

مدلسازی تعامل تومور و سیستم ایمنی در بررسی اثر ایمونوتراپی IL-2 و شیمی درمانی با تأثیر مهاری Treg و IL-10

مهديه خلیق فرد^۱ علی مطیع نصرآبادی^۲ حسین ابراهیمی نسب^۳

۱- کارشناس ارشد- دانشکده مهندسی پزشکی- دانشگاه شاهد- تهران- ایران

m.khalighfard@aut.ac.ir

۲- دانشیار- دانشکده فنی- مهندسی- دانشگاه شاهد- تهران- ایران

nasrabadi@shahed.ac.ir

۳- کارشناس ارشد- دانشکده فنی- مهندسی- دانشگاه شاهد- تهران- ایران

چکیده: در علم پزشکی هنوز درمان قطعی تومور و یا کنترل رشد آن چالش بزرگی است. برخلاف آزمایشات کلینیکی، مدلسازی های بیولوژیکی با وقت و هزینه بسیار ناچیز قادر به آنالیز روش های درمانی متفاوت برای مبارزه با سلول های تومور می باشند. هدف از این تحقیق، مدلسازی تعامل سلول های سرطانی و سیستم ایمنی در بررسی روش های درمانی ایمونوتراپی و شیمی درمانی است که برای سازگاری بیشتر مدل با سیستم بیولوژیکی مربوطه، اینترلوکین های مهاری در رشد سلول های ایمنی اعم از Treg و IL-10 را نیز شامل می شود. مدل بر پایه معادلات Depillis بهبود یافته با بکارگیری اینترلوکین های مهاری است که روش درمانی ایمونوتراپی با IL-2 و نیز شیمی درمانی با فواصل زمانی متفاوت را بطور مجزا و توأم با یکدیگر شامل می شود. نتایج حاصل از شبیه سازی با مطالعات فیزیولوژیکی، از نظر روند رشد جمعیت سلول های ایمنی و سلول های سرطانی در روش های درمانی بکار رفته، مطابقت دارند که در نهایت پروتکل درمانی ای پیشنهاد می گردد که به آسیب های شیمی درمانی کمتری منجر خواهد شد. در ادامه اینترلوکین های دیگری پیشنهاد شده اند که نه تنها باعث تحریک CTL ها می شوند بلکه تأثیری بر تحریک سلول های Treg ندارند.

کلمات کلیدی: مدلسازی تومور، ایمونوتراپی IL-2، Treg، IL-10، شیمی درمانی

تاریخ ارسال مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۱۰

تاریخ پذیرش مشروط مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۰۱

نام نویسنده‌ی مسئول: مهديه خلیق فرد

نشانی نویسنده‌ی مسئول: تهران، ابتدای آزادراه تهران-قم، روبروی حرم مطهر امام خمینی (ره)، دانشگاه شاهد، دانشکده فنی - مهندسی،

مهندسی پزشکی

در مدل کریشنر و پانتا^[۳] پارامتری معرفی شده است که بیانگر میزان تشخیص سلول های تومور در بدن می باشد. در صورتیکه این مقدار، کم در نظر گرفته شود عدم توانایی سیستم ایمنی را در تشخیص تومور نشان می دهد. علاوه بر این پارامتر، دو مکانیزم درمانی در نظر گرفته شده که یکی تزریق TIL^۹ و دیگری تزریق IL-2 را در سیستم تعیین می کند. در این مدل نشان داده شده که درمان فقط با IL-2 نمی تواند موثر باشد ولی اگر این درمان همراه با TIL باشد می تواند تومور را بطور کامل حذف نماید.

در مقاله [۴] مدل پیشرفته تری از مدل ارائه شده توسط کریشنر^[۳] پیشنهاد شده است که در مدل کردن رشد تومور و درمان آن به وسیله اینترلوکین بکار رفته است و در آن داده های کلینیکی و مدل کریشنر با هم ترکیب شده اند. در این مرجع مدل درمان با IL-2 تغییر داده شده به گونه ای که میزان آن در تزریق به زمان وابسته شده است. این فرضیه غیر واقعی است زیرا در عمل، IL-2 با دوز بالا و یکجا به بیمار تزریق می شود.

مدل ارائه شده در مرجع [۵] بر اساس مدل ارائه شده در مقاله [۶] می باشد که تنها واحدهایی جهت واکنش های جدید سلولی و نشان دادن شیمی درمانی و ایمونوتراپی به آن افزوده شده است. از این رو فرضیات در نظر گرفته شده در هر دو مقاله یکسان می باشند. این مدل دینامیک چهار جمعیت که سه تای آن مربوط به سه نوع سلول سیستم ایمنی و یکی مربوط به سلول های توموری است را به همراه غلظت دو دارو در خون نشان داده است.

در کل می توان گفت مدل های گوناگونی برای آنالیز رفتار متقابل تومور و سیستم ایمنی در نظر گرفته شده اند که با توجه بیشتر به آن ها می توان نتیجه گرفت که هیچ یک تمام جوانب از رقابت فیزیولوژیکی سلول های ایمنی و تومور را در نظر نگرفته اند بلکه تنها بخشی از اصول فیزیولوژیکی در تقابل سلول های ایمنی و تومور را بر اساس فرضیات در نظر گرفته شان مدل کرده اند. به عنوان مثال در مدل کریشنر و پانتا [۳] کل سلول های سیستم ایمنی در غالب سلول های اجرایی مدل شده اند ولی در مدل ارائه شده در [۱] سلول های ایمنی در دو گروه مجزا مدل شده اند و یا در مدل ارائه شده در [۲] سیستم ایمنی با دینامیک ساده تری در نظر گرفته شده تا بتوان دینامیک عروق دهی را نیز برای تومور مدل نمود.

نکته دیگر در این مدل ها این است که در برخی تلاش شده تا مکانیسم های درمانی مختلف بررسی شوند و تاثیر روش های درمانی متفاوت در روند رشد تومور و سلول های ایمنی نمایش داده شوند. ما در این مقاله با در نظر گرفتن اثر مهاری سایتوکین هایی نظیر IL-10 و Treg، اثرات درمانی ایمونوتراپی با IL-2 و نیز شیمی درمانی را با دوره های مختلف درمانی با مدلی بسیار نزدیکتر به واقعیت نسبت به مقالات ذکر شده از جمله مرجع [۳] بررسی می نمایم.

این پژوهش در صدد مدل سازی تعامل سیستم ایمنی با سلول های تومور، عوامل بیولوژیکی ای را که تأثیر بسزایی در واقعیت دارا هستند، در مدل ریاضی خود بکار می برد. با ایجاد تطابق مناسب مدل با واقعیت، روش های شیمی درمانی و ایمونوتراپی با IL-2 بطور مجزا و توأم مورد بررسی قرار گرفته اند و در نهایت روش درمانی ای پیشنهاد گردیده که با حذف سلول های سرطانی سعی در ایجاد کمترین آسیب ناشی از شیمی درمانی دارد.

۱-۱- پیشینه مدل سازی تعامل تومور و سیستم ایمنی

با استفاده از معادلات دیفرانسیل، مدل ها با نظریات مختلف مورد آزمایش قرار می گیرند و با استفاده از تحلیل نتایج مدل ها، روش های درمانی موثر از روش های ناکارآمد مجزا می شوند. مدل های متفاوتی برای بیان رشد جمعیت به کار برده شده اند.

در مدل سازی رشد سلول های سرطانی که در تقابل با سلول های ایمنی بدن می باشد تا کنون مدل های لاجیستیک^۱ برای نمایش رشد تومور و مدل های شکار و شکارچی^۲ و نیمه اشباع^۳ جهت نمایش دادن رقابت دو نوع سلول سرطانی و سلول های ایمنی استفاده گردیده اند.

مدل ارائه شده توسط دیپلیس و همکاران^۴ در سال ۲۰۰۳ [۱] روی واکنش های متقابل NK^۵ و CD8⁺T با سلول های مختلف تومور بر اساس معادلات ODE^۶ استوار است. در این مدل فرض شده که تومور همگن است. رشد تومور در غیاب سیستم ایمنی، سلول های ایمنی NK و CD8⁺T به عنوان سلول های کشنده تومور، فعال شدن NK و CD8⁺T به وسیله سلول های تومور، پیش زمینه وجود سلول های NK در غیاب سلول های تومور، عدم وجود سلول های CD8⁺T در غیاب سلول های تومور و نیز غیر فعال شدن سلول های NK و CD8⁺T بعد از تعدادی واکنش با سلول های تومور فرضیات این مدل می باشند که با توجه به این ها سه جمعیت از سلول ها شامل جمعیت سلول های تومور، جمعیت سلول های NK و جمعیت سلول های CD8⁺T در زمان در نظر گرفته شده اند. با این فرضیات، سه معادله دیفرانسیل جهت توصیف عملکرد این سه جمعیت ارائه گردیده است.

در مرجع [۲] با این فرض مدل سازی انجام شده که چهار نوع از سلول های ایمنی CTL^۷ ها، ماکروفاژها، NK و سلول های کمکی T_H مهمترین نقش را در ایمنی علیه سلول های تومور ایفا می کنند. از آنجا که وجود سیستم عروقی تومور علاوه بر تغذیه تومور و دفع مواد زائد آن می تواند سلول های سیستم ایمنی را نیز درون تومور حمل کند، بنابراین توانایی مقابله سیستم ایمنی با سلول های تومور، به این سیستم عروقی وابسته خواهد بود که این فرضیه در مدل این مقاله لحاظ شده است. مدل این مقاله رفتارهای مختلف دینامیک رشد یا نابودی تومور، رفتارهای نوسانی و بی نظمی ها را پیش بینی نموده است.

با توجه به بیان فرضیات مدل مبنی بر روابط بین عوامل بیولوژیکی بکار رفته در مدل، شرح مختصری از این سلول ها و مولکول های دخیل در ایمنی، حایز اهمیت می باشد.

۲-۱- سیستم ایمنی

سلول ها و مولکول های دخیل در ایمنی، سیستم ایمنی را تشکیل می دهند و پاسخ همگام و هماهنگ آن ها در برابر عوامل بیگانه پاسخ ایمنی نامیده می شود. دفاع در برابر عوامل بیگانه در ابتدا بر عهده واکنش های زودرس ایمنی ذاتی و سپس توسط پاسخ های ایمنی اکتسابی انجام می گیرد [۷].

از مهم ترین سلولهایی که در ایمنی ذاتی فعالیت می کنند سلولهای NK را می توان نام برد که این ها از طریق سیستم لنفاوی و گردش خون به تمام بافتهای بدن رفته و هر ماده خارجی و غیر خودی را که یافت نمایند به آن حمله نموده و آن را نابود می کنند [۸] و [۹]. علاوه بر ایمنی ذاتی پاسخ های ایمنی دیگری وجود دارند که در اثر مواجه شدن با عوامل عفونی تحریک می شوند و در اثر هر مواجهه مناسب و موفق با یک میکروب خاص، از لحاظ کثرت و توانایی های دفاعی افزایش می یابند. از آنجا که این نوع از ایمنی به عنوان یک پاسخ به عفونت ایجاد می شود و متناسب با آن عفونت می باشد به ایمنی سازگار موسوم است.

پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی اجزای یکپارچه از مکانیسم دفاعی انسان هستند که در آن سلول ها و مولکول های بیشماری به طور هماهنگ با هم عمل می کنند [۷]. به طور کلی دو نوع گلبول سفید مسؤول سیستم ایمنی اکتسابی هستند: لنفوسیتها و APC⁺ ها. لنفوسیت ها از مغز استخوان تولید می شوند و در دو نوع B و T یافت می شوند. یک سلول B فقط توانایی تشخیص یک نوع آنتی ژن خاص را داراست. در صورتی که B-Cell ها توسط آنتی ژن ها فعال نشوند بعد از ۴-۸ هفته خواهند مرد [۱۰]. جمعیت مهم دیگر لنفوسیتها T-Cell ها هستند. این سلولها نیز مانند B-Cell ها از مغز استخوان تولید می شوند [۱۱].

CTL ها، به عنوان قاتل سلولهای آلوده شده با ویروس ها نظیر سلولهای سرطانی و سلولهای غیر خودی در نظر گرفته می شوند. پاسخ ایمنی ایجاد شده بوسیله CTLها مصونیت سلولی را تشکیل می دهد [۱۲]. مکانیسم اصلی ایمنی در برابر تومور، کشته شدن سلول های توموری توسط CTL های CD⁸⁺ می باشد. زمانی که CTL های عملیاتی بوجود آمدند قادر به شناسایی و کشتن سلول های توموری بدون نیاز به محرک های کمکی خواهند بود. سلولهای توموری که توسط CTL ها شناسایی نمی شوند، به عنوان یک هدف برای سلول های NK تبدیل خواهند شد.

قابلیت تومورکشی سلول های NK توسط سائتوکین هایی نظیر اینترفرون ها و اینترلوکین ها نظیر IL-2 و IL-12 افزایش می یابد [۷]. افزایش میزان توانایی در کشتن سلولهای مهاجم، برای سلولهای

خودی نیز مضر بوده و آنها را نیز تحت تاثیر قرار دهد. دلیل این امر این است که باعث شناسایی اشتباه سلولهای خودی توسط سیستم ایمنی می شود و در این صورت فرد دچار بیماری ناشی از حمله سیستم ایمنی به سلولهای خودی خواهد شد که بیماری خود ایمنی نام دارد. این احتمال با افزایش تعداد سلولهای ایمنی افزایش می یابد. برای جلوگیری از بروز چنین بیماریهایی، بدن توسط سلولهای ویژه ای به نام Treg⁺ ها رشد لنفوسیتها و سلولهای ایمنی را با مکانیزم خاصی کنترل کرده و از رشد بی رویه آنها جلوگیری می کند و شاید یکی از دلایل ناکارآمد بودن سیستم ایمنی و برخی روشهای درمانی نظیر ایمونوتراپی در مقابله با سرطان، وجود همین سلولهای Treg و عملکرد آنها در بدن باشد [۱۳].

سلولهای Treg دارای زیر شاخه های متعددی بوده که تا به حال تعدادی از آنان کشف شده اند. یک دسته از سلولهای Trge که تحریک آنتی ژن⁺ نامیده می شوند بوسیله تحریک توسط پپتیدهای MHC⁺ در بافتهای جانبی تحمیل می شوند و مقدار زیادی اینترکولین ۱۰ (IL-10) و 10) یا فاکتور رشد تبدیلی بتا (TGF-β) ترشح می نمایند [۱۴] و [۱۵].

سلولهای Treg موجود در محیط تومور ممکن است نقش اصلی در نابودی پاسخ سیستم ایمنی در مقابل سرطان را بازی کنند [۱۶]. از اینرو این شواهد بیان می کنند که سلولهای Treg در محیط تومور از عملکرد مناسب سیستم ایمنی ضد تومور جلوگیری می نمایند. چیزی که از آن به عنوان مانع اصلی بر سر راه پیشرفت روشهای درمانی سرطان یاد می شود.

می توان سیستم ایمنی را جهت کشتن موثر سلول های توموری و ریشه کن کردن تومور با محرک های بیرونی فعال کرد. این امر انگیزه تولید راه های جدید در ایمنی درمانی تومور است که در آن تقویت پاسخ ضد توموری میزبان، هدف درمان می باشد. ایمن سازی مبتلایان به تومور، با سلول های توموری کشته شده یا آنتی ژن های توموری ممکن است منجر به تقویت پاسخ های ایمنی در برابر تومور شود. دغدغه ایمونولوژیست های تومور تعیین آن است که کدام یک از این روش های ایمنی درمانی می توانند در بروز پاسخ های ایمنی محافظتی در برابر تومورها، دخیل باشند و اینکه چگونه این مکانیسم های عملیاتی را به طریقی که اختصاصی تومور باشد تقویت نمایند.

دو رویکرد برای تقویت پاسخ های ایمنی در برابر تومورها مطرح هستند: ۱- تهیه محرک های کمکی مصنوعی برای سلول های T اختصاصی تومور، ۲- تهیه سائتوکین هایی که قادر به افزایش فعالیت سلول های T اختصاصی تومور بویژه CTL های CD⁸⁺ هستند [۷]. IL-2 سائتوکین اصلی در فعال سازی، رشد و تفکیک لنفوسیت ها می باشد. این سائتوکین توسط سلول های CD⁴⁺T تولید می شود و در مقادیر کم، توسط سلول های CD⁸⁺T (سائتوتوکسین سلول های T یا CTL ها) تولید می شود [۳]. مطالعه تئوری از دینامیک های تعامل

بین تومور و ایمنی تاریخچه طولانی دارد که یک مرور مناسب از آن ها را در مقاله آدام^{۱۵} و بلمو^{۱۶} [۶] می توان یافت.

۲- مدلسازی رشد تومور

۱-۲- فرضیات مدل [۱۷]

مدل ریاضی ارائه شده بر اساس مدل در مرجع [۵] از سال ۲۰۰۶ میلادی می باشد که در این تحقیق ، مدل فوق با افزودن اینترلوکین های مهاری IL-10 و Treg بهبود یافته است. به همین دلیل فرضیاتی که در مقاله فوق مورد استفاده قرار گرفته است در اینجا نیز مورد استفاده بوده و فرضیات جدیدی نیز به آنها افزوده شده است. این فرضیات عبارتند از:

- ۱- رشد تومور در غیاب سیستم ایمنی از تابع لاجیستیک پیروی می کند که یک مدل پذیرفته شده برای رشد تومور است.
- ۲- هر دو نوع سلولهای NK و $CD^{8+}T$ قادر به کشتن سلولهای تومور هستند [۱۷].
- ۳- سلولهای NK به طور طبیعی در بدن وجود دارند حتی مواقعی که هیچ سلول توموری در بدن وجود ندارد زیرا آنها بخشی از سیستم ایمنی ذاتی بدن هستند.
- ۴- NK و $CD^{8+}T$ بعد از تعدادی واکنش با سلولهای تومور غیرفعال می شوند.
- ۵- سطح لنفوسیت های گردشی می تواند به عنوان معیاری برای سلامتی بیمار در نظر گرفته شود.
- ۶- اجزا جمعیت لنفوسیتها در تولید آنتی بادی و تحریک سلولهای B دخالت دارند. سلولهای NK سلولهایی را که آنتی بادی به آن ها چسبیده، می کشد. در این مدل منبع جمعیت سلولهای NK به عنوان بخشی از لنفوسیت های موجود در نظر گرفته شده است.
- ۷- قسمتی از جمعیت سلولهای تومور که بوسیله شیمی درمانی کشته می شوند به میزان داروی موجود در سیستم بستگی دارد. این قسمت بیشینه ای کمتر از یک دارد زیرا فقط سلول های توموری که به مرحله خاصی از بلوغ رسیده باشند می توانند توسط شیمی درمانی کشته شوند. چرا که نوع تمایز نیافته سلول های توموری نسبت به شیمی درمانی مقاوم می باشند.
- ۸- بخشی از سلولهای NK و $CD^{8+}T$ و لنفوسیتها گردشی به علاوه سلولهای Treg نیز بوسیله شیمی درمانی کشته می شوند.
- ۹- سلولهای Treg به صورت طبیعی در بدن وجود دارند.
- ۱۰- تومور بصورت فعال بوسیله تولید فاکتورهای نظیر IL-10 به جنگ با سیستم ایمنی می پردازد.
- ۱۱- IL-2 علاوه بر آنکه باعث تحریک سیستم ایمنی در برابر سلولهای تومور می شود سلولهای Treg را نیز تحریک می نماید.
- ۱۲- بین تعداد سلولهای Treg و حجم تومور رابطه مستقیم وجود دارد.

۱۳- IL-10 در اثر واکنش بین سلولهای Treg و CTL ها تولید می شود.

۱۴- IL-10 می تواند باعث مرگ و میر سلولهای سیستم ایمنی گردد.

۱۵- IL-10 باعث تحریک و تولید سلولهای Treg و همچنین سلولهای تومور می شود.

۲-۲- مدل ریاضی

این مدل دینامیک شش جمعیت مختلف (سلولهای تومور، سه نوع سلول سیستم ایمنی، سایتوکین IL-10 و سلول های Treg) به علاوه غلظت دو دارو در خون را بر پایه مدل ذکر شده در قبل به تصویر می کشد. خلاصه ای از متغیرهای ذکر شده در بالا عبارتند از:

- $T(t)$: جمعیت سلولهای تومور
- $N(t)$: جمعیت کل سلولهای NK
- $L(t)$: جمعیت کل سلولهای $CD^{8+}T$
- $C(t)$: جمعیت لنفوسیت های چرخشی (گلبول های سفید)
- $M(t)$: غلظت داروی شیمی درمانی
- $I(t)$: غلظت داروی ایمونوتراپی
- $I_{10}(t)$: غلظت اینترلوکین ۱۰
- $T_R(t)$: جمعیت سلولهای Treg

باید به این نکته توجه داشت که جمعیت سلولهای NK و $CD^{8+}T$ دقیقاً تاثیرگذاری سلولهای ایمنی را نشان می دهند. با در نظر گرفتن موارد بالا معادلات مدل در ادامه نشان داده شده اند:

$$\frac{dT}{dt} = aT(1-bT) + \frac{p_1 T I_{10}}{g_1 + I_{10}} - cNT - DT - K_T(1-e^{-M})T \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dt} = eC - fN + g \frac{T^2}{h+T^2} N - pNT - \frac{p_2 N I_{10}}{g_2 + I_{10}} - K_N(1-e^{-M})N \quad (2)$$

$$\frac{dL}{dt} = -mL + j \frac{D^2 T^2}{k + D^2 T^2} L - qLT + (r_1 N + r_2 C)T - \frac{p_3 L I_{10}}{g_3 + I_{10}} - hL^2 T_R - K_L(1-e^{-M})L + \frac{p_1 L I}{g_1 + I} + v_L(t) \quad (3)$$

$$\frac{dC}{dt} = \alpha - \beta C - K_C(1-e^{-M})C \quad (4)$$

$$\frac{dM}{dt} = -\gamma M + v_M(t) \quad (5)$$

$$\frac{dI}{dt} = -\mu_1 I + v_I(t) \quad (6)$$

$$\frac{dI_{10}}{dt} = a_{10}T_R L + \frac{p_4 T^2}{g_4^2 + T^2} - \omega_{10} I_{10} \quad (7)$$

$$\frac{dT_R}{dt} = \lambda C + \frac{p_5 T_R I}{g_5 + I} + \frac{p_6 T^2}{g_6^2 + T^2} + \frac{p_7 T_R I_{10}}{g_5 + I_{10}} - \mu_R T_R - K_R (1 - e^{-M}) T_R \quad (8)$$

$$D = d \frac{(L/T)^l}{s + (L/T)^l} \quad (9)$$

در معادله (۱) [۱۷] که دینامیک رشد تومور را نشان می‌دهد عبارت اول دینامیک تومور در غیاب سیستم ایمنی را به صورت لاجیستیک فرض کرده است که این فرض با داده‌های جمع آوری شده از رشد تومور در موش بدون سیستم ایمنی توسط دیفن باخ همخوانی دارد [۱۸]. عبارت دوم این معادله افزایش رشد تومور در اثر تحریک IL-10 را نشان می‌دهد که در این صورت تومور می‌تواند از ظرفیت حامل خود نیز تجاوز نماید. این رابطه برگرفته از مدل مشهور میکائیلیس-متن [۱۹] بوده که بر روابط بین سلولی و آنزیمی دلالت دارد. عبارت‌های سوم و چهارم به ترتیب مرگ و میر سلولهای تومور در اثر واکنش با سلولهای NK و سلولهای CD8+T را نشان می‌دهد [۱۷].

عبارت آخر هم نحوه اثر شیمی‌درمانی بر روند رشد سلول‌های تومور را نشان می‌دهد این عبارت نشان می‌دهد که تعداد سلولهای تومور که بوسیله شیمی‌درمانی کشته می‌شوند به میزان داروی موجود در سیستم بستگی دارد.

این قسمت بیشینه‌ای کمتر از یک دارد زیرا فقط سلولهای توموری که به مرحله خاصی از بلوغ رسیده باشند می‌توانند توسط شیمی‌درمانی کشته شوند به همین دلیل واحد اشباع $1-e^M$ در نظر گرفته شده است. این عبارت توسط گراندرا [۱۸] در سال ۲۰۰۰ مطرح گردید [۲۰].

معادله (۲) بیانگر رشد سلولهای NK می‌باشد. در مدل دیپلیس فرض شده همیشه و حتی در زمان غیبت تومور این سلولها در بدن وجود داشته و با نرخ ثابتی رشد می‌کنند ولی در این جا فرض شده که سلولهای NK به صورت درصدی از لنفوسیت‌های گردشی بوده و این به ما امکان می‌دهد تا تاثیرات سلولهای گردشی را نیز بتوانیم بر روی این سلولهای مشاهده نماییم (عبارت اول). در عبارت دوم نشان داده شده که این سلولها عمر محدودی داشته و پس از مدتی و با نرخی ثابت از بین می‌روند.

عبارت سوم که نشان دهنده واحد جذب سلولهای NK است فرم اصلاح شده‌ای از مدل میکائیلیس-متن بوده و در مقالات متعددی مورد استفاده قرار گرفته است [۱] و [۳] و [۲۱]. عبارت چهارم نشان دهنده مرگ و میر این سلولها در اثر واکنش با سلولهای تومور می‌باشد [۱] و در عبارت پنجم غیر فعال سازی این سلولها بوسیله IL-10 بیان شده است [۲۲].

معادله (۳) دینامیک رشد سلولهای CD8+T را بیان می‌کند. از آنجایی که فرض شده این سلولها در زمان غیبت تومور در بدن وجود ندارند بنابراین عبارت اول نشان دهنده نرخ مرگ و میر طبیعی آنها می‌باشد. عبارت دوم که واحد جذب این سلولها به شمار می‌آید شبیه واحد جذب سلولهای NK است با این تفاوت که جمعیت سلولهای تومور با جمعیت سلولهای تومور کشته شده از طریق واکنش با سلولهای CD8+T جایگزین شده است [۱]. همچنین دبیرس [۱۹] بیان می‌کند که سلولهای CD8+T توسط سلولهای تومور کشته شده بوسیله سلولهای NK و سایر اجزا سیستم ایمنی نیز می‌توانند تحریک و تولید شوند [۲۳] به همین دلیل عبارت چهارم در نظر گرفته شده است. عبارت هشتم نیز تولید این سلولها با تحریک اینترلوکین ۲ را مدل می‌کند.

عبارتهای سوم و پنجم نیز به ترتیب مرگ و میر و غیر فعال سازی این سلولها در اثر واکنش با سلولهای تومور و تحریک IL-10 را نشان می‌دهد. عبارت ششم مرگ و میر این سلولها توسط تماس مستقیم با سلولهای Treg را مدل می‌کند. در انتهای این معادله عبارت $v_L(t)$ مشاهده می‌شود که به منظور شبیه سازی مکانیسم درمانی TH1 لحاظ گردیده است.

معادله (۴) که نشان دهنده لنفوسیت‌های گردشی خون می‌باشد بیان کننده آن است که این سلولها با نرخ ثابتی تولید شده و هریک از این سلولها عمر محدودی را دارا می‌باشند. همانطور که مشاهده می‌گردد این سلولها نیز تحت تاثیر شیمی‌درمانی قرار می‌گیرند.

معادلات (۵) و (۶) دینامیک داروهای مورد استفاده در مکانیزم‌های درمانی مختلف را نشان می‌دهند که در هر دو فرض شده است که این داروها به صورت نمایی کاهش پیدا می‌کنند و توابع $v_M(t)$ و $v_L(t)$ نشان دهنده پروتکل‌های درمانی مورد استفاده می‌باشند.

معادله (۷) بیان کننده دینامیک رشد IL-10 می‌باشد. IL-10 اثر واکنش سلولهای Treg با CTLها و به منظور از بین بردن این سلولها ترشح می‌شود (عبارت اول). همچنین سلولهای تومور نیز وقتی به اندازه کافی بزرگ شوند جهت مبارزه فعال با سلولهای سیستم ایمنی این ماده را ترشح می‌کنند (عبارت دوم). عبارت سوم نیز بیان کننده نرخ مرگ و میر آن می‌باشد.

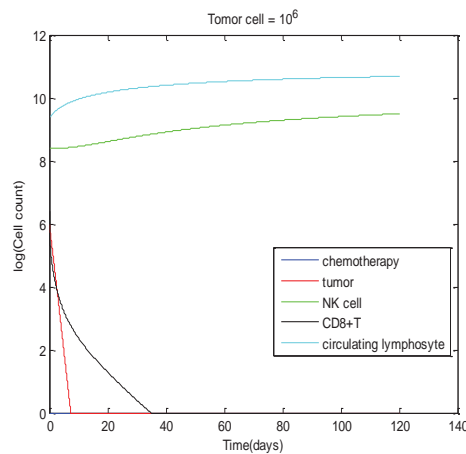
معادله (۸) دینامیک رشد سلولهای Treg را مدل می‌کند. این سلولها نیز نظیر سلولهای NK به صورت طبیعی در بدن وجود دارند و با نرخ ثابتی در تیموس تولید می‌شوند و در حقیقت بخش کوچکی از لنفوسیت‌های گردشی را به خود اختصاص می‌دهند. اما این سلولها تحت تاثیر عوامل دیگری نیز می‌توانند تولید شوند. IL-2 همانطور که برای تحریک و تولید CTLها مفید است به همان اندازه می‌تواند در تولید این سلولها که نابودکننده CTLها هستند نیز موثر باشند (عبارت دوم). این سلولها علاوه بر تحریک با IL-2 توسط IL-10 نیز تحریک و تولید می‌شود (عبارت سوم).

به علاوه سلولهای تومور نیز می‌توانند در تولید این سلولها نقش اساسی ایفا نمایند (عبارت دوم). برای این سلولها نظیر سایر سلولهای سیستم ایمنی عمر محدود و بنابراین نرخ مرگ و میری در نظر گرفته می‌شود (عبارت ششم).

مقادیر اولیه از سلول های ایمنی و تومور و نیز پالس های تزریق برای IL-2، شیمی درمانی و CTL تحت عنوان درمان با TIL، از مراجع [5] و [17] انتخاب شده اند. در روز ۲۰ ام یک پالس تزریق TIL (CD8⁺T) با دامنه بر گرفته از مقاله [17] اعمال شده است. تزریق IL-2 معمولا به همراه درمان TIL و به صورت چند پالس بعد از تزریق TIL صورت می گیرد. تزریق IL-2 بعد از تزریق TIL در روز ۲۱ ام با دوره زمانی ۲ روزه به مدت ۶۰ روز صورت گرفته است. شیمی درمانی به صورت پالس هایی با پریود ۵ و ۱۰ روز و پهنای پالس ۵۰٪ در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج شبیه سازی

در این تحقیق روش های درمانی نظیر شیمی درمانی و ایمونوتراپی را بطور مجزا و توأم همراه با تاثیر سایتوکین های مهارتی بررسی نموده ایم. با علم به اینکه اگر تعداد سلول های سرطانی کمتر از ۱۰^۶ سلول باشد پاسخ ایمنی بدن بدون هیچ روش درمانی قادر به حذف تومور می باشد ما نیز ابتدا ۱۰^۶ سلول تومور را در نظر گرفته ایم و خروجی شبیه سازی از مدلمان را بصورت شکل (۱) بدست آورده ایم.

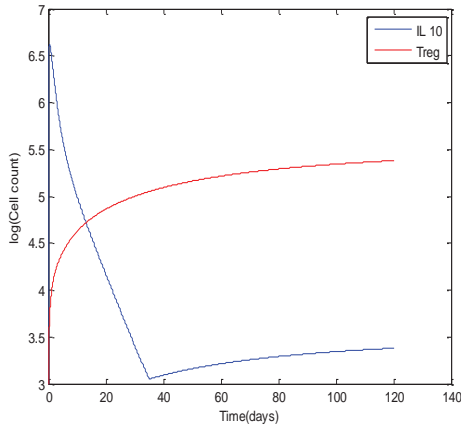


شکل (۱): توانایی سیستم ایمنی در مهار سلولهای تومور با تعداد کم (۱۰^۶)

همان طور که دیده می شود تومور تنها توسط CD8⁺T و NK ها در کمتر از ۱۰ روز از بین رفته است و به مرور زمان نیز CD8⁺T بعد از نابودی کامل تومور از بدن حذف می گردد.

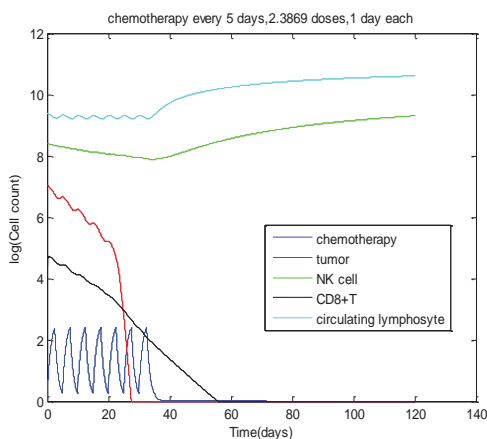
IL-10 که به عنوان عامل کنترلی در رشد سلول های CD8⁺T می باشد نیز با کاهش CD8⁺T کاهش می یابد که در شکل (۲) نشان داده شده است. در واقع با افزایش سلول های CD8⁺T، سلول های Treg به جهت مهار رشد سلول های CD8⁺T افزایش می یابند و منجر به ترشح بیشتر IL-10 به عنوان عامل کنترلی در رشد سلول های

ایمنی می شوند. با حذف تومور به مرور میزان سلول های CD8⁺T نیز کاهش یافته که مطابق شکل (۲) ترشح IL-10 نیز با کاهش میزان رشد Treg ها کاهش یافته است. افزایش صورت گرفته در قسمت انتهایی IL-10 با وجود حذف کامل تومور بدلیل مقدار اولیه در نظر گرفته شده آن در مدل بکار رفته است.



شکل (۲): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) به همراه سایتوکین IL-10

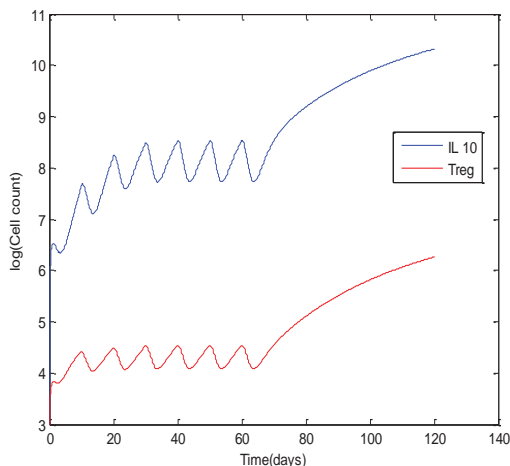
بعد از مشاهده تطابق مدل با واقعیت به هنگام کوچک بودن سلول های توموری، روش شیمی درمانی را برای سلول های توموری به اندازه ۱۰^۷ سلول بررسی نمودیم. برای این کار ابتدا شیمی درمانی با دوره های زمانی ۵ روز را در نظر گرفتیم. میزان دز داروی شیمی درمانی را بر اساس مقاله [17] قرار داده ایم. در اینجا فرض کرده ایم که داروی شیمی درمانی دو روز و نیم در بدن فرد باقی می ماند یعنی پالس هایی با پریود ۵ و پهنای پالس ۵۰٪ در نظر گرفته ایم. نتیجه در شکل (۳) آمده است.



شکل (۳): پاسخ سیستم ایمنی به همراه شیمی درمانی با دوره ۵ روزه در مهار رشد سلول های تومور با تعداد زیاد (۱۰^۷)

نتیجه شبیه سازی نشان می‌دهد که این روش درمانی قادر است تومور را بعد از حدود ۲۵ روز نابود کند. از طرفی می‌بینیم که شیمی درمانی نه تنها سلول های توموری را از بین می‌برد بلکه در طول مدت

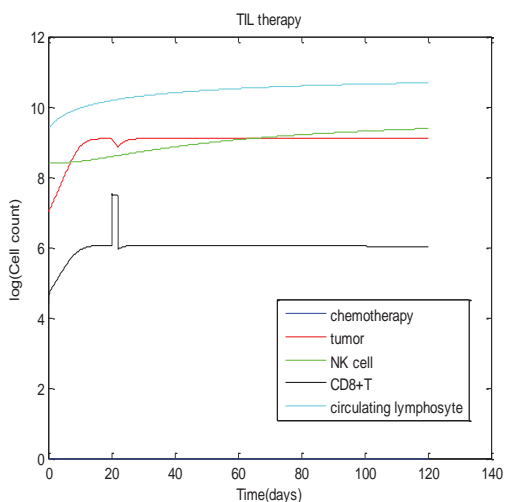
در شکل (۶) نیز تأثیر شیمی درمانی بر روی سایتوکین های IL-10 و Treg نشان داده شده است.



شکل (۶): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) به همراه سایتوکین IL-10 متأثر از شیمی درمانی با دوره ۱۰ روزه

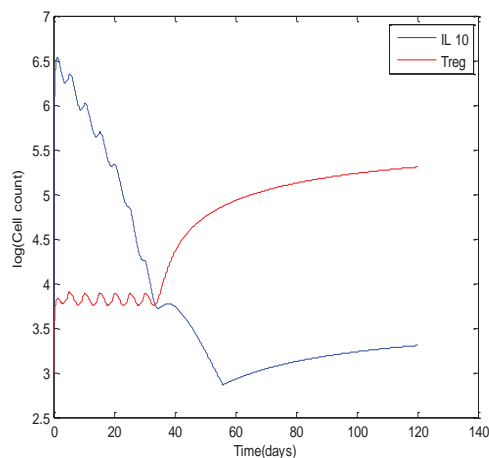
در واقع دوره زمانی ۱۰ روزه برای شیمی درمانی نتوانسته درمان قطعی برای سلول های توموری باشد و تنها در هر تزریق منجر به کاهش میزان سلول های سیستم ایمنی شده است.

در روش درمانی ایمونوتراپی تزریق TIL ($CD^{8+}T$) را اعمال کرده ایم به این شکل که در روز ۲۰ ام یک پالس تزریق با دامنه برگرفته از مقاله [۱۷] ایجاد نموده ایم. نتایج در شکل های (۷) و (۸) نمایش داده شده اند.



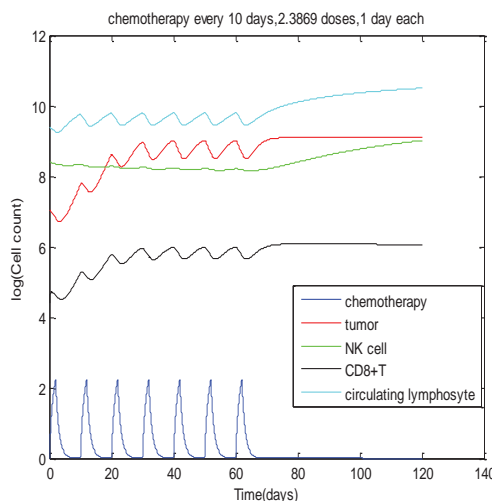
شکل (۷): پاسخ سیستم ایمنی با تزریق TIL ($CD^{8+}T$)

شیمی درمانی سلول های ایمنی میزبان نیز روند کاهشی را با اعمال هر دز در هر بار تزریق دارا هستند که این هم مطابق با واقعیت موجود در فیزیولوژی است که شیمی درمانی تمام سلول ها هم سلول های میزبان و هم سلول های سرطانی را از بین خواهد برد. از طرفی اثر کاهشی شیمی درمانی در میزان سلول های IL-10 و Treg به صورت تناوبی در هر بار تزریق دارو همانند شکل (۴) بدست آمده است [۱۷].

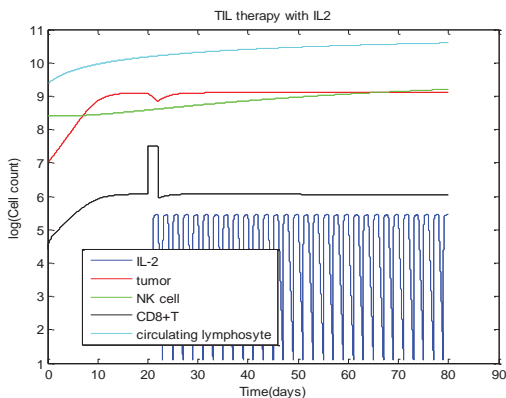


شکل (۴): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) به همراه سایتوکین IL-10 متأثر از شیمی درمانی با دوره ۵ روزه

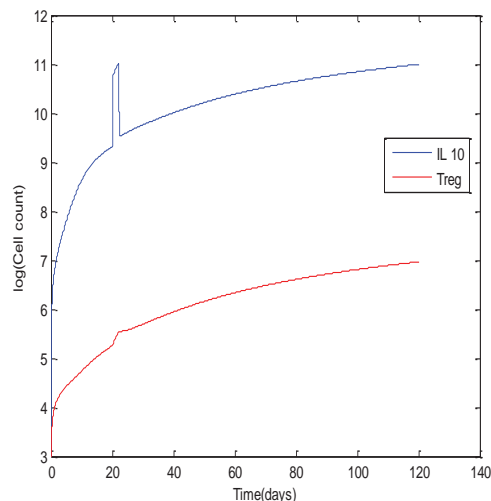
بر اساس این واقعیت که شیمی درمانی بر تمام سلول ها حتی سلول های میزبان نیز تأثیر منفی دارد به دنبال این هستیم که سیکل زمانی تزریق را کاهش دهیم از این رو با دوره زمانی ۱۰ روز و با همان دز قبلی تأثیر شیمی درمانی را بررسی می کنیم. نتیجه شبیه سازی بصورت شکل (۵) بدست آمده است.



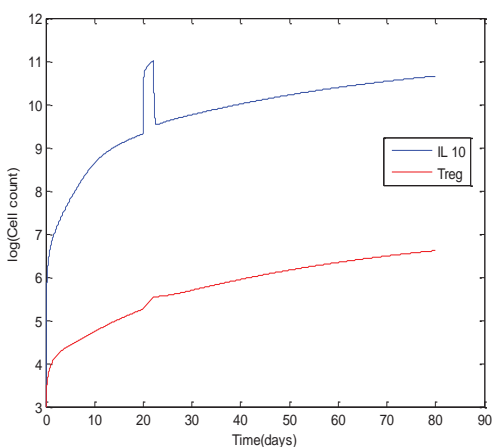
شکل (۵): پاسخ سیستم ایمنی به همراه شیمی درمانی با دوره ۱۰ روزه در مهار رشد سلول های تومور با تعداد زیاد (10^7)



شکل (۹): پاسخ سیستم ایمنی با تزریق TIL(CD⁸⁺T) و IL-2

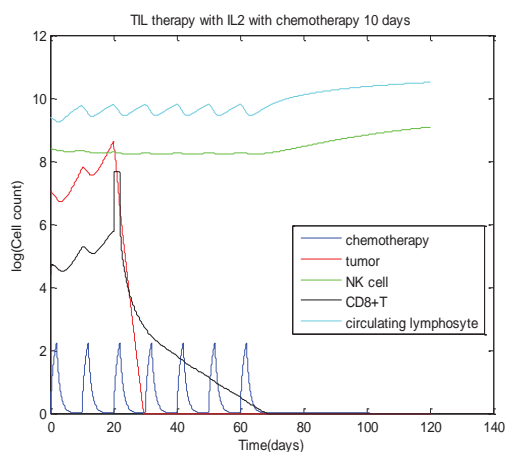


شکل (۸): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) و IL-10 متأثر از تزریق TIL(CD⁸⁺T)



شکل (۱۰): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) به همراه سایتوکین IL-10 متأثر از تزریق TIL(CD⁸⁺T) و IL-2

حال شیمی درمانی با دوره زمانی ۱۰ روز که به تنهایی در درمان تومور موثر نبود را با تزریق TIL و IL-2 ترکیب می کنیم. نتایج در شکل های (۱۱) و (۱۲) نمایش داده شده اند.

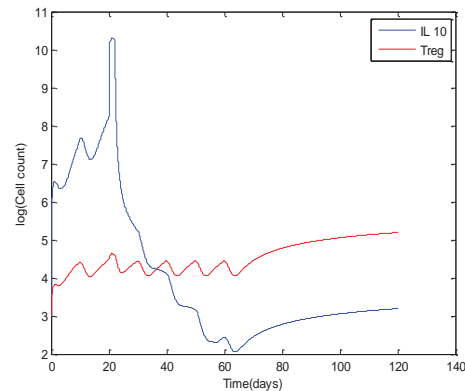


شکل (۱۱): پاسخ سیستم ایمنی با تزریق TIL(CD⁸⁺T) و IL-2 و شیمی درمانی با دوره ۱۰ روزه

دیده می شود که یک پالس افزایش در IL-10 ایجاد شده است. در شواهد فیزیولوژیکی [۱۶] داریم که افزایش CD⁸⁺T منجر به افزایش IL-10 می شود تا کنترلی در میزان سلول های ایمنی صورت گیرد. در واقع با افزایش لنفوسیت های T، سلول های Treg تحریک می شوند که باعث ترشح IL-10 جهت کنترل بر تعداد این لنفوسیت ها می گردند. نتایج بدست آمده از شبیه سازی کاملاً با این شواهد فیزیولوژی منطبق می باشند.

بار دیگر درمان TIL را با IL-2 بررسی می نماییم. IL-2 یک عامل سایتوکاین جهت فعال شدن NK ها و لنفوسیت های T است. این نوع درمان معمولاً به همراه درمان TIL و به صورت چند پالس بعد از تزریق TIL صورت می گیرد. تزریق IL-2 بعد از تزریق TIL در روز ۲۱ ام با دوره زمانی ۲ روزه به مدت ۶۰ روز صورت گرفته است. با مطالعاتی که در زمینه تعامل سیستم ایمنی و تومور صورت گرفته این نتیجه حاصل شده است که IL-2 نه تنها باعث تحریک CTL ها می شود بلکه سلول های Treg را نیز تحریک می کند که باعث ترشح بیشتر IL-10 در کنترل، جهت مهار رشد CTL ها می شود که خود این عامل باعث از بین رفتن تاثیر درمانی IL-2 در حذف تومور است. به عبارتی تقویت سیستم ایمنی که هدف ایمونوتراپی است محقق نمی شود و این واقعیت در شکل های (۹) و (۱۰) شبیه سازی بدست آمده است. حال آنکه بدون در نظر گرفتن این اینترلوکین های مهاری نتایج هر چند مطلوب اما بسیار دور از واقعیت جهت درمان سرطان بدست می آمد.

نتیجه نشان می دهد که شیمی درمانی با دوره زمانی ۱۰ روزه به همراه ایمونوتراپی قادر به درمان قطعی تومور بعد از حدود ۳۰ روز از شروع درمان است. در شکل (۱۲) نیز همانطور که انتظار می رفت IL-۱۰ با تزریق IL-2 افزایش یافته تا جلوی رشد سلول های ایمنی را بگیرد و از بیماری خودایمنی جلوگیری نماید و نیز روند کاهش آن را نیز با هر دوره شیمی درمانی به خوبی نشان می دهد.



شکل (۱۲): رشد سلول های تنظیم کننده (Treg) به همراه سایتوکین IL-10 متاثر از تزریق TIL(CD⁸⁺T) و IL-2 و شیمی درمانی با دوره ۱۰ روزه

۴- نتیجه گیری:

با توجه به نتایج مطالعه [۲۴] روی موش مبتلا به سرطان در زمینه تعامل سیستم ایمنی و تومور با وجود و عدم وجود سلول های Treg، این نتیجه حاصل شد که با تخلیه سلول های Treg، سلول های سرطانی به سرعت از بین می روند اما این امر منجر به بروز بیماری های خودایمنی می گردد. بر اساس این واقعیت، ما در این مقاله سلول های Treg را به عنوان عوامل کنترلی در رشد سلول های ایمنی از جمله CD⁸⁺ به مدل دپیلیس و همکارانش [۱۷] اضافه نمودیم و بر این اساس، مدل ارائه شده در این تحقیق، با واقعیت فیزیولوژیکی بدن انسان سازگارتر می باشد. از آنجا که IL-2 نه تنها باعث تحریک CTL ها می شود بلکه سلول های Treg را نیز تحریک می کند و منجر به ترشح بیشتر IL-10 در جهت مهار رشد CTL ها می گردد که خود این عامل باعث از بین رفتن تاثیر درمانی IL-2 در حذف تومور است [۱۶] و [۲۵]. ما در تحقیق خود با مدل کردن سلول های Treg و IL-10 بر خلاف مرجع [۱۷]، اثر غیر درمانی IL-2 را بطور مجزا در ایمونوتراپی نشان داده ایم. بر اساس رویکرد دوم بیان شده جهت تقویت پاسخ های ایمنی در برابر تومورها، به جستجوی سایتوکین هایی هستیم که تاثیر بسزایی در افزایش فعالیت سلول های T اختصاصی تومور بویژه CTL های CD⁸⁺ دارند و از طرفی هیچگونه تأثیری در تحریک سلول های Treg ندارند. از اینرو سایتوکین هایی نظیر IL-12، IL-15 و IL-21 جهت بکارگیری در ایمونوتراپی بر اساس مطالعات فیزیولوژیکی پیشنهاد می گردند که می توانند از اهداف آتی برای مدلسازی قرار گیرند. از آنجا که IL-12 یک واسطه اصلی پاسخ های ایمنی ذاتی اولیه

به میکروب های داخل سلولی و القا کننده کلیدی ایمنی سلولی و پاسخ های ایمنی اختصاصی به این میکروب هاست، وجود IL-12 برای آغاز یک توالی از پاسخ ها که ماکروفاژها، سلول های NK و لنفوسیت های T را به کار می گیرد و منجر به ریشه کنی میکروب های داخل سلولی می شود، بسیار مهم است. این اینترلوکین یک پیوند بین ایمنی ذاتی و اختصاصی است که در حین واکنش های ایمنی ذاتی اولیه در مقابل میکروب های داخل سلولی تولید می شود و پاسخ های ایمنی اختصاصی را تحریک می کند و میزان را در مقابل این میکروب ها حفظ می نماید. IL-15 نیز از نظر ساختاری شبیه IL-2 می باشد. به عنوان تحریک کننده برای افزایش T-Cell ها مثل IL-2 عمل می کند. خیلی از فعالیت های بیولوژیکی خاص شده به IL-2 می تواند با IL-15 انجام شود. این اینترلوکین توسط سلول های غیر ایمنی (کراتینوسیت ها و سلول های ماهیچه ای) و سلول های ایمنی (مونوسیت ها و سلول های فعال شده CD⁴⁺) در پاسخ به سیگنال هایی که ایمنی ذاتی را تحریک می کنند تولید می شود. همچنین، IL-21 توسط T-Cell، NKT و T_H17 زیر مجموعه CD⁴⁺T تولید می شود. این اینترلوکین در عملکردهای B-Cell تاثیر گذار است. منجر به فعال سازی CTL ها می شود و CD⁸⁺T، NK Cell و NKT Cell ها را افزایش می دهد. همچنین به عنوان یک داروی ضد سرطان تست شده است و اولین نتایج آزمایش کلینیکی در ملانومای متاستاز روند آهسته در کاهش تومور را نشان داده است. در مقابل با تاثیر ضد سرطانی، IL-21 برای چندین بیماری التهابی نیز شرکت دارد [۲۶]. از اینرو بررسی این اینترلوکین های بیان شده جهت ایمونوتراپی برای ارتقای روش های درمانی جدید در انواع سرطان ها پیشنهاد می گردند.

مراجع

- [1] DePillis, L.G., Radunskaya, A.E., Immune response to tumor invasion. In: Bathe, K. (Ed.), Computational Fluid and Solid Mechanics, vol. 2. MIT Press, Cambridge, MA, (2003b)pp. 1661–1668.
- [2] Daniel Nelson, antitumor immunity and the role of immune-mediated activation of cytotoxic T lymphocyte: A Mathematical Model. ARIZONA STATE UNIVERSITY, December 2004
- [3] Kirschner D., Panetta J.C., Modeling immunotherapy of the tumor-immune interaction. J. Math. Biol. 37 (3), (1998) 235–252.
- [4] Cunningham C., Usman A., Jackson T., Application of the Mathematical Model of Tumor- Immune Interactions for IL-2 Adoptive Immunotherapy to Studies on Patients with Metastatic Melanoma or Renal Cell Cancer. Biological Mathematics: Department of Mathematics, University of Michigan 2005.
- [5] DePillis L., Gu W., and Radunskaya A., "Mixed immunotherapy and chemotherapy of tumors: modeling, applications and biological interpretations," Journal of theoretical biology, vol. 238, pp. 841-862, 2006.
- [6] Adam J.A. and Bellomo N., A survey of models for Tumor-Immune System Dynamics. Birkhäuser, Boston , MA, 1996.

- ¹ Logistic .
- ² .Lokta-Voltera .
- ³ Half Saturation
- ⁴ depillis
- ⁵ Natural Killer
- ⁶ Ordinary Differential Equation .
- ⁷ Cytolytic T Lymphocytes
- ⁸ Panetta
- ⁹ Tumor Infiltrating Lymphocyte
- ¹⁰ Kirschner
- ¹¹ Antigen Presenting Cells
- ¹² Regulatory T cell
- ¹³ Antigen-Induced
- ¹⁴ Major histocompatibility complex
- ¹⁵ Adam
- ¹⁶ Bellomo
- ¹⁷ Michaelis-Menten
- ¹⁸ Grander
- ¹⁹ Debris

- [7] Abbas A. and Lichtman A., "Cellular and Molecular Immunology, (2003) Saunders," ed: Philadelphia.
- [8] Dustin L., Colman D.R., Neural and immunological synaptic relations, *Science*, 298 (2002), pp. 785–789.
- [9] Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L., The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation, *Science*, 285 (1999), pp. 221–227.
- [10] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., *Immunology: The Immune System in Health and Disease*. Taylor and Francis Inc., London 2001
- [11] Von Andrian, U. H., Mackay, C.R., T-cell function and migration, *New England Journal of Medicine*, (2000), pp. 1020–1034.
- [12] Ostrand-Rosenberg S., Tumor immunotherapy: the tumor cell as an antigen-presenting cell. *Current Opinion in Immunology* 6: (1994) 722–727.
- [13] Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* 6, (2005). 345–352.
- [14] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006, 212:28-50.
- [15] Weiner HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001, 182:207-214.
- [16] Wang, H.Y., Wang, R.F., 2007. Regulatory T cells and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19:217–223
- [17] DePillis L. de., Fister K. R., Gu W., Collins C., Daub, M., Gross D., Moore J., and Preskill B., "Mathematical model creation for cancer chemo-immunotherapy,"
- [18] Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D., Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature* 413, (2001)165–171.
- [19] Rideout v.c, "Mathematical and computer modeling of physiological systems", Prentice Hall, 1996.
- [20] Gardner, S.N., A mechanistic, predictive model of dose-response curves for cell cycle phase-specific and nonspecific drugs. *Cancer Res.* 60,(2000) 1417–1425.
- [21] Kuznetsov, V., Makalkin, I., Taylor, M., Perelson, A., Nonlinear dynamics of immunogenic tumors: parameter estimation and global bifurcation analysis. *Bull. Math. Biol.* 56 (2),(1994) 295–321.
- [22] Weiping Zou, Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy, *Nature Immunology*, Volume 6(2006)295-307
- [23] Huang, A.Y.C., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., Levitsky, H., Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264 (5161),(1994) 961–965.
- [24] Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 163: (1999)5211-5218.
- [25] Carlo, E., Totero, D., Piazza, T., Fabbi, M., Ferrini, S., Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*(2007) 56:1323–1334.
- [26] Akdis M., Burgler S., Cramer R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahony L., and Palomares O., "Interleukins, from 1 to 37, and interferon-γ: receptors, functions, and roles in diseases," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 127, pp. 701-721. e70, 2011.