

Üveitli Behçet Hastalarında Atak-Remisyon Dönemi NK İzolasyon Saflıklarının Karşılaştırılması

Evaluation of Purity Rates of NK cells Isolated from Behcet's Disease Patients in Relapse and Remission Periods

Umut Can Küçüksezer¹, İlhan Tahralı¹, Sema Bilgiç-Gazioğlu¹,
Esin Aktaş-Çetin¹, Ahmet Gül², İlknur Tuğal-Tutkun³, Günnur Deniz¹

¹İmmünoloji AD, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
²Romatoloji BD, İç Hastalıkları AD, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
³Göz Hastalıkları AD, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Doğal öldürücü hücreler, doğal immünitede yer alan, sitotoksik etkileriyle viral enfeksiyonlar ve tümörlerle mücadele eden, ayrıca sitokin salınımları ile de immün yanıtları şekillendirme kapasitesine sahip olan, büyük granüllü lenfositlerdir. Farklı alt grupları tanımlanan NK hücrelerinin pek çok hastalıkla olan başlatıcı veya düzenleyici ilişkileri günden güne açığa çıkmaktadır. Araştırmaların bazıları saf NK hücrelerinin incelenmesini gerektirmektedir. Bu çalışmada NK hücrelerinin manyetik saflaştırılmaları sonucunda elde edilen saflık dereceleri incelenmiştir. Bulgular, hücrelerin yüksek saflıkta saflaştırılabildiği, saflık açısından hasta grupları ile sağlıklılar arasında fark bulunmadığını göstermektedir. Behçet hastalığı atak ve remisyon dönemlerinde tekrarlı saflaştırmalarda ise bireyler arası farklar olduğu, ancak bireysel farklılıkların hem atak hem remisyon dönemlerinde korunduğunu, iki dönemde bireylerin saflık oranlarının farklı olmadığı gözlenmiştir. Oluşan bu farkın, antikor özgüllüğünün bireyden bireye değişmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Geliştirilecek yeni saflaştırma yöntemleri ile bireyler arası farkların ortadan kaldırılacağı, ayrıca zaten yüksek olan saflık oranlarının daha da yükseltilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Behçet hastalığı, üveit, NK hücreleri, atak, remisyon

ABSTRACT

Natural Killer (NK) cells are members of innate immunity who defend against viral infections and tumors with their cytotoxic activity and also regulate immune responses with their cytokine secretions. Different sub-groups of NK cells defined are shown to have initiating or limiting effects on pathogenesis of various diseases. According to research requirements, it is essential to investigate pure NK cells in some experimental setups. This study investigated purity rates of NK cells, isolated by a magnetic activated cell sorting method, in relapse and remission phases of follow-up Behcet's disease patients, as well as healthy controls. Our findings show that NK cells were isolated with a high purity rate both at patients and healthy controls, with no significant difference. In repeated purification of follow-up patients in relapse and remission periods, there were no differences of purity in between two periods, but there were differences between each individual patient. This difference between each individual may arise from different binding specificities of monoclonal antibodies, which vary between each individual. New developments in this area may diminish variabilities and provide increased purity rates.

Keywords: Behçet's disease, uveitis, NK cells, attack, remission

GİRİŞ

Doğal öldürücü hücreler (Natural killer, NK), doğal immün sistemin elemanları olup kemik iliği kökenli, büyük granüllü lenfositlerdir. NK hücreleri periferik kan lenfositlerinin %5-15'ini oluşturur ve karaciğer, peritoneal kavite, plasenta gibi periferik dokularda bulunurlar (1). NK hücreleri CD3⁻CD16⁺CD56⁺ olarak tanımlanırlar. Bu hücreler, patojenlere karşı erken konak savunmasını sağlayan tümör ve virüsle enfekte hücreleri tanıyarak öldürme ve immünoregülatör sitokinlerin üretimi üzere iki ana fonksiyona aracılık ederler (2-4). Doğal ve edinsel immün yanıtları düzenleyen çeşitli sitokinler ve kemokinler (IFN- γ , GM-CSF ve TNF- α) salgırlar (5). Th1 ve Th2 hücrelerine benzer şekilde insan NK hücre alt gruplarının da NK1 ve NK2 olarak iki gruba ayrıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmalar dolaşımdaki NK hücrelerinin farklı sitokin profillerine sahip efektör NK hücre alt gruplarına dönüşebileceğini ve farklı enflamatuvar özellikler kazanabileceğini desteklemektedir. *In vitro* koşullarda IL-12 varlığında kültüre edilen NK hücreleri IFN- γ ve IL-10 üretirken (NK1), IL-4 varlığında kültüre edilen NK hücreleri ise IL-5 ve IL-13 üretmektedirler (NK2). NK1 ve NK2 hücre grupları sitotoksik aktivite bakımından benzer olmakla beraber, NK1 hücreleri hücre yüzey CD95 (Fas) antijenini NK2 hücrelerinden daha yüksek oranda eksprese ederler ve antijen veya kimyasal indüklü apoptozise karşı daha duyarlıdır (6, 7). NK hücreleri; T hücre reseptörü (THR), immünoglobülin (Ig) veya CD3 molekülünü eksprese etmemelerine karşılık, hücre yüzeylerinde "nöral hücre yapışma molekülü-1" (CD56) ekspresyonu ile karakterizedir. CD56 ekspresyonunun özgül fonksiyonu tanımlanmamış olmakla birlikte, NK hücreleri CD56 ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak "CD56^{parlak}" ve "CD56^{soluk}" olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

Yüksek oranda Fc γ reseptörü CD16 ve perforin eksprese eden CD16⁺CD56^{soluk} NK hücreleri "olgunlaşmış" NK hücreleri olup, total periferik kan NK hücrelerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadırlar (4, 7). Bu hücreler uyarıma bağlı olarak değişen miktarlarda IFN- γ sekrete edebilen ve hedef hücreleri etkili şekilde öldüren hücrelerdir (8). Enflamasyonlu periferik bölgeler için "homing marker"ları (yerleşme belirteci) taşırlar ve sitotoksitede etkili perforin içerirler. Kandaki total NK hücrelerinin küçük bir bölümünü (%5-10) ise CD16-CD56^{parlak} "olgunlaşmamış" NK hücreleri oluşturmaktadır. Düşük seviyede perforin ve CD16 eksprese eden CD56^{parlak} NK hücreleri uyarımı takiben yüksek miktarlarda IFN- γ ve TNF- α salgırlar. Bu fonksiyonlarda CD56^{soluk} NK hücrelerine göre üstün olmakla birlikte, yalnızca uzun süreli uyarımdan sonra sitolitik aktivite

geliştirebilmektedirler (4, 9). Yüksek seviyede sitokin sekresyonundan dolayı CD56^{parlak} NK hücrelerinin enflamasyondan sorumlu veya regülatör etkili hücreler oldukları ileri sürülmektedir. Bu olgunlaşmamış NK hücreleri sekonder lenfoid dokularda (10) ve enflamasyon alanlarında yüksek oranda bulunurlar (11).

NK hücrelerinin pek çok hastalıkla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İlgili hastalık modeline göre NK hücrelerinin koruyucu ya da hastalık ilerletici rolleri bulunabilmektedir. NK hücrelerinin multipl sklerosis hastalığı remisyonunda etkili olabileceği öne sürülmektedir. Sistemik lupus eritematosus (SLE) hastalığında NK hücrelerinin sayısal azlığı nedeniyle enfeksiyonlara yatkınlığa neden olduğu ileri sürülmektedir. Myastenia gravis hastalığında ise NK hücrelerinin otoreaktif T ve B hücreleriyle etkileşim ile patogenez başlangıcında rolleri olabileceği öne sürülmektedir. NK eksikliğinin viral hastalıklar ve kansere yatkınlıkla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (12). Yine allerjik hastalıklara NK katılımını inceleyen çalışmalar ise NK hücrelerinin immün regülasyona katılarak allerjene özgü yanıtları baskılayan bir alt grubunu ortaya çıkartmıştır (13).

Behçet hastalığı, etyolojisi tam olarak bilinmeyen inflamatuvar bir hastalık olup tekrarlayan oral ve genital aftöz ülserasyonlar, deri lezyonları, paterji yanıtı, üveit ve diğer manifestasyonlar ile karakterizedir. Hastalık patogenezinin, genetik yatkınlığı bulunan bireylerde, çevresel faktörlerce tetiklenmiş immünolojik anormalliklerden kaynaklandığı öne sürülmektedir (14). Diğer immün sistem hücreleriyle beraber NK hücrelerinin de Behçet hastalığı patogenezinde etkin rolleri olabileceği bildirilmektedir. Adaptif immün yanıtları etkileme güçleri bulunan NK hücrelerinin, bu sayede çeşitli otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezine katılabileceği öne sürülmektedir. Doku bütünlüğünün sağlanması ve adaptif immünite sitokinlerinin gereksiz yere salgılanmasını engelleyebilen NK hücre fonksiyonlarının, doğal ve adaptif immün yanıtların hassas biçimde düzenlenmesine katkıda buldukları iddia edilmektedir (15, 16). NK hücrelerinin Behçet hastalığı patogenezine katılımları çeşitli çalışmalarla incelenmiş, çalışmalar farklı sonuçlar rapor etmiştir. Aktif Behçet hastalarında NK sayılarında artışa karşın azalmış sitotoksik aktivite gösterilmiştir (10,11). Ayrıca aktive NK hücrelerinin Behçet hastalığı atak döneminde remisyonla göre arttığı, remisyon döneminde ise artışı bildirilen NK2 hücrelerinin hastalık atak döneminin sınırlandırılmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (17).

Pek çok hastalıkla ilişkili olan NK hücre çalışmalarının bazıları saf hücreleri gerektirmekte, bu amaca yönelik farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlar, akım sitometrik ayırım yöntemi olan floresan ilişkili hücre ayırımı (FACS) ve manyetik aktive hücre ayırımı (MACS)'dır. Bu çalışmada, yaygın kullanılan bir izolasyon kitinin saf hücre elde etme başarısı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniğince takip edilen dokuz Behçet hastası, etik kurul gönüllü onam formlarını doldurmalarının ardından dahil edilmişlerdir. Bu hastalar, üveit atağı geçirdikleri anda çalışmaya dahil edilmiş, remisyona girdiklerinde ise tekrar kan vermişlerdir. Ayrıca benzer yaş ve cinsiyet dağılımına sahip dokuz sağlıklı kontrol de çalışmaya katılmışlardır.

Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu

Periferik Kan Mononükleer Hücreler (PKMH) steril şartlarda, heparinize kandan ficoll gradyan santrifüj yöntemiyle izole edilmiştir. Hastalardan alınan 30 ml heparinize venöz kan (1:1) oranında PBS çözeltisi ile karıştırılmış ve 1:2 (Ficoll:Kan) oranda Ficoll üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. İnterfazda toplanan PKMH'ler toplanarak ayrı bir tübe alınmış, PBS çözeltisi ile 2 kez 2000 rpm'de 5 dakika yıkanmıştır. Santrifüjün ardından hücreler Neubauer hemasitometresi kullanılarak mikroskop altında sayılmıştır. Hücreler, deneyde kullanılana kadar RPMI-1640 medyum (Sigma Aldrich Company, St Luis, Amerika) içerisinde, buzda muhafaza edilmiştir.

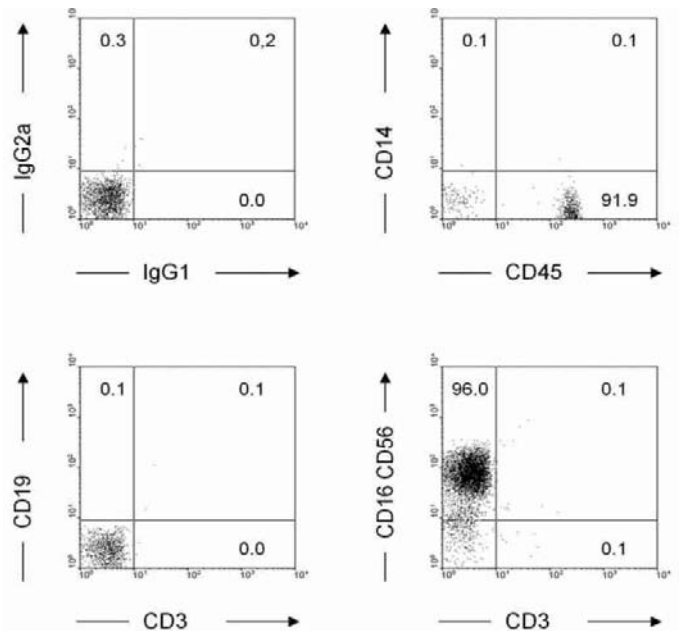
NK hücre izolasyonu

PKMH-NK hücreleri, steril koşullarda manyetik hücre ayırım sistemi (MACS, Miltenyi Biotec, Almanya) ile izole edilmiştir. Bu sistemde NK hücre izolasyon kiti (MACS, Miltenyi Biotec, Almanya) kullanılarak T ve B lenfositler, monositler, bazofiller, dendritik hücreler ve diğer myeloid hücrelerin PKMH'den negatif seleksiyonu ile ayrılmıştır. 10^7 /ml PKMH'ye $20\mu\text{l}$ Reaktan A (CD3, CD4, CD19, CD33) monoklonal antikor kokteyli ve $80\mu\text{l}$ NK tamponu (%0.5 Bovine Serum Albumin, 2mM EDTA içeren PBS, pH:7.2) eklenip $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler NK tamponu ile 2000 rpm'de 5 dakika yıkanıp süpernatant uzaklaştırılmış, pellet üzerine 10^7 /ml hücreye $20\mu\text{l}$ Reaktan B (anti-manyetik mikrobeadler) ve $80\mu\text{l}$ NK tamponu eklenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de 30

dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben hücreler NK tamponu ile 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılıp pellet 1ml NK tamponu ile resüspanse edilerek manyetik ayırım aşamasına hazırlanmıştır. Manyetik separasyon için Midi MACS, ayırım kolonu olarak LS-MACS kolonu kullanılmıştır. Hücre süspanasyonu, önceden NK tamponu ile ıslatılmış olan MACS kolonuna uygulanmıştır. NK hücreleri negatif seleksiyonla, deplesyonu yapılan PKMH'ler ise pozitif seleksiyonla ayrıldıktan sonra hücre sayımı yapılmış, hücreler bir sonraki aşamaya kadar RPMI-1640'lı medyumda muhafaza edilmiştir. NK hücre süspanasyonu, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1ml RPMI-1640 eklenerek resüspanse edilmiştir.

NK hücre saflığının tayini

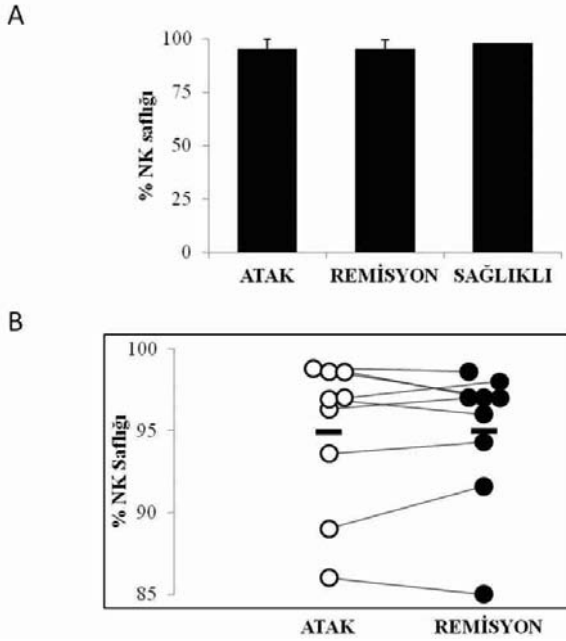
İzole edilmiş NK Hücre süspanasyonu CD3FITC/CD19PE ve CD3FITC/16PE 56PE monoklonal antikoları (Becton Dickinson, Amerika) ile boyanarak akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir. Bu amaçla 2×10^5 /ml NK hücre süspanasyonu anti-CD3FITC/CD19PE, anti-CD3FITC/16PE 56PE ve anti-CD45FITC/14PE ile işaretlenip 30 dakika oda ısısında inkübasyonun ardından akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Örnek bir saflık çıktısı. Saflaştırma sonrası CD45/CD14, CD3/CD19 ve CD3/CD16 CD56 yüzey belirteçleri monoklonal antikolar ile işaretlendiğinde %96 saflıkta NK topluluğu gözlenmektedir.

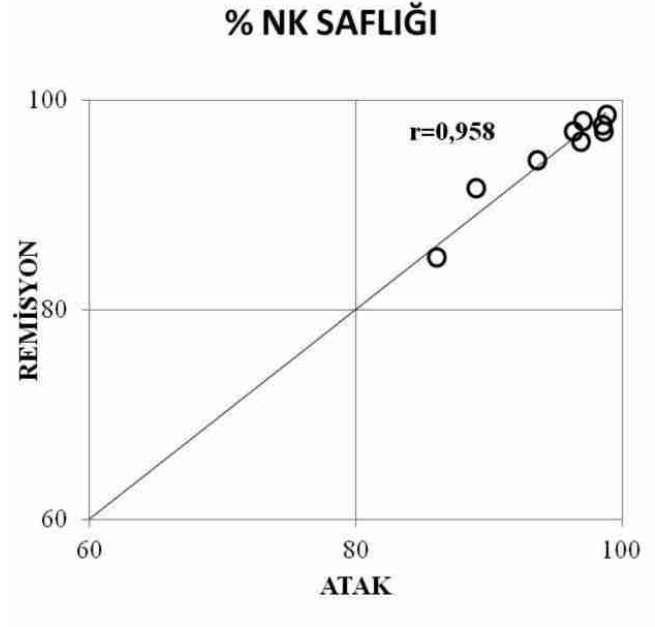
BULGULAR

Çalışmaya katılan tüm hasta ve sağlıklı kontrollerde NK saflığı değerlendirilmiştir. Hastaların atak dönemlerinde ($94,97 \pm 4,58$), remisyon dönemlerinde ($95,01 \pm 4,33$) ve sağlıklı kontrollerde ($97,80 \pm 0,99$) belirlenen saflık değerleri yüksektir (Şekil 2A). Gruplar arasında saflık değerleri açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir (Wilcoxon testi ve Mann-Whitney U testi ile). Kolmogorov-Smirnov testi ile grup dağılımları incelendiğinde atak ($p=0,037$), remisyon ($p=0,034$) ve kontrol grubunda ($p=0,031$) birey saflık değerlerinin anlamlı düzeyde birbirinden farklı oldukları görülmektedir. (Şekil 2B). Şekil incelendiğinde birey saflık değerlerinin birbirinden farklı olduğu, ancak atak ve remisyon değerleri arasında paralellik olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 2: Atak ve remisyon dönemindeki Behçet hastaları ve sağlıklı kontrollere ait saflık çıktıları. (A) Behçet hastalarının atak ve remisyon NK saflık yüzde ortalamaları birbirlerine benzer bulunmuştur (Grup ortalama \pm standart sapma değerleri gösterilmiştir, $n=9$). (B) Behçet hastalarının atak ve remisyon dönemlerindeki saflık değerleri gösterilmiştir. Bireysel saflık değerleri farklı olmakla beraber bireylerin atak-remisyon sonuçları birbirleriyle uyumludur.

Atak ve remisyon grupları arası uyum değerlendirildiğinde ise gruplar arasında kuvvetli korelasyon gözlenmiştir ($r=0,958$, Pearson korelasyon testi, Şekil 3). Bu değerler atak-sağlıklı grupları arasında ($r=0,665$), remisyon-sağlıklı grupları arasında ise ($r=0,457$) düzeyinde kalmıştır.



Şekil 3: Behçet hastalarının atak ve remisyon dönemlerinin birbirleriyle uyumunu inceleyen korelasyon grafiği. (Pearson Korelasyon testi, $r=0,958$)

TARTIŞMA

Hücre saflaştırması için yöntemler günden güne gelişmektedir. En yaygın kullanılan iki yöntem FACS ve MACS'tır. Bu iki yöntemin saflaştırma başarısını ve ayırıştırma işlemi sonrası hücre canlılık ve fonksiyonel kapasite değişimlerini inceleyen çalışmalar farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, Treg ayırımı için MACS ile FACS yöntemleri karşılaştırılmış, hücre sağlığı veya canlılığında çalışmaları etkileyecek düzeyde fark olmadığı ancak flow sitometrik yöntemin saflık ve viyabilite konularında daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (18). Fare mezenkimal kök hücre saflaştırılmasıyla ilgili bir başka çalışmada ise FACS ile ayırımın daha saf ancak viabilitesinin daha düşük olduğu gösterilmiştir, ayrıca MACS ile ayırımında hücre aktivitesi üzerine etkinin daha az olması manyetik ayırımın avantajını ortaya koymuştur (19). Çalışmamızda MACS yönteminin özellikle seçilmesinin nedeni, hiç dokunulmamış hücrelerin (negatif seleksiyon, untouched) elde imkanı sağlamasıdır. Bu çalışmada, CD3, CD14, CD19 ve CD33 antikor kokteyli ile NK haricindeki hücrelerin işaretlenerek negatif seleksiyon metodu ile dokunulmamış NK hücre ayırımının gerçekleştirilmesi sonucu, doğala en yakın NK hücrelerinin izolasyonu mümkün olmaktadır. Her 3 grupta da %95 civarı elde edilen saflık oldukça güçlü bir ayırımına işaret etmekte olup daha gelişmiş yöntemlerle saflık miktarının artacağı düşünülmektedir. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında benzer

saflık eldesi, NK saflığının hastalıklardan etkilenmeyebileceğini düşündürmektedir. Gruplar içerisinde bireyler arasında saptanan farklı saflık düzeylerinin başta metodolojik problemlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ancak çalışmada ilginç olan, atak-remisyon dönemi Behçet hastalarının da birbirlerinden farklı saflık oranlarına sahip olmaları ve bu oranların remisyonunda çok benzer olarak tekrar saptanmasıdır. Atak ve remisyon grupları arasında çok yüksek korelasyon saptanmıştır. Buna bağlı olarak, izolasyon kiti antikor kokteylinin hücrelere donörden donöre geçecek özgülük ile bağlantı olabileceği, donör saflıklarının birbirinden farklı olmakla beraber bireysel atak-remisyon değerlerinin birbiriyle benzer olabileceği düşünülmektedir. Biyoteknolojinin gelişmesi ile açığa çıkacak farklı izolasyon yöntemlerinin zaten yüksek olan saflığı daha da arttırması mümkündür. Bireyler arası farkların ortadan kalkması ise hücrelere daha yüksek özgülüğe sahip yeni belirteçlerin ortaya çıkması ile mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR:

1. Deniz G. NK ve NKT hücreler. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(43):18-25.
2. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
3. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
4. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-7.
5. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*. 2001;2(9):762-4.
6. Peritt D, Robertson S, Gri G, Showe L, Aste-Amezaga M, Trinchieri G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol*. 1998;161(11):5821-4.
7. Deniz G, Akdis M, Aktas E, Blaser K, Akdis CA. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):879-84.
8. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*. 2013;4:63.
9. Strowig T, Brilot F, Munz C. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol*. 2008;180(12):7785-91.
10. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*. 2004;172(3):1455-62.
11. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol*. 2004;173(10):6418-26.
12. Aktas E, Erten G, Kucuksezer UC, Deniz G. Natural killer cells: versatile roles in autoimmune and infectious diseases. *Expert review of clinical immunology*. 2009;5(4):405-20.
13. Deniz G, Erten G, Kucuksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol*. 2008;180(2):850-7.
14. Gul A. Behcet's disease: an update on the pathogenesis. *Clinical and experimental rheumatology*. 2001;19(5 Suppl 24):S6-12.
15. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and autoimmunity. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(1):8-14.
16. Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gul A, Onoe K, et al. Immunology and functional genomics of Behcet's disease. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(9):1903-22.
17. Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, et al. Natural killer cells control a T-helper 1 response in patients with Behcet's disease. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(3):R80.
18. Yan H, Ding CG, Tian PX, Ge GQ, Jin ZK, Jia LN, et al. Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4+ CD25+ Treg cells. *Journal of Zhejiang University Science*. 2009;10(12):928-32.
19. Li Q, Zhang X, Peng Y, Chai H, Xu Y, Wei J, et al. Comparison of the sorting efficiency and influence on cell function between the sterile flow cytometry and immunomagnetic bead purification methods. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2013;43(2):197-206.