_{1(a)}</i>	113.8986(7)	335.359(1)	48.9421(3)	90(0)	101.5307(1)	90(0)	18.3171(2)	3.2173	33.58259
rco62	5.50	<i>P2_{1(a)}</i>	113.993(6)	335.008(5)	49.279(3)	90(0)	101.416(2)	90(0)	18.447(2)	2.8647	9.66380
		<i>C222₁</i>	60.1091(5)	221.126(2)	228.160(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.3263(5)		
rco63	6.25	<i>C222₁</i>	60.3687(2)	221.1141(6)	228.0594(7)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4422(2)	4.5133	20.66794
rco64	6.56	<i>C222₁</i>	60.4301(3)	220.884(1)	227.851(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4136(3)	3.9721	11.57061
rco65	7.10	<i>C2</i>	102.7903(5)	61.2071(2)	63.4479(3)	90(0)	116.91840(7)	90(0)	3.55932(3)	0.9216	4.59631

		$P2_1(\beta)$	61.436(2)	61.827(3)	48.046(1)	90(0)	110.8630(5)	90(0)	1.7053(1)		
rco66	7.38	$P2_1(\beta)$	60.9603(2)	61.7337(2)	47.7357(1)	90(0)	110.28810(6)	90(0)	1.684990(9)	0.9985	2.66245

Παράρτημα V. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της έβδομης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2023 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.3007889(8)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 7 - ESRF//ID22 July 2023

Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco71	5.06										
rco72	5.15										
rco73	5.27										
rco74	5.37										
rco75	5.64	$P2_1(\alpha)$	114.018(1)	335.020(3)	49.2432(5)	90(0)	101.5143(2)	90(0)	18.4316(3)	10.6606	2.44055
		$C222_1$	60.232(1)	221.034(4)	228.390(4)	90(0)	90(0)	90(0)	30.406(1)		
rco76	5.75	$P2_1(\alpha)$	114.110(2)	335.12(3)	49.3078(8)	90(0)	101.4686(6)	90(0)	18.479(2)	13.3077	2.76412
		$C222_1$	60.2821(9)	221.09(1)	228.41(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.442(3)		
rco77	6.14	$C222_1$	60.3130(4)	220.989(1)	228.118(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4047(3)	8.8531	1.70356
rco78	6.40	$C222_1$	60.4175(4)	220.952(2)	228.027(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4401(4)	8.8398	1.76281
rco79	6.80	$C222_1$	60.5355(6)	220.902(2)	227.987(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4873(5)	7.8417	1.33314
rco710	7.15	$C222_1$	60.6368(8)	220.850(3)	227.825(3)	90(0)	90(0)	90(0)	30.5094(7)	8.7772	1.32675
rco711	7.25	$C222_1$	60.6847(1)	220.7138(4)	227.7493(4)	90(0)	90(0)	90(0)	30.5046(1)	17.4519	3.35691
		$P2_1(\beta)$	61.0878(2)	61.9528(2)	47.8152(1)	90(0)	110.29650(8)	90(0)	1.69724(1)		
rco712	7.35	$P2_1(\beta)$	61.1946(4)	61.8770(4)	47.8455(3)	90(0)	110.4986(1)	90(0)	1.69697(2)	4.2810	1.37550
rco713	7.40	$P2_1(\beta)$	61.2662(4)	61.9318(3)	47.8726(3)	90(0)	110.4376(1)	90(0)	1.70210(2)	4.4730	1.65070
rco714	7.54	$P2_1(\beta)$	61.2159(4)	61.8927(5)	47.8838(4)	90(0)	110.5160(1)	90(0)	1.69916(2)	4.9870	1.15750
rco715	7.60	$P2_1(\beta)$	61.2220(4)	61.9069(4)	47.9087(3)	90(0)	110.5102(1)	90(0)	1.70067(2)	4.5410	1.24040
rco716	7.64	$P2_1(\beta)$	61.2149(3)	61.9361(3)	47.9603(3)	90(0)	110.4790(1)	90(0)	1.70345(2)	4.5670	1.22440
rco717	7.75	$P2_1(\beta)$	61.2314(4)	61.9484(5)	47.9756(4)	90(0)	110.4297(1)	90(0)	1.70534(2)	4.7830	2.01940
rco718	7.80	$P2_1(\beta)$	61.1910(7)	61.9076(7)	47.9508(5)	90(0)	110.4215(2)	90(0)	1.70230(3)	5.2840	1.31770
rco719	7.91	$P2_1(\beta)$	61.1209(6)	61.8823(6)	47.9325(5)	90(0)	110.4521(2)	90(0)	1.69867(3)	4.7470	1.20290
rco720	7.96	$P2_1(\beta)$	61.096(2)	61.890(3)	47.909(2)	90(0)	110.3465(5)	90(0)	1.6985(1)	6.3478	1.13267

Παράρτημα VI. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της όγδοης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη ρεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2023 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.3007889(8)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 8 - ESRF//ID22 July 2023

Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco81	5.05	$P2_1(\gamma)$	87.5398(8)	69.7150(4)	47.6879(3)	90(0)	106.9742(1)	90(0)	2.78353(4)	5.6024	1.25552
rco82	5.10	$P2_1(\gamma)$	87.560(1)	69.710(1)	47.6875(6)	90(0)	106.9743(2)	90(0)	2.78396(7)	7.8824	1.16522
rco83	5.30	$P2_1(\gamma)$	87.6658(3)	69.7081(1)	47.6963(1)	90(0)	107.08240(6)	90(0)	2.78614(1)	13.0397	1.83807

rco84	5.32	$P2_1(\gamma)$	87.7094(2)	69.7053(1)	47.69432(9)	90(0)	107.11200(4)	90(0)	2.786854(9)	9.8867	1.74219
rco85	5.35	$P2_1(\gamma)$	87.862(3)	68.64(1)	47.817(2)	90(0)	107.0415(8)	90(0)	2.7570(5)	11.7418	1.90254
		$P2_1(\alpha)$	114.256(4)	335.59(1)	49.030(2)	90(0)	102.0706(8)	90(0)	18.384(1)		
rco86	5.64	$P2_1(\alpha)$	113.662(6)	332.14(2)	49.475(2)	90(0)	101.493(1)	90(0)	18.303(1)	22.1621	1.42005
		$C222_1$	60.381(1)	221.018(4)	228.533(4)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4981(9)		
rco87	5.76	$C222_1$	60.3094(4)	220.960(1)	228.225(2)	90(0)	90(0)	90(0)	30.4131(3)	17.1134	1.36288
rco88	6.11	$C222_1$	60.404(3)	221.087(9)	228.18(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.473(2)	11.1798	1.59433
		$C2$	102.58(3)	61.39(2)	63.30(2)	90(0)	116.931(6)	90(0)	3.554(2)		
rco89	6.45	$C222_1$	60.4774(3)	221.1153(9)	228.085(1)	90(0)	90(0)	90(0)	30.5006(3)	10.1122	1.74920
		$C2$	102.723(5)	61.306(2)	63.483(3)	90(0)	116.9013(6)	90(0)	3.5653(2)		
rco810	6.77	$C2$	102.7626(7)	61.2180(2)	63.4663(4)	90(0)	116.86740(9)	90(0)	3.56163(4)	8.1720	1.17536
rco811	7.13	$C2$	103.001(2)	61.182(2)	63.475(1)	90(0)	116.8003(3)	90(0)	3.5704(1)	7.3564	1.43154
		$P2_1(\beta)$	61.655(3)	61.925(2)	47.817(2)	90(0)	110.7750(7)	90(0)	1.7069(1)		
rco812	7.29	$P2_1(\beta)$	61.5954(5)	61.9564(5)	47.8302(4)	90(0)	110.6078(2)	90(0)	1.70851(2)	8.0570	1.22471
rco813	7.54	$P2_1(\beta)$	61.3809(6)	61.9276(5)	47.8949(5)	90(0)	110.6282(3)	90(0)	1.70384(3)	7.7002	1.28778
rco814	7.80	$P2_1(\beta)$	61.249(2)	61.968(1)	47.938(1)	90(0)	110.3752(6)	90(0)	1.70562(7)	6.5831	1.15759
rco815	7.92	<i>amorphous</i>									

Παράρτημα VII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της ένατης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδότη ρεσορσινόλης. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2025 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.07817(3)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & resorcinol co-crystallization - Series 9 - ESRF/ID22 July 2025

Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
rco91	5.21	$P2_1(\gamma)$	87.552(5)	69.669(3)	48.191(3)	90(0)	107.190(1)	90(0)	2.8085(3)	9.8825	2.50956
		$P2_1(\alpha)$	113.012(6)	337.43(2)	48.689(2)	90(0)	100.9045(9)	90(0)	18.232(2)		
rco92	5.28	$P2_1(\gamma)$	87.48(1)	69.680(3)	48.153(6)	90(0)	106.996(3)	90(0)	2.8071(5)	8.9972	2.61653
		$P2_1(\alpha)$	112.45(1)	334.87(3)	49.180(4)	90(0)	100.907(1)	90(0)	18.184(3)		
rco93	5.34	$P2_1(\gamma)$	87.341(9)	61.263(9)	47.469(4)	90(0)	105.363(8)	90(0)	2.4492(5)	13.7242	2.53497
		$P2_1(\alpha)$	112.922(6)	335.20(2)	49.224(3)	90(0)	100.887(1)	90(0)	18.296(2)		
rco94	5.46	$P2_1(\alpha)$	112.29(5)	334.99(2)	49.20(2)	90(0)	100.823(9)	90(0)	18.176(2)	16.7975	1.69876
rco95	5.50	<i>low quality data</i>									
rco96	5.53	<i>low quality data</i>									
rco97	5.65	<i>low quality data</i>									
rco98	5.70	<i>low quality data</i>									
rco99	5.80	<i>low quality data</i>									
rco910	5.87	<i>low quality data</i>									
rco911	5.97	<i>low quality data</i>									
rco912	6.24	<i>low quality data</i>									
rco913	6.41	$C2$	102.775(3)	61.278(1)	63.510(2)	90(0)	116.9259(4)	90(0)	3.5662(1)	10.4184	1.60939
rco914	6.57	$C2$	102.706(3)	61.082(1)	63.535(2)	90(0)	116.9799(4)	90(0)	3.5520(2)	7.0658	1.40034
rco915	6.76	$C2$	102.781(3)	61.1667(9)	63.505(1)	90(0)	116.8721(4)	90(0)	3.5613(1)	7.4078	1.27297
rco916	6.93	$C2$	102.814(6)	61.100(2)	63.499(3)	90(0)	116.8438(8)	90(0)	3.5591(3)	8.8049	1.40200
		$P2_1(\beta)$	61.65(1)	61.823(9)	47.667(8)	90(0)	110.785(3)	90(0)	1.6986(5)		
rco917	7.16	$C2$	103.003(4)	61.127(1)	63.497(2)	90(0)	116.7878(6)	90(0)	3.5689(2)	7.0115	1.71076
		$P2_1(\beta)$	61.486(1)	61.916(1)	47.7973(9)	90(0)	110.7673(4)	90(0)	1.70141(6)		

rco918	7.33	$P2_1(\beta)$	61.3948(4)	61.9321(3)	47.8467(3)	90(0)	110.7729(1)	90(0)	1.70101(2)	7.1529	1.44168
rco919	7.55	$P2_1(\beta)$	61.2651(7)	61.9046(4)	47.8679(6)	90(0)	110.7028(2)	90(0)	1.69820(3)	8.0017	1.36200
rco920	7.77	$P2_1(\beta)$	61.237(9)	61.978(6)	47.924(7)	90(0)	110.453(3)	90(0)	1.7042(4)	5.6839	1.22821

Παράρτημα VIII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας για όλα τα δείγματα της πέμπτης σειράς συγκρυστάλλωσης ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2025 στον πειραματικό σταθμό ID22 του ESRF, με μήκος κύματος $\lambda=1.07817(3)$ Å, σε θερμοκρασία δωματίου.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol co-crystallization - Series 5 - ESRF/ID22 July 2025											
Sample	pH _r	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
chl51	5.26	$P2_1(\gamma)$	87.659(3)	69.924(1)	47.948(1)	90(0)	106.7493(6)	90(0)	2.8143(1)	3.1875	1.50984
chl52	5.41	$P2_1(\gamma)$	87.785(2)	69.905(1)	47.9626(7)	90(0)	106.8570(3)	90(0)	2.81681(7)	4.4692	1.674
chl53	5.51	$P2_1(\gamma)$	87.865(1)	69.9094(4)	47.9750(4)	90(0)	106.9380(2)	90(0)	2.81908(4)	6.2118	2.19045
		$P2_1(\delta)$	48.541(2)	59.669(2)	47.747(2)	90(0)	94.219(1)	90(0)	1.37919(9)		
chl54	5.71	$P2_1(\delta)$	48.903(1)	59.945(2)	47.921(2)	90(0)	94.3255(8)	90(0)	1.40081(7)	8.7919	3.12621
		$C2$	102.423(2)	61.804(1)	63.873(1)	90(0)	116.3320(4)	90(0)	3.6237(1)		
chl55	5.86	$P2_1(\delta)$	49.030(2)	60.049(2)	47.966(2)	90(0)	94.2014(8)	90(0)	1.40841(1)	9.4112	3.29172
		$C2$	102.439(4)	61.826(1)	63.912(1)	90(0)	116.2679(6)	90(0)	3.6298(2)		
chl56	5.98	$P2_1(\delta)$	49.037(2)	60.032(2)	47.989(2)	90(0)	94.0001(9)	90(0)	1.40925(9)	12.2583	3.00081
		$C2$	102.457(4)	61.835(1)	63.886(1)	90(0)	116.2514(5)	90(0)	3.6300(2)		
chl57	6.12	$P2_1(\delta)$	48.976(1)	59.987(1)	47.9635(6)	90(0)	94.0368(4)	90(0)	1.40562(4)	9.2345	2.67991
		$C2$	102.323(6)	61.649(2)	63.862(2)	90(0)	116.2604(9)	90(0)	3.6127(3)		
chl58	6.24	$P2_1(\delta)$	48.961(2)	60.033(2)	47.983(2)	90(0)	94.049(1)	90(0)	1.4068(1)	8.3539	2.85798
		$C2$	102.161(4)	61.738(1)	63.806(2)	90(0)	116.1146(6)	90(0)	3.6136(2)		
chl59	6.40	$P2_1(\delta)$	48.944(2)	60.021(2)	48.070(2)	90(0)	94.085(1)	90(0)	1.4086(1)	9.3461	2.70154
		$C2$	109.348(5)	61.643(2)	63.816(2)	90(0)	116.2376(8)	90(0)	3.6113(2)		
chl510	6.50	$C2$	102.374(4)	61.672(2)	63.786(2)	90(0)	116.2282(7)	90(0)	3.6125(2)	12.4524	2.22853
chl511	6.59	$C2$	102.339(3)	61.645(1)	63.727(2)	90(0)	116.1806(5)	90(0)	3.6079(2)	14.9524	2.94568
chl512	6.78	$C2$	102.270(6)	61.591(2)	63.699(3)	90(0)	116.064(1)	90(0)	3.6043(3)	7.9116	2.43752
		$P2_1(\beta)$	62.419(6)	61.959(4)	47.752(5)	90(0)	112.071(2)	90(0)	1.7114(3)		
chl513	6.85	$C2$	102.213(7)	61.522(3)	63.679(3)	90(0)	116.001(1)	90(0)	3.5991(3)	6.1468	2.05831
		$P2_1(\beta)$	62.430(3)	61.864(3)	47.806(2)	90(0)	112.124(1)	90(0)	1.7104(1)		
chl514	6.99	$P2_1(\beta)$	62.215(1)	61.895(1)	47.810(1)	90(0)	111.8269(4)	90(0)	1.70907(6)	6.9561	1.53918
chl515	7.10	$P2_1(\beta)$	61.637(2)	62.057(1)	47.871(2)	90(0)	111.2068(7)	90(0)	1.7071(1)	6.0962	1.27686
chl516	7.22	$P2_1(\beta)$	61.166(3)	62.116(2)	47.913(2)	90(0)	110.8021(9)	90(0)	1.7017(1)	5.1307	1.25264
chl517	7.37	$P2_1(\beta)$	61.003(3)	62.164(3)	47.928(3)	90(0)	110.594(1)	90(0)	1.7014(1)	5.6126	1.24978
chl518	7.49	$P2_1(\beta)$	60.865(4)	62.207(3)	47.987(3)	90(0)	110.429(1)	90(0)	1.7026(2)	5.3856	1.25616
chl519	7.66	$P2_1(\beta)$	60.771(4)	62.234(3)	48.023(3)	90(0)	110.330(1)	90(0)	1.7031(2)	5.9368	1.23773
chl520	7.78	$P2_1(\beta)$	60.735(5)	62.262(4)	48.045(4)	90(0)	110.287(2)	90(0)	1.7041(2)	5.7912	1.21073

Παράρτημα IX. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον πρώτο κύκλο της πρώτης σειράς μεταβολών pH. Η συλλογή

δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 1 // 1st cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P2₁(β)</i>	61.768(8)	62.490(5)	48.279(5)	110.935(3)	1.7405(3)	6.8985	5.05106
90		61.62(1)	62.394(9)	48.299(8)	110.801(3)	1.7360(5)	4.4382	3.30913
85		61.523(6)	62.294(8)	48.402(7)	110.704(2)	1.7352(4)	5.0868	3.66805
80		61.43(3)	62.21(2)	48.50(3)	110.60(1)	1.735(1)	3.6297	2.62378
75		61.31(6)	62.16(4)	48.60(4)	110.52(2)	1.735(2)	3.1272	2.20822
80		61.44(7)	62.21(5)	48.51(4)	110.57(1)	1.736(3)	3.8993	2.76496
85		61.55(3)	62.32(2)	48.42(3)	110.66(1)	1.738(2)	4.7242	3.25313
90		61.65(2)	62.42(2)	48.32(2)	110.76(1)	1.739(1)	5.2435	3.58369
95		61.75(4)	62.52(4)	48.22(4)	110.86(1)	1.740(2)	5.5445	3.65390

Παράρτημα X. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον δεύτερο κύκλο της πρώτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 1 // 2nd cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P2₁(β)</i>	61.75(5)	62.52(5)	48.22(3)	110.86(1)	1.740(2)	4.3861	2.98526
90		61.65(4)	62.42(4)	48.32(3)	110.76(1)	1.739(2)	4.3896	3.00510
85		61.53(7)	62.31(7)	48.43(8)	110.68(3)	1.737(4)	3.6824	2.57369
80		61.42(2)	62.23(2)	48.54(2)	110.589(8)	1.737(1)	3.9951	2.82328
75		61.3(1)	62.1(1)	48.63(7)	110.47(2)	1.736(5)	3.5553	2.52769
80		61.43(2)	62.21(2)	48.56(2)	110.613(9)	1.737(1)	4.2316	3.04870
85		61.52(4)	62.30(2)	48.47(2)	110.671(8)	1.738(1)	3.3607	2.47493
90		61.61(2)	62.42(1)	48.35(2)	110.773(6)	1.7386(9)	4.0565	2.84648
95		61.72(2)	62.52(2)	48.26(1)	110.888(5)	1.7399(8)	4.5299	3.05196

Παράρτημα XI. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον τρίτο κύκλο της πρώτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 1 // 3rd cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P2₁(β)</i>	61.74(2)	62.52(1)	48.27(1)	110.908(5)	1.7405(7)	4.5152	3.08607
90		61.64(2)	62.42(1)	48.37(1)	110.814(6)	1.7397(9)	4.6710	3.34413
85		61.56(2)	62.31(2)	48.48(2)	110.743(6)	1.739(1)	2.9475	2.16939
80		61.46(3)	62.19(2)	48.57(3)	110.644(9)	1.738(1)	4.2012	2.91388
75		61.36(3)	62.09(3)	48.67(2)	110.534(9)	1.737(1)	3.2577	2.34204
80		61.45(3)	62.20(3)	48.57(2)	110.627(9)	1.737(1)	3.7935	2.73606

85	61.50(4)	62.28(4)	48.54(3)	110.75(1)	1.738(2)	4.9451	3.59918
90	61.60(8)	62.4(2)	48.4(1)	110.85(2)	1.739(7)	3.6363	2.56430
95	61.7(1)	62.5(2)	48.34(9)	110.95(4)	1.740(7)	4.6513	3.34287

Παράρτημα XII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον τέταρτο κύκλο της πρώτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 1 // 4th cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	$V (\times 10^5 \text{ \AA}^3)$	R_{wp} (%)	χ^2
95	$P2_1(\beta)$	61.70(5)	62.50(5)	48.33(4)	110.92(2)	1.741(2)	5.4860	3.44972
90		61.60(8)	62.40(7)	48.43(7)	110.82(3)	1.740(4)	4.3438	2.66052
85		61.5(3)	62.3(2)	48.5(1)	110.72(5)	1.74(1)	3.5654	2.20743
80		61.4(2)	62.2(2)	48.6(1)	110.63(4)	1.738(7)	3.8848	2.34036
75		61.3(2)	62.1(1)	48.73(9)	110.53(4)	1.737(7)	3.8202	2.35066
70		61.2(1)	62.0(1)	48.83(7)	110.42(3)	1.736(5)	3.1665	1.91186
60		61.15(8)	61.94(7)	48.88(7)	110.37(3)	1.736(4)	3.4367	2.04959
50		61.10(5)	61.9(1)	48.93(8)	110.32(3)	1.735(4)	3.2879	2.01647
60		61.2(2)	61.94(5)	48.88(9)	110.37(3)	1.736(6)	3.9976	2.43203
70		61.20(8)	61.99(5)	48.83(5)	110.42(1)	1.736(3)	3.4819	2.07915
75		61.30(5)	62.09(3)	48.73(2)	110.52(1)	1.737(2)	3.5370	2.13584
80		61.40(3)	62.19(2)	48.63(2)	110.619(5)	1.738(1)	3.4253	2.08222
85		61.50(4)	62.29(3)	48.53(2)	110.722(7)	1.739(1)	3.5184	2.04213
90		61.60(6)	62.39(3)	48.43(5)	110.82(2)	1.740(3)	3.7574	2.27033
95		61.70(1)	62.49(1)	48.334(9)	110.924(5)	1.7407(6)	6.0538	3.45148

Παράρτημα XIII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδέτη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον πρώτο κύκλο της δεύτερης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 2 // 1st cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	$V (\times 10^5 \text{ \AA}^3)$	R_{wp} (%)	χ^2
95	$P2_1(\beta)$	61.79(2)	62.51(2)	48.00(1)	110.555(6)	1.7361(8)	4.2316	2.70875
90		61.75(2)	62.48(2)	48.03(2)	110.483(7)	1.736(1)	4.8170	1.99750
85		61.68(1)	62.44(2)	48.07(1)	110.397(4)	1.7353(7)	4.9472	2.03587
80		61.63(2)	62.39(1)	48.10(1)	110.354(4)	1.7344(7)	4.5851	1.89015
75		61.59(3)	62.35(4)	48.12(2)	110.286(7)	1.733(2)	3.9481	1.55923
80		61.63(5)	62.37(6)	48.10(3)	110.36(1)	1.733(2)	4.4135	1.74063
85		61.66(3)	62.42(4)	48.06(1)	110.401(8)	1.734(1)	4.6937	1.88296
90		61.72(4)	62.47(5)	48.02(2)	110.459(9)	1.735(2)	5.0596	2.01560
95		61.80(4)	62.52(4)	48.00(3)	110.54(1)	1.737(2)	5.2927	2.10323

Παράρτημα XIV. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος ανθρώπινης ινσουλίνης παρουσία του προσδότη 4-χλωρορεσορσινόλη για τον δεύτερο κύκλο της δεύτερης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Human Insulin & 4-chlororesorcinol Relative Humidity variations - Series 2 // 2nd cycle								
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P2</i> ₁ (β)	61.81(2)	62.50(3)	48.07(2)	110.536(5)	1.739(1)	4.3893	1.78462
85		61.670(9)	62.421(9)	48.101(8)	110.450(3)	1.7349(4)	4.4493	1.85039
75		61.60(1)	62.36(1)	48.14(1)	110.310(6)	1.7342(8)	4.5477	1.84446
60		61.42(7)	62.27(6)	48.21(3)	110.28(2)	1.730(3)	3.9934	1.58621
50		61.3(2)	62.2(3)	48.2(1)	110.27(7)	1.73(1)	3.2872	2.52634
60		61.4(1)	62.3(2)	48.2(1)	110.30(4)	1.729(8)	3.8669	1.53432
75		61.6(1)	62.4(1)	48.05(6)	110.36(3)	1.731(5)	4.1514	1.64917
85		61.68(5)	62.43(7)	48.00(5)	110.33(2)	1.733(3)	3.8534	1.53977
95		61.79(3)	62.51(5)	47.96(3)	110.42(1)	1.736(2)	4.2843	1.72637

Παράρτημα XV. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον πρώτο κύκλο της τρίτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 3 // 1st cycle						
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P4</i> ₃ <i>2</i> ₁ <i>2</i>	79.15(1)	38.29(1)	2.3990(8)	4.6922	1.66648
90		79.20(9)	38.290(8)	2.402(3)	4.6171	1.48699
95		79.17(3)	38.34(2)	2.403(1)	4.4226	1.41247
85		79.15(4)	38.39(3)	2.405(2)	4.8218	1.76040
90		79.10(3)	38.42(2)	2.404(2)	4.6170	1.65814
80		78.84(2)	38.63(1)	2.401(1)	4.3674	1.61013
85		78.80(2)	38.69(1)	2.402(1)	4.1101	1.45628
73		78.71(3)	38.67(1)	2.396(1)	3.8493	1.42441
80		78.66(5)	38.70(2)	2.395(2)	4.1070	1.60905
73		78.64(3)	38.61(2)	2.388(1)	4.1253	1.58010
85		78.68(2)	38.69(1)	2.395(1)	4.1883	1.52854
80		78.70(3)	38.70(1)	2.397(1)	4.0910	1.51102
90		78.81(3)	38.57(2)	2.395(1)	4.2562	1.63380
85		78.79(3)	38.59(1)	2.396(1)	4.2282	1.61456
95		78.99(1)	38.431(8)	2.3978(6)	4.2153	1.41810
90		79.04(3)	38.40(2)	2.399(1)	4.5488	1.58947
95		79.05(5)	38.39(2)	2.399(2)	4.5037	1.61434

Παράρτημα XVI. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον δεύτερο κύκλο της τρίτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό

περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 3 // 2nd cycle

Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P4₃2₁2</i>	79.07(1)	38.290(6)	2.3941(5)	4.1711	1.42695
85		79.00(1)	38.37(1)	2.3948(7)	4.1399	1.56918
90		78.98(2)	38.38(1)	2.394(1)	4.3128	1.65149
80		78.95(3)	38.38(2)	2.393(1)	4.3582	1.65132
95		78.94(3)	38.44(1)	2.396(1)	4.2745	1.59539
90		78.971(8)	38.395(6)	2.3945(4)	4.2047	1.45635
95		79.05(3)	38.38(1)	2.399(1)	4.5714	1.72516
85		78.90(2)	38.43(1)	2.392(1)	4.3151	1.67248
90		78.90(3)	38.45(1)	2.394(1)	4.2726	1.65889
80		78.70(1)	38.667(6)	2.3952(5)	3.7801	1.13820
85		78.65(2)	38.65(1)	2.391(1)	4.1294	1.67941
73		78.52(2)	38.56(1)	2.378(1)	4.0077	1.66624
85		78.67(2)	38.66(1)	2.393(1)	4.0863	1.67106
73		78.56(2)	38.57(1)	2.380(1)	4.0332	1.64696
90		78.70(2)	38.58(1)	2.390(1)	4.3761	1.76322
85		78.76(2)	38.59(1)	2.3940(9)	4.2848	1.76667
95		78.96(2)	38.43(1)	2.396(1)	4.4942	1.70760

Παράρτημα XVII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον πρώτο κύκλο της τέταρτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 4 // 1st cycle

Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
73	<i>P4₃2₁2</i>	78.689(8)	38.366(8)	2.3756(6)	4.6878	1.64122
80		78.56(2)	38.65(1)	2.3853(8)	4.2675	1.38859
73		78.39(3)	38.88(2)	2.389(1)	4.5020	1.48303
85		78.48(1)	38.549(8)	2.3743(6)	4.2990	1.36077
80		78.48(2)	38.65(1)	2.3809(9)	4.4777	1.43076
90		78.80(2)	38.375(8)	2.3829(8)	4.4771	1.40429
85		78.85(2)	38.401(8)	2.3877(7)	4.5000	1.42332
95		79.04(2)	38.23(1)	2.3883(8)	4.4595	1.41248
90		78.99(1)	38.191(9)	2.3831(7)	4.4059	1.39635
95		79.01(2)	38.24(1)	2.3868(9)	4.8287	1.55227
85		78.98(2)	38.20(1)	2.383(1)	4.4527	1.45770
90		79.05(1)	38.25(1)	2.3900(8)	4.9584	1.65050
80		78.85(2)	38.41(1)	2.3883(8)	4.4019	1.39213

85	78.70(1)	38.459(8)	2.3823(7)	4.4997	1.40137
73	78.49(3)	38.81(2)	2.391(1)	4.8288	1.70733
80	78.43(2)	38.67(1)	2.3788(8)	4.5599	1.42484
73	78.43(2)	38.83(1)	2.389(1)	4.6479	1.47443

Παράρτημα XVIII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον δεύτερο κύκλο της τέταρτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 4 // 2nd cycle

Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
73	<i>P4₃2₁2</i>	78.40(3)	38.83(1)	2.387(1)	4.2767	1.40871
85		78.59(2)	38.634(9)	2.3862(7)	4.4699	1.40950
80		78.56(2)	38.63(1)	2.3843(9)	4.6067	1.43978
90		78.89(1)	38.374(7)	2.3881(6)	4.4178	1.37932
73		78.390(9)	38.51(1)	2.3665(9)	4.8518	1.60347
80		78.38(3)	38.64(2)	2.374(1)	4.5201	1.44645
73		78.37(3)	38.85(1)	2.386(1)	4.4594	1.44560
85		78.54(2)	38.54(1)	2.3774(9)	4.3861	1.36060
80		78.44(2)	38.52(1)	2.370(1)	4.7487	1.47128
90		78.89(2)	38.35(1)	2.3868(8)	4.6834	1.45573
85		78.85(2)	38.35(1)	2.3868(9)	4.5319	1.47785
95		79.02(2)	38.204(9)	2.3852(8)	4.5674	1.39975
85		78.96(2)	38.22(1)	2.383(1)	4.2413	1.36025
95		79.01(2)	38.21(1)	2.3852(9)	4.2895	1.31983
80		78.95(2)	38.25(1)	2.384(1)	4.4472	1.44023
85		78.77(2)	38.36(1)	2.3799(9)	4.4244	1.38333
73		78.42(2)	38.76(1)	2.3837(9)	4.2624	1.37929

Παράρτημα XIX. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον πρώτο κύκλο της πέμπτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 5 // 1st cycle

Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P4₃2₁2</i>	79.050(5)	38.207(5)	2.3875(3)	5.2100	1.65237
90		79.047(9)	38.171(9)	2.3839(6)	5.7607	1.79434
95		79.031(5)	38.213(5)	2.3867(3)	5.3800	1.69273
85		78.977(8)	38.21(1)	2.3830(7)	5.6653	1.64568
90		78.914(8)	38.23(1)	2.3810(6)	5.8887	1.80844
80		78.838(5)	38.626(7)	2.4008(4)	5.9354	1.82989
85		78.800(6)	38.690(7)	2.4024(5)	5.8072	1.77932

73	78.32(1)	38.95(1)	2.3892(8)	5.2101	1.61711
80	78.38(1)	38.886(9)	2.3890(7)	5.1406	1.55543
73	78.639(5)	38.610(5)	2.3877(3)	6.3902	1.96075
85	78.562(7)	38.489(8)	2.3755(6)	5.5303	1.70618
80	78.501(7)	38.65(1)	2.3817(7)	5.3177	1.63453
90	78.853(9)	38.30(1)	2.3814(8)	5.7111	1.73431
85	78.804(8)	38.327(8)	2.3802(5)	5.4101	1.78888
95	78.946(8)	38.20(1)	2.3805(7)	5.8630	1.39663
90	78.921(7)	38.191(7)	2.3788(5)	6.0257	1.85508
95	78.949(9)	38.18(1)	2.3795(8)	5.7165	1.67873

Παράρτημα XX. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον δεύτερο κύκλο της πέμπτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 5 // 2nd cycle						
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
95	<i>P4₃2₁2</i>	78.982(6)	38.171(6)	2.3811(4)	5.2056	1.55393
85		79.006(6)	38.199(6)	2.3843(4)	5.0010	1.55107
90		78.981(6)	38.219(6)	2.3841(4)	5.1745	1.59004
80		78.948(6)	38.381(6)	2.3922(4)	5.5904	1.66982
95		78.969(7)	38.196(9)	2.3819(6)	5.9767	2.02704
90		78.986(8)	38.19(1)	2.3828(7)	4.9614	1.50711
95		78.996(5)	38.199(5)	2.3838(4)	5.1318	1.55586
85		78.944(8)	38.26(1)	2.3844(6)	5.0121	1.55039
90		78.953(4)	38.212(5)	2.3820(3)	5.3971	1.74022
80		78.660(7)	38.488(7)	2.3814(5)	5.0459	1.50605
85		78.682(6)	38.459(8)	2.3809(5)	5.4165	1.66672
73		78.493(5)	38.575(5)	2.377(3)	6.6389	1.98541
85		78.536(5)	38.496(4)	2.3744(3)	6.0104	1.55976
73		78.534(6)	38.575(6)	2.3792(4)	5.9351	1.77506
90		78.755(9)	38.368(9)	2.3797(6)	5.7065	1.73290
85		78.78(2)	38.38(2)	2.382(2)	8.0095	1.87444
95		78.85(1)	38.25(1)	2.3781(8)	5.8970	1.75363

Παράρτημα XXI. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον τρίτο κύκλο της πέμπτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 5 // 3rd cycle						
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
73		78.06(3)	38.80(4)	2.364(3)	4.8211	1.60099

80	$P4_32_12$	78.279(7)	38.60(2)	2.365(1)	5.2691	1.45279
73		78.29(3)	38.82(3)	2.380(2)	5.2662	1.72836
85		78.357(8)	38.54(1)	2.3664(9)	5.3627	1.60534
80		78.327(7)	38.655(6)	2.3715(4)	5.6511	1.72300
90		78.774(5)	38.366(5)	2.3808(3)	5.0855	1.56058
85		78.817(4)	38.335(4)	2.3814(3)	4.7968	1.46461
95		78.971(7)	38.204(7)	2.3826(5)	5.4233	1.69233
90		78.943(7)	38.203(7)	2.3808(5)	5.2649	1.63746
95		78.960(7)	38.20(7)	2.3816(5)	5.2181	1.62378
85		78.931(7)	38.223(7)	2.3814(5)	4.9814	1.60041
90		78.909(7)	38.237(9)	2.3809(6)	5.0232	1.59151
80		78.784(5)	38.391(4)	2.3829(3)	5.0995	1.56899
85		78.715(6)	38.449(6)	2.3823(4)	4.8752	1.48104
73		78.45(1)	38.84(1)	2.3901(8)	5.3200	1.65769
80		78.430(5)	38.672(4)	2.3788(3)	5.1745	1.57018
73		78.428(5)	38.832(5)	2.3886(3)	5.0534	1.53485

Παράρτημα XXII. Βελτιστοποιημένες πλεγματικές σταθερές και όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας του δείγματος τετραγωνικής HEWL για τον τέταρτο κύκλο της πέμπτης σειράς μεταβολών rH. Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστηριακό περιθλασίμετρο X'Pert Pro αξιοποιώντας τον θάλαμο υγρασίας και θερμοκρασίας MHS-trans, με μήκος κύματος $\lambda=1.540585(3)$ Å, σε σταθερή θερμοκρασία 21°C.

Tetragonal HEWL - Series 5 // 4th cycle						
Relative Humidity (%)	Space Group	a (Å)	c (Å)	V ($\times 10^5$ Å ³)	R _{wp} (%)	χ^2
73	$P4_32_12$	78.314(4)	39.031(3)	2.3938(2)	5.2137	1.58658
85		78.522(5)	38.699(4)	2.3860(3)	5.2935	1.60179
80		78.491(5)	38.665(4)	2.3821(3)	5.1455	1.55390
90		78.559(5)	38.541(3)	2.3786(2)	5.6920	1.71287
73		78.335(8)	38.967(7)	2.3912(5)	4.7564	1.43389
80		78.410(5)	38.775(4)	2.3839(3)	5.1743	1.57553
73		78.325(4)	38.975(3)	2.3910(2)	5.0439	1.52541
85		78.585(3)	38.478(2)	2.3762(2)	4.9410	1.48799
80		78.518(8)	38.56(1)	2.3774(7)	5.0556	1.38338
90		78.796(4)	38.310(3)	2.3786(2)	4.9849	1.48141
85		78.766(6)	38.322(5)	2.3775(4)	5.1289	1.54976
95		78.824(4)	38.297(4)	2.3794(3)	5.0266	1.49578
85		78.826(8)	38.288(8)	2.3790(6)	4.8191	1.46596
95		78.824(4)	38.257(3)	2.3770(3)	5.5376	1.64104
80		78.837(5)	38.324(5)	2.3820(3)	4.7815	1.45591
85		78.747(5)	38.369(5)	2.3792(3)	5.2372	1.56912
73		78.420(4)	38.760(4)	2.3836(2)	4.9954	1.49505