

11. Isogai N., Landis W., Kim T. H., Gerstenfeld L.C., Upton J., Vacanti J.P. Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering // *The Journal of Bone and Joint Surgery*. – 1999. – 81. – P. 306-16

12. Lyons, F., Partap S., O'Brien F.J. Part 1: Scaffolds and Surfaces // *Technol Health Care*. – 2008. – № 16. – P. 305-317.

13. Rocky S.T. A second-generation autologous chondrocyte implantation approach to the treatment of focal articular cartilage defects // *Journal Arthritis research and therapy*. – 2007. – № 9. – P. 109.

14. Roland P. J. AMIC technique for cartilage repair, a single-step surgical intervention as compared to other methods // *European Cells and Materials*. – 2006. – Vol. 12. – Suppl. 1.

MODERN METHODS OF RESTORATION OF THE ARTICULAR SURFACE

Makejev O. G., Obuchov I. A., Pomogajeva E. V.

State educational institution of higher professional education "The Ural State Medical Academy" Ministry of health and social development.

General Directorate of Health of Sverdlovsk region "Institute of medical Cell Technology"

Tissue engineering is a dynamically developing part of regenerative medicine, nowadays it allows to restore the full – local defects of the articular surface. Further development of technologies in this area assumes rehabilitation of full functionally and structurally related tissue complex.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛАТРАТОБРАЗУЮЩЕГО ГАЗА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СПОСОБА СБЕРЕГАЮЩЕЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Макеев О.Г., Пономарев А.И., Коротков А.В.

*ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздрава России
Кафедра медицинской биологии и генетики
Россия, Екатеринбург*

Контактный e-mail: larim@mail.ru

В настоящее время значительно возрос интерес к трансплантации аутологичных стволовых клеток (АСК) с целью заместительной терапии.

Преимущества использования аутологичных АСК перед аллогенными достаточно очевидны.

Это:

- отсутствие необходимости дорогостоящего HLA типирования

- отсутствие развития острой и хронической формы реакции-трансплантат-против-хозяина;

- длительный положительный эффект трансплантации вследствие отсутствия реакций отторжения;

- отсутствие вероятности перекрестного инфицирования;

Наряду с перечисленными преимуществами, аутологичным СК свойственен важный недостаток – невозможность одномоментного получения достаточного количества клеток и, как следствие – необходимость их промежуточного «подрощивания» в условиях культуры.

Там и тогда, где и когда время является залогом успеха трансплантации (например, в комбустиологии), последнее сводит на нет все преимущества аутологичных СК.

Однако проблема имеет хорошо известное решение – создание банка аутологичных АСК.

В последнем случае определяющим моментом является криоконсервирование заранее запасенных культур аутологичных клеток до момента, когда в них возникнет необходимость – будь то тяжелое заболевание или желание пациента провести коррекцию возрастных изменений кожи.

Основная цель криоконсервирования – сохранение жизнеспособности СК при длительном хранении [37]. Протоколы криоконсервирования для СК в основном базируются на методах, установленных для клеток костного мозга [21], заключающиеся в добавлении в качестве криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) к клеточной суспензии в концентрации 10% [4, 6, 17, 25, 36].

Однако, помимо защитной функции, ДМСО может оказывать токсическое действие на клетки, приводящее, в конечном счете, к их гибели [8, 21, 28]. Кроме того, ДМСО способен вызывать нежелательную преждевременную дифференцировку СК, выступая в качестве вектора для цитокинов [22, 29] или стимулировать апоптоз [34]. Внесение

ДМСО может оказывать отрицательное влияние на реципиента [9, 13, 13, 19, 32, 39].

Применение ДМСО не исключает возможности использования дополнительных криопротекторов и биоантиоксидантов [10, 14, 15, 23, 40, 41]. Однако именно ДМСО в конечной концентрации 10% признан наиболее эффективным для защиты СК при криоконсервации [1].

Альтернативой ДМСО может послужить газ ксенон, образующий в водных растворах клатраты, которые препятствуют образованию льда [30]. В настоящее время этот газ, ввиду низкой токсичности, широко используется в анестезиологии в качестве наркотического средства и для терапии целого ряда заболеваний [2, 3, 5, 11, 20, 24, 26, 31, 33].

Ранее, в ряде работ была продемонстрирована возможность использования смеси благородных газов (ксенона, криптона, аргона при давлении 1,5 атм [7], смеси ксенона и кислорода при давлении 6-7 атм [35]) для краткосрочной криоконсервации органов млекопитающих (6 часов и 30 минут соответственно).

Вместе с тем чистый ксенон или ксенон с небольшими примесями других газов способен образовывать клатраты при давлении и температуре близким к нормальным [16], что вероятно, позволит исключить дорогостоящее и небезопасное оборудование для получения высокого давления а так же сложного программируемого криогенного оборудования и позволит консервировать клетки с использованием обычного холодильного оборудования для криоконсервирования и резервуаров Дюара с жидким азотом для последующего хранения.

Материалы и методы

МСК были выделены из подкожной жировой клетчатки 4 здоровых мужчин в возрасте 27-42 г и культивированы в условиях, подробно описанных в литературе [27, 43].

После достижения 70% конфлюенции, клетки были мобилизованы обработкой 0,25% раствором трипсина в ЭДТА (Invitrogen) пересажены на новые матрасы большей площади (на 4 матраса каждая) из расчета 1,000–3,000 кл/см². Подсчет клеток производили на гематологическом анализаторе Cobas Micros OT.

В дальнейшем, по достижению конфлюенции 75-80%, культуры были случайным образом поделены на группы.

Таблица 1.		
Номер группы	Криоконсервант	Число культур
1	Контроль	4
2	ДМСО 5%	4
3	ДМСО 10%	4
4	Ксенон 100%	4

Криоконсервирование

МСК снимали с матрасов раствором трипсина-версена по стандартной методике и, после центрифугирования, ресуспендировали и подсчитывали на гематологическом анализаторе.

Обработка культур клеток ксеноном.

Флаконы для криоконсервации с культурой клеток продували He в течение 10 минут при постепенном снижении температуры до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ на ледяной бане, после чего флаконы закупоривали, помещали в контейнер для контролируемого охлаждения Nalgene Cryo а затем в холодильник Sanyo MDF-192 при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 1 час. В последующем пробы хранили в парах LN_2 при температуре над контейнером с культурами $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов и 6 месяцев.

Обработка клеток ДМСО

Готовили культуру клеток, содержащую двукратное количество клеток в половинном объеме среды и раствор предварительно стерилизованного фильтрацией ДМСО в культуральной среде с таким расчетом, чтобы при смешивании получить стандартное количество клеток в среде, содержащей 5 или 10% ДМСО.

Криопробирки с культурами помещали в контейнер Nalgene Cryo и помещали в холодильник Sanyo MDF-192 при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 1 час. Затем пробы хранили в парах LN_2 при температуре над контейнером с культурами $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$

Размораживание образцов проводили путем помещения криопробирки в водяную баню при 37°C [36].

Для удаления ДМСО, клетки перед посевом на культуральные среды неоднократно отмывали центрифугированием. С целью нивелирования возможных эффектов данной процедуры на изучаемые параметры, образцы, в которых в качестве криопротектора использовали ксенон, обрабатывали по такому же протоколу.

Жизнеспособность определяли по проценту окрашенных (0,4% раствором трипанового синего) клеток в камере Горяева. Принимая во внимание высокую погрешность данного метода (при соблюдении всех тонкостей протокола составляет не менее 10%), одновременно оценивали пролиферативную активность клеток по включению в макромолекулы меченых селективных предшественников синтеза ДНК (2^{14}C -тимидин Amersham Pharmacia Biotech). Радионуклид с активностью 37 кБк/мл среды вносили на 75 см^2 матрасы одновременно с 0.5×10^6 клеток. Эксперимент прерывали через трое суток культивирования, клетки снимали с матра-

сов по стандартной методике и подсчитывали на гематологическом анализаторе. Подсчет радиоактивности производили в спиртолуловом сцинтиляторе на жидкостном сцинтиляционном счетчике Бета-2 (эффективность счета по углероду - 98%). Результаты выражали в беккерелях на 10^6 клеток.

Клоногенную активность исследовали после фиксации клеток, окраски и подсчета клеток, как отношение числа колоний, состоящих не менее, чем из 20 клеток, к числу посеянных и выражали в процентах по отношению к контролю.

Полипотентность размороженных клеток изучали путем создания условий для дифференцировки АСК в различных направлениях

Для дифференцировки в адипогенном направлении в культуральную среду вносили комбинацию изобутилметилксантина, дексаметазона, инсулина и индометасина [42].

Для дифференцировки в хондрогенном направлении в культуральную среду вносили комбинацию инсулина, трансформирующего фактора роста и аскорбата [42].

Для дифференцировки в кардиомиогенном направлении, в культуральную среду вносили рекомбинантные IL3 и IL 6 [18].

Для стимуляции дифференцировки в остеогенном направлении в культуральную среду вносили дигидривитамин D3, аскорбиновую кислоту и глицерофосфат [42]

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 3.04. Результаты считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований было обнаружено, что применение в качестве криопротектора ДМСО не обеспечивает полную сохранность клеток от повреждающего воздействия изменения температуры при замораживании и последующем размораживании (таб. 1).

Так, доля дегенеративных клеточных форм после размораживания при использовании ДМСО была достоверно выше, нежели в исходных культурах, причем при увеличении концентрации ДМСО с 5 до 10 % продемонстрировало тенденцию к увеличению процента дегенеративных форм.

Вместе с тем, в результате применения в качестве криопротектора ксенона, число дегенеративных клеточных форм не отличалось от контрольных показателей.

Таблица 2.

Характеристики МСК в различные сроки после криоконсервирования

Показатели	контроль	Криоконсерванты					
		ДМСО 5% 48 час	ДМСО 5% 6 мес	ДМСО 10% 48 час	ДМСО 10% 6 мес	Хе 48 час	Хе 6 мес
Доля дегенеративных клеточных форм % от общего количества	$2,6 \pm 1,9$	$4,2 \pm 1,1$	$6,6 \pm 0,9^*$	$8,4 \pm 1,2^*$	$7,8 \pm 1,3^*$	$3,1 \pm 1,4$	$2,9 \pm 1,7$
Включение 2^{14}C -тимидина в ДНК (Бк/ 10^6 клеток)	$71,1 \pm 1,4$	$62,4 \pm 1,2^*$	$56,6 \pm 1,3^*$	$65,5 \pm 1,8^*$	$60,7 \pm 2,9^*$	$70,6 \pm 2,9$	$70,7 \pm 1,1$
Клоногенная активность, %	100	$89,76 \pm 1,69^*$	$79,60 \pm 1,82^*$	$91,12 \pm 1,53$	$85,37 \pm 1,07^*$	$99,20 \pm 2,07$	$99,43 \pm 1,54$

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$)

Результаты, полученные при исследовании синтетической активности клеток после криоконсервации, подтверждают данные микроскопии. Так использование ДМСО с целью криопротекции сопровождается достоверным сни-

жением синтетической активности в среднем на 14 %. Полученные результаты согласуются с данными литературы [8, 14, 21, 40] и могут быть объяснены вытеснением клеток, образующимися в среде крупными кристаллами льда в ги-

перосмолярные каналы (рис 1), где клетки подвергаются воздействию механической деформации и осмотическому шоку. На образцах, обработанных ДМСО 10% через 48 часов. Хорошо прослеживались деформированные клетки, вытесненные кристаллами льда в гиперосмолярные каналы.

В тоже время, результаты изучения синтетических параметров клеток, при криоконсервации которых в качестве протектора использовался ксенон не отличались от контрольных (таб. 1). Наряду с этим, в образцах, где в качестве криопротектора использовался Хе. Кристаллы льда визуально не определялись. Деформация клеток отсутствовала.

Ксенон, образуя клатраты, препятствует образованию льда как внутри клеток, так и в околоклеточной среде (рис. 2).

По видимому, в этом случае повреждающее воздействие замораживания и оттаивания существенно ниже, нежели при использовании ДМСО.

Последнее позволяет предположить, что ксенон более эффективен в качестве криопротектора, нежели «золотой стандарт»- ДМСО.

Однако многие креопротекторы, в том числе и ДМСО, обладают способностью вызывать нежелательную дифференцировку стволовых клеток, что приводит к снижению их полипотентности и формированию унипотентности [22,29]. Последнее является существенным моментом, поскольку ставит вопрос о целесообразности криоконсервирования полипотентных клеток.

С целью выяснения вопроса о наличии подобных эффектов у ксенона, была изучена способность криоконсервированных с использованием ксенона, в качестве криопротектора МСК дифференцироваться в 4 направлениях – холодногенном, адипогенном, остеогенном, кардиомиогенном.

Следует отметить, что ни в одном случае не было отмечено каких-либо особенностей роста и дифференцировки криоконсервированных клеток по сравнению с интактными.

Выводы.

Исследование применения ксенона в качестве криопротектора мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток показало его преимущества перед стандартно используемым с этой целью ДМСО.

Ксенон, в отличие от ДМСО, не вызывает нежелательной дифференцировки ММСК, и, наряду с этим, обеспечивает более высокую сохранность ММСК в ходе криоконсервации.

Литература

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии. -2000.-№46(5).-С.513-520
2. Буров Е.Н., Потапов В.Н., Макеев Г.Н. /Ксенон в анестезиологии.- Москва, "Пульс", 2000.- 389 с
3. Наумов С.А., Шписман М.Н., Наумов А.В., Лукинов А.В., Тупицын М.В.,Вовк С.М., Роль ксенона при лечении опиоидных наркоманий. //Вопросы наркологии. - 2002. - Том 6. - С.13-18.
4. Федотенков А.Г., Шишкина И.Д., Данилова Л.Д. и др. Ограждающие растворы для криоконсервирования костного мозга. //Гематология и трансфузиология. - 1992. - Том 7-8. - С.12-15.
5. Хлусов И.А., Наумов С.А., Вовк С.М., Корнетов Н.А., Шписман М.Н. Влияние ксенона на клетки и рецепторы. //Вестник РАМН. - 2003. - Том 9. - С.32-37.
6. Чуйков В.А. Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства диметилсульфоксида. //Криобиология. - 1989. - Том 1. - С. 3-10.
7. Щербаков П.В., Тельпухов В.И., Николаев А.В. Способ криоконсервации органов и тканей in situ /Пат А01N 1/02 Россия 2006

8. Alonso J.M. 3rd, Regan D.M., Johnson C.E., et al. Simple and reliable procedure for cord blood banking, processing, and freezing: St Louis and Ohio Cord Blood Bank experiences // Cytotherapy.-2001.-Vol.3(6).-P.429-433.

9. Benekli M, et al. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. //Bone Marrow Transplant.- 2000. - Vol. 25. - P. 1299-1301.

10. Cairo M.S., Wagner J.E. Placental and/or umbilical cord blood an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation // Blood.-1997.-P.4665-4678.

11. Coburn M, Kunitz O, Baumert JH, Hecker K, Haaf S, Zühlsdorff A, Becker T, Rossaint R Randomized controlled trial of the haemodynamic and recovery effects of xenon or propofol anaesthesia //Br. J. Anaesth. - 2005 Feb. - Vol. 94(2). - P. 198-202.

12. Davis J.M., Rowley S.D., Braine H.G. et al. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. //Blood. - 1990. - Vol. 75. - P. 781-786.

13. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral stem cell infusion. //Am. J. Hematol. - 1994. - Vol. 45. - P. 187 - 188.

14. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A., et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplant.-1996.-Vol.18(4).-P.725-773.

15. Dushez P., Dazey B., Douay L., et al. An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34+ cells // Journal of Hematology and Stem Cell Research.-2003.-Vol.12.-P.587-589.

16. Englezos P. Clathrate hydrates.//Ind. Eng. Chem. Res. - 1993. - Vol.32. - 1251-1274.

17. Gee A.P. Bone marrow processing and purging: a practical guide. 1991. - P. 332-337.

18. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. //Cardiovasc. Res. 1997. - Vol. 36. - P.149-162.

19. Higman MA, Port JD, Beauchamp NJ Jr, Chen AR. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. //Bone Marrow Transplant. - 2000. - Vol. 26. - P. 797-800.

20. Hirota K Special cases: ketamine, nitrous oxide and xenon //Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. - 2006 Mar. - Vol.20(1). - P. 69-79.

21. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing // Cryobiology.-2003.-Vol.46.-P.76-87.

22. Leiden J.M. Beating the odds: a cardiomyocyte cell line at last // J.Clin.Investig. - 1999. - Vol.103. - P.591-592.

23. Limaye L.S., Kale V.P. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium //Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research.-2001.-Vol.10(5).-P.709-718.

24. Marx T., Wagner D., Baeder S., Goertz A., Georgieff M., Froeba G. Hemodynamics and catecholamines in anesthesia with different concentrations of xenon //Applied Cardiopulmonary Pathophysiology. - 1998. - Vol.7. - 215-221.

25. Meryman H.T., Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cells using a highglycerol concentration. //Transfusion. - 1972. - Vol. 12. - P. 145-146.

26. Naumov S. The state of live support systems of an organism under action of xenon. / The Fifth Annual Symposium Alphas 2000. - 8-9th September, Ulm, Germany. - P. 89-90.

27. Patricia A. Zuk, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Prosper Benhaim, and Marc H. Hedrick Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells //Molecular

Biology of the Cell. - December 2002. -Vol. 13. - P. 4279-4295.

28. Pollok K., et al. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation // *Journal of Hematology and Stem Cell Research*.-2001.-Vol.12(3).-P.341-350.

29. Pittenger, M.F., - Vol. Mackay, A. M.; Beck, S. C.; et al., Multilineage potential of Adult Mesenchymal stem cells // *Science*. - 1999. - Vol. 284. - P. 143-147.

30. Prehoda RW (Ed) *Suspended Animation*. /Chilton Book Co., Philadelphia. -1969 - P. 81-86/

31. Rasmussen JH, Mosfeldt M, Pott FC, Belhage B Xenon for induction of anaesthesia // *Acta Anaesthesiol Scand*. - 2009 Apr. - Vol.53(4). - 549-500.

32. Rowley S.D., Anderson G.L. Effect of exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells // *Bone Marrow Transplantation*.-1993.-Vol.11.-P.389-393.

33. Saravanan P, Exley AR, Valchanov K, Casey ND, Falter F. Impact of xenon anaesthesia in isolated cardiopulmonary bypass on very early leucocyte and platelet activation and clearance: a randomized, controlled study. // *Br. J. Anaesth*. - 2009 Dec. - Vol.103(6). - P. 805-810.

34. Seung-Hee Jo, Chunyan Yang, Qi Miao, Michal Marzec, Mariusz A. Wasik Pin Lu and Y. Lynn Wang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Promotes Lymphocyte Survival through Its Actions on Cellular Metabolic Activities // *The Journal of Immunology*. - 2006. - Vol. 177. - P. 3737-3745.

35. Sheleg Sergey, Hugh Hixon, Bruce Cohen, David Lowry and Mikhail Nedzved. Cardiac Mitochondrial Membrane Stability after Deep Hypothermia using a Xenon Clathrate Cryostasis Protocol - an Electron Microscopy Study // *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. - 2008. - Vol. 1. - P. 440-447.

36. Simone F.P. *Cryopreservation Manual* /Nagle Nune International, NY, 1998, 13p.

37. Stiff P.J., Koester A.R., Weidner M.K. et al. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dymethylsulphoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. // *Blood*. - 1987. - Vol. 70(4). - P. 974-978.

38. Szer J. Cryopreservation and functional assment of harvested bone marrow and blood stem cells. // *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*. - 2004. - P. 450-456.

39. Windrum P, Morris TC, Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complica-

tions Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. // *Bone Marrow Transplant*. - 2005. - Vol. 36. - P. 601-603.

40. Woods E., Liu J., Pollok K., et al. A theoretically optimized method for cord blood stem cell cryopreservation // *Journal of Hematology and Stem Cell Research*.-2001.-Vol.12(3).-P.341-350.

41. Zhang X.B., Li K., Yau K.H., Tsang K.S., et al. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells // *Transfusion*.-2003.-Vol.43(2).-P.265-272.

42. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. // *Molecular Biology of the Cell*. - December 2002. - Vol. 13. - P. 4279-4295.

43. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J.I., Futrell, W.J., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. // *Tissue Eng*. - 2001. Vol. 7. - P. 211-226.

XENON - A NEW PROMISING CRYOPROTECTIVE AGENT FOR CRYOPRESERVATION OF MULTIPOTENT STEM CELLS

Makeev O.G., Korotkov A.V. Ponomarev A.I.

A new cryopreservation method using xenon, a clathrate-forming gas, under normal pressure was investigated. The objective of the study was to determine whether this cryostasis protocol could protect stem cells at cryogenic temperatures and whether it has advantages over the standard protocol using DMSO. The results provided the first evidence that a cryostasis protocol using xenon as a clathrate-forming gas under normal pressure may have protective effects on stem cells. It was shown that xenon, in contrast to DMSO, does not cause unwanted differentiation of stem cells, and, in addition, allows for greater preservation of stem cells during cryopreservation. This cryostasis technology may find applications in developing new approaches for long-term cryopreservation protocols.