

금 나노입자를 이용한 새로운 당화혈색소의 검출 기술

이수석⁺

Novel Detection Technology for Glycated Hemoglobin using Gold Nanoparticles

Soo Suk Lee⁺

Abstract

We report a novel detection technology for glycated hemoglobin (HbA1c) that is measured primarily to identify the three-month average plasma glucose concentration. In enzymatic measuring of glycated hemoglobin, the generated hydrogen peroxide was then used as a reducing agent of gold (III) for the synthesis of gold (0). Gold nanoparticles obtained from this novel approach were measured by optical and piezoelectric methods. In optical method, we have developed polymer based film-type sensor cartridge filled with all the reagents for glycated hemoglobin analysis and the cartridge worked very well having the detection limit of 0.53% of glycated hemoglobin. On the other hand, quartz crystal microbalance (QCM) sensors also have been developed to determine the abilities of surface modified QCM sensors at various levels of the concentration of glycated hemoglobin to bind gold nanoparticles and limit of detection was 0.90%. Finally, despite of relatively lower sensitivities of QCM sensor and film-type optical sensor than well-plate based optical detection, these two sensors were available to measure the glycated hemoglobin level for diabetes patients and normal person.

Keywords: Glycated hemoglobin(HbA1c), Hydrogen peroxide, Gold nanoparticle, Fructosyl amino acid oxidase(FAOD), Film-type cartridge, Quartz Crystal Microbalance(QCM)

1. 서 론

당뇨를 치료받는 환자에게 발생하는 합병증을 줄이기 위해서는 혈당 수치를 적절한 수준으로 유지하는 것이 중요하다. 한 시점에서 측정하는 혈당 수치는 여러 요인들에 의해 변동이 생길 수 있기 때문에 장기간의 혈당 조절 추이를 파악할 목적으로 가장 널리 사용되는 검사가 당화혈색소(HbA1c)이다[1]. 당화혈색소는 혈액 속의 혈당 수치를 나타내는 매우 중요한 수치로 혈액 속의 포도당이 헤모글로빈과 결합하여 당화된 헤모글로빈(glycated hemoglobin)을 의미한다[2]. 당화혈색소는 당뇨 환자의 지난 2~3개월 동안의 평균 혈당 농도를 나타내기 때문에 몸 안의 혈당 수치를 나타내는 가장 좋은 지표이다[3]. 당화혈색소의 수치를 확인함으로써 당뇨의 관리와 향후 약물 조절

등의 지표로 이용될 수 있으므로 당화혈색소의 측정이 중요하다. 기존의 포도당(glucose)을 측정하는 혈당 측정방법은 측정 시 공복 혹은 식사 후인지에 따라 수치가 크게 다르게 나타날 수 있으나, 당화혈색소를 기반으로 한 측정방법은 식사 여부 등 단기적인 편차에 영향을 받지 않는다는 장점이 있다. 또한 당화혈색소는 높은 혈중 포도당 상태에 혈색소가 노출되면서 형성되므로, 당화혈색소의 수치는 당뇨병 및 신장병증, 망막병증 등의 당뇨 합병증을 판단하는 지표가 될 수 있다[4]. 당화혈색소 수치를 정량적으로 측정하기 위해서는 사람마다 총 혈색소의 양이 다르기 때문에, 총 혈색소 양에 대한 당화혈색소 양의 비율을 퍼센트 농도로 나타낸다. 미국당뇨협회(ADA)에서는 7.0% 이하로 당화혈색소의 수치를 유지하여야 한다고 하며, 정상범위는 4.0~6.5%이다[5].

당화혈색소를 측정하는 방법은 여러 가지가 알려져 있으나 [6-9] 효소를 이용하는 방법과 붕산염 친화성 크로마토그래피가 가장 많이 이용된다. 일반적으로 효소를 기반으로 하는 당화혈색소 측정방법은 혈액 내에 존재하는 헤모글로빈 베타-체인 N-말단의 발린(valine)에 결합된 포도당이 프로테아제(protease)에 의해서 프록토실 발린(FV) 형태로 절단된 다음, 식 (1)과 같이 프록토실 아미노산 옥시다아제(FAOD)와의 반응을 통해서 발생하는 과산화수소(H₂O₂)를 전기화학적 산화반응, 퍼옥시다아제 (peroxidase) 및 발색 기질을 통해 측정하는 것이다[10].

순천향대학교 의약공학과(Department of Pharmaceutical Engineering, Soonchunhyang University)

22 Soonchunhyangro, Shinchangmyeon, Asan, 31538, Korea

⁺Corresponding author: sslee0810@sch.ac.kr

(Received: Oct. 12, 2016, Accepted: Nov. 22, 2016)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

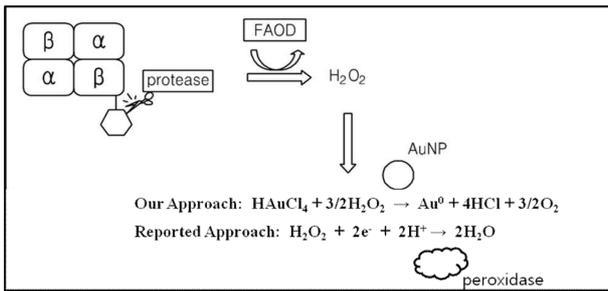
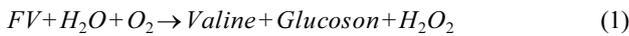


Fig. 1. Reaction scheme for enzyme-based measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) using gold nanoparticle



본 연구에서는 새로운 방식의 당화혈색소의 검출을 위해 FAOD와 반응에 의해 발생하는 과산화수소를 종전의 방식과는 다르게 식 (2)와 같이 금속 이온과 반응시켜 금속 이온이 환원되면 금속 나노입자를 형성하거나, 또는 이미 존재하는 금속 나노입자의 표면에 결합하게 되어 금속 나노입자의 크기가 증가하게 되는 반응을 이용하였다 (Fig. 1). 즉, 과산화수소의 발생 정도는 측정하고자 하는 혈액 중 당화혈색소의 농도와 비례하게 되므로, 금 나노입자의 형성 정도를 측정하여 정량화함으로써, 혈액 시료 중 당화혈색소의 농도를 측정할 수 있게 된다.



이렇게 형성된 금속 나노입자는 광학적인 흡광 방식과 수정 진동자 미량저울(Quartz Crystal Microbalance, QCM)을 이용한 압전 방식을 통해 측정, 분석하였다. 특히 흡광을 기반으로 한 당화혈색소 측정 방법은 Beer-Lambert 법칙에 의해 시료를 통과하는 빛의 경로 길이 즉, 광 경로 길이와 농도, 그리고 흡광 계수에 따라 흡광도를 결정하는 것이다. 혈당과 같이 주기적인 측정이 필요한 질병의 경우 환자가 직접 사용하거나 측정 장비의 이동성이 용이하도록 장비의 소형화가 이루어지고 있다. 측정 장비의 소형화에 따라 샘플의 양과 이에 따라 광 경로 길이 또한 짧아져, 약한 흡광도를 보인다[11]. 따라서, 짧은 광 경로에서도 높은 흡광도를 나타낼 수 있도록 필름 타입의 소형 디바이스 내에서 금 나노입자를 이용하는 새로운 분석법을 개발하였고, 이를 이용하여 당화혈색소를 분석하였다

2. 연구 방법

2.1 당화혈색소의 광학 검출

금 나노입자는 용액 내에서 분산이 잘 이루어지면 와인색을 띠며 540 nm에서 최대 흡수파장을 갖고, 응집이 일어나게 되면 보라색을 띠며 670 nm에서 최대 흡수파장을 갖는다. 따라서 본

연구에서는 다양한 당화혈색소 농도에 대해 540 nm에서 금 나노입자의 흡광도 변화를 측정하였다.

2.1.1 Well plate 내 당화혈색소 측정

당화혈색소 농도가 다른 5종의 전혈을 용혈제를 이용하여 10분 동안 용해시킨 후, 상기 용해물 12.5 ul와 Bacillus sp. 프로테아제가 포함된 용액 80 ul를 well plate에서 5분 동안 반응시켰다. 여기에 citrate로 안정화된 30 nm 금 나노입자 25 ul와 20 mM HAuCl₄ 25 ul를 넣고 기포가 발생하지 않도록 혼합 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후, 106.4 U/ml FAOD 5 ul를 혼합하고, 6분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.2 필름형 센서 카트리지의 디자인과 제작

Fig. 2는 당화혈색소 측정용 칩의 평면도와 단면도를 나타내었다. 평면도에서 보는 것과 같은 패턴의 타원 모양 챔버를 갖도록 폴리에틸렌 테레프탈레이트 필름을 준비하고, 상부 고체 기관 및 하부 고체 기관 위에 1% 솔비톨(sorbitol)과 1% CHAPS가 혼합된 용액 0.7 ul를 떨어뜨려 건조시킨 뒤, 상부 고체 기관에는 0.7 ul의 2 mM HAuCl₄ (1% 솔비톨, 1% CHAPS 버퍼)을, 하부 고체 기관에는 BSA가 코팅된 1.75 nM의 30 nm 금 나노입자 0.7ul를 떨어뜨려 건조시켰다. 여기서 솔비톨과 CHAPS는 사용된 모든 시약이 균일하게 도포되는 것을 도와주며, 건조된 시약이 용혈과 만나 고르게 분산이 되도록 도와주는 역할을 한다. 스페이서 역할을 하는 셀룰로스 아세테이트 멤브레인을 상부 고체 기관 및 하부 고체 기관 사이에 위치하도록 칩 아래 단면도와 같이 제작하였다. 각 기관과 멤브레인은 양면 테이프를 이용하여 접합하였다.

2.1.3 필름형 센서칩 내 당화혈색소 측정

당화혈색소 농도가 다른 5종의 전혈을 well plate 실험과 동

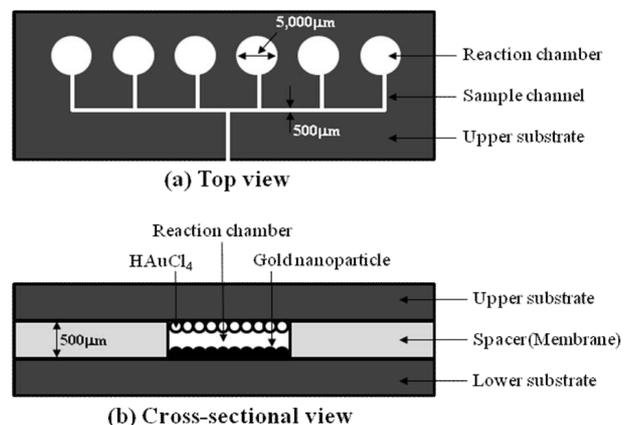


Fig. 2. (a) Top view and (b) cross-sectional view of film-type sensor cartridge for the detection of glycated hemoglobin.

일한 용혈제를 이용하여 10분 동안 용해시켰다. 용해물 5 ul와 프로테아제가 포함된 용액 32 ul를 혼합하고, 5분 동안 반응시켜 단백질을 분해시켰다. 이후, 100 U/ml의 FAOD 2 ul를 혼합하고, 35 ul를 칩의 주입구에 넣은 다음, 플런저를 이용하여 시약이 도포된 챔버로 샘플을 이동시켰다. 챔버의 상, 하부에 완전 건조된 시료는 샘플에 의해 용해되면서 반응이 시작되고, 10분간 반응을 진행한 이후 챔버에서 일어나는 변화를 540 nm 파장에서 측정하여 흡광도 값을 구하였다.

2.2 당화혈색소의 압전방식(piezoelectric) 검출

수정진동자 미량저울은 수정의 압전 효과를 이용한 대표적인 압전방식 센서이다[12]. 압전 효과란 특정한 결정성 재료에 응력을 가하면, 기계적 스트레스에 비례하여 결정성 재료의 표면 사이에 전장이 발생되고, 반대로 결정성 재료 표면 사이에 전장을 걸어주면 결정성 재료에 기계적인 변형이 생기는 것으로 전기적 에너지와 기계적 에너지가 상호 변형되는 특이한 현상을 말한다. 기체 중에서 수정진동자 표면 위에서 일어나는 물질의 흡착과 탈착에 의한 공진주파수는 식 (3)과 같이 흡착 혹은 탈착한 질량 변화와 비례한다[13]. 따라서 당화혈색소 측정 반응 과정에서 생성되는 금 나노입자의 질량 변화를 통해 공진주파수의 변화를 측정한다. 실험에 사용한 수정진동자 미량저울 센서와 검출기는 SEIKO EG&G사의 QCM922A 시스템과 센서칩(SiO₂ surface)을 사용하였다.

$$\Delta f = -\Delta m f_0^2 / (\mu \rho_0)^{1/2} A \tag{3}$$

여기서, Δf는 공진주파수의 변화, f₀는 공진주파수, Δm은 수정진동자 표면의 질량변화, μ는 수정진동자의 전단탄성률, ρ₀는 수정진동자의 밀도, A는 수정진동자의 표면적이다.

2.2.1 수정진동자 표면 개질

수정진동자의 SiO₂ 센서 표면은 알코올 세척 후, 10분간 자외선-오존 세척기에서 활성화하고, 메탄올에 녹인 (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane 5% (v/v) 용액에서 1시간 동안 반응시킨다. 메탄올을 이용하여 두 차례 세척하고 110°C 오븐에서 1시간 동안 방치한 후, 상온으로 냉각하고 다시 메탄올로 세척한다. 결과적으로 수정진동자 센서 표면에 티올(thiol) 그룹을 갖는 자기조립 단층막이 형성되었다.

2.2.2 수정진동자 센서 표면에서의 당화혈색소 검출 반응

당화혈색소 농도가 다른 5종의 전혈을 well plate 실험과 동일한 용혈제를 이용하여 10분 동안 용해시켰다. 용해물 12.5 ul와 프로테아제가 포함된 용액 80 ul를 혼합하고, 5분 동안 반응시켜 단백질을 분해시켰다. 이후 20 mM HAuCl₄ 25 ul 그리고 106.4 U/ml FAOD 5 ul를 혼합하고, 6분 동안 반응시며 주파수의 변화를 측정했다. Fig. 3은 당화혈색소 검출을 위한 수정진

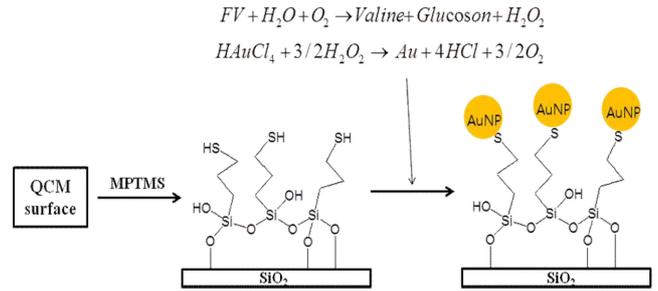


Fig. 3. Reaction scheme of the detection of glycated hemoglobin on the QCM sensor surface.

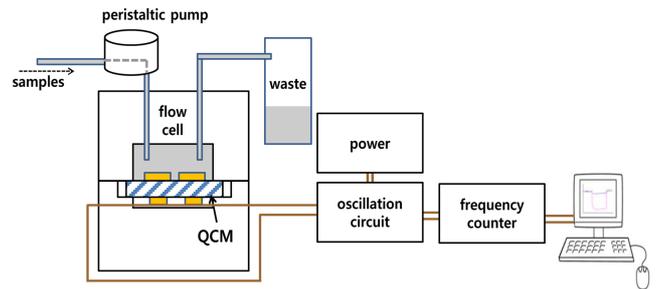


Fig. 4. Schematic diagram of the sensing and fluidic blocks in QCM sensor system.

동자 센서 표면에서의 반응을 도식화한 것이다. 각 반응은 센서 표면에 MPTMS의 형성 단계, 화학반응에 의한 과산화수소 발생, 금 나노입자의 생성 그리고 티올-금 나노입자 콘주게이션 형성 단계로, 구성된다.

Fig. 4는 수정진동자 센서 시스템의 유체제어 모듈의 모식도를 나타낸 것으로, 자체 제작한 유체제어 시스템을 사용하여 실험의 편차를 최소화 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 흡광 광도법에 의한 당화혈색소의 검출

3.1.1 Well-plate와 리더기를 이용한 당화혈색소 검출

Fig. 5는 well-plate 내에서 진행한 당화혈색소 농도에 대한 540 nm에서의 금 나노입자에 의한 흡광도 변화를 도식화 한 것이다. 흡광도 변화량 값은 당화혈색소 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있다. 반응 중에 생성된 과산화수소에 의한 금 양이온(Au³⁺)의 환원 반응에 의해 생성된 금 나노입자는 챔버 내에 미리 첨가된 30 nm의 금 나노입자에 흡착되어 사이즈가 커지면서 흡광도 역시 증가하는 시그널 증폭 효과를 보인다 [14]. 이 시스템에서 당화혈색소의 최소 검출 농도(limit of detection, LOD)는 0.44%이며 식 (4)를 통해서 구할 수 있다[15].

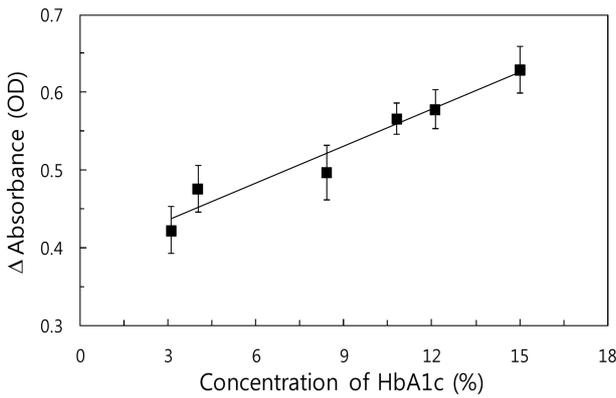


Fig. 5. Variation of the change of absorbance with the concentration of glycated hemoglobin in well-plate.

$$LOD = \mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_s \tag{4}$$

여기서 μ_B 는 blank 샘플의 평균, σ_B 는 blank 샘플의 표준편차, σ_s 는 실험에서 가장 낮은 농도의 표준편차를 의미한다.

3.1.2 시료 내장, 필름형 센서 카트리지를 이용한 당화혈색소 검출

본 연구에서 개발된 폴리머 기반의 필름형 센서 카트리지는 당화혈색소 측정에 필요한 시료를 챔버의 상, 하부에 도포하고 건조시켜, 측정의 재현성과 편의성이 매우 높을 뿐만 아니라 시료의 양을 획기적으로 줄일 수 있는 장점이 있다. 그러나 필름형 센서는 광 경로가 매우 짧아 기존의 측정법 대비 낮은 흡광 광도를 갖게 된다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해서는 신호 증폭과 같은 새로운 화학 반응의 개발이 필요한데, 금 나노입자의 사이즈 증폭은 짧은 광 경로를 극복하고 흡광도를 최대화 할 수 있다. Fig. 6은 필름형 센서칩을 이용하여 당화혈색소 농도에 대한 흡광도를 도식화 한 것으로, well-plate 결과와 마찬가지로 흡광도 값은 당화혈색소 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있다. 식 (4)에 의해서 구한 LOD는

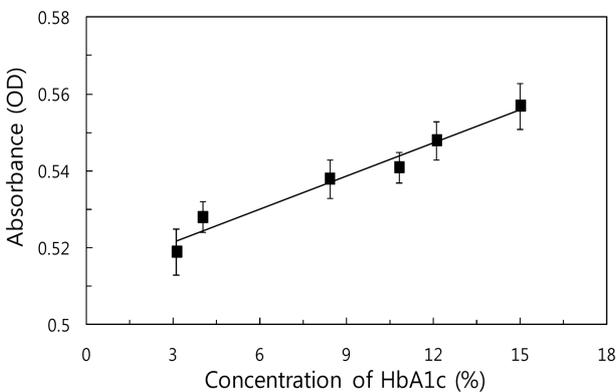


Fig. 6. Variation of the absorbance with the concentration of glycated hemoglobin in film-type sensor cartridge.

0.53%로 well-plate 방식에 비해 성능이 다소 저하되었는데, 이는 신호 증폭 반응의 도입에도 불구하고 광 경로의 축소에 기인한 것으로 해석된다.

3.2 수정진동자 미량센서에 의한 당화혈색소의 검출

수정진동자 센서의 SiO₂ 표면에 (3-mercaptopropyl)-trimetoxysilane(MPTMS)을 도입하여 금 나노입자와 반응하여 켈주게이트 복합체를 형성할 수 있는 티올 분자의 자기조립단 분자막을 형성하였고, 접촉각 분석(63° ± 2°)을 통해 간접적으로 확인하였다. 반응은 튜브 내에서 프로테아제를 이용한 단백질 분해를 진행 한 이후, 수정진동자 표면에서는 과산화수소의 발생, 금 나노입자의 합성 및 표면 티올 그룹과 금 나노입자의 켈주게이션 복합체 형성이 반응이 일어나고, 결과적으로 질량 변화에 의한 공진주파수 변화를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 7에 도식화하였다. 흡광 분석법과 마찬가지로 공진주파수의 변화량은 당화혈색소 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있다. 그러나 식 (4)에 의해서 구한 LOD는 0.90%로 흡광분석 방식에 비해 성능이 다소 저하되었는데, 이는 저농도 시그널의 오차막대 크기에 잘 나타나 있다.

일반적으로 흡광 검출 광학센서는 수정진동자 등과 같은 압전 센서에 비해 온도, 압력 등 주위 환경 요인에 대해 비교적 영향을 덜 받기 때문에 노이즈가 작고 안정적이다. 특히 압전 센서는 온도와 압력에 매우 민감하여 환경적인 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 수정진동자를 이용한 당화혈색소의 검출 민감도가 흡광 검출법에 비해서 다소 낮은 것을 알 수 있다. 특히 대형장비인 well-plate reader를 이용한 흡광 검출 결과에 비해서는 약 2배 정도 감도가 낮았다. 그러나 미국당뇨협회에서는 당화혈색소의 수치가 7% 이하를 유지해야 한다고 권고하고 있으며, 정상인의 수치는 4.0~6.5%로 본 연구에서 진행한 필름형 센서칩, 수정진동자 센서 모두 당화혈색소 측정을 위한 센서로 충분히 사용이 가능함을 알 수 있다.

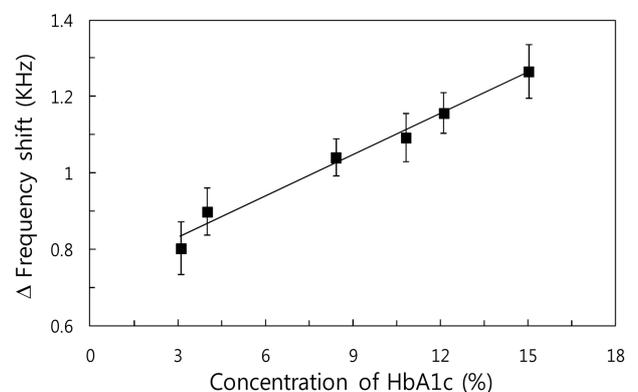


Fig. 7. Variation of the change of frequency shift with the concentration of glycated hemoglobin on QCM sensor.

4. 결 론

본 논문에서는 당뇨환자나 일반인의 몸 안에 2~3개월 혈당 수치의 평균치를 나타내는 지표인 당화혈색소의 새로운 측정방법에 대하여 제안하였다. 제안된 방식은 효소에 의해 분해된 당화혈색소로부터 생성되는 과산화수소를 종래의 전기화학적 산화반응과는 차별적으로 염화금산의 환원제로 이용하여 금 나노입자를 생성시키고, 생성된 금 나노입자의 흡광도를 소형의 필름형 센서칩을 이용하여 측정하였다. 주목할 점은 금 나노입자의 사이즈 증폭 어셈블리가 필름형 센서칩의 단점인 짧은 광경로를 극복할 수 있었다는 점에서 상당한 의미가 있다. 그리고 또 다른 방식으로는 수정진동자 센서의 표면에 티올 분자의 자가조립 단층막을 형성하고, 위에서 생성된 금 나노입자와 컨주게이트 복합체를 형성시켜 이로 인한 질량 증가를 수정진동자 센서의 공진주파수로 변환하여 측정하였다. 두 가지 센서 모두 상용화된 흡광 계측기 대비 측정의 민감도가 다소 낮아지긴 하였으나 정상인의 당화혈색소 농도 범위(4.0~6.5%)를 고려할 때 충분히 당화혈색소 센서로 사용이 가능함을 보여주었다. 끝으로, 최근 체외진단의 동향은 자가 모니터링, 혹은 측정 장비의 이동성이 우수하여 현장에서 빠르고 신속한 저가의 분석을 요구하고 있다. 이러한 관점에서 본 논문에서 제안한 두 센서 시스템은 시스템의 소형화가 가능하며, 분석의 신속성이 우수하고 소량의 샘플 분석으로 측정이 가능하여 혈당과 같이 주기적인 측정이 필요하며, 환자가 직접 사용하거나 장비의 이동성이 요구되는 최근의 연구개발 동향과 정확히 일치한다고 할 수 있다. 앞으로 센서의 소형화와 분석의 신속성이 요구되는 분야에서 지속적인 연구개발을 진행할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교의 지원과 한국연구재단의 이공분야 기초연구사업 지원과제 (NRF-2016R1D1A3B03934762)의 지원으로 수행한 연구과제 결과 중 일부이다.

REFERENCES

[1] J. W. Baynes, S. R. Thorpe, "Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm", *Diabetes*, Vol. 48, No. 1, pp. 1-9, 1999.

- [2] K. P. Peterson, J. G. Pavlovich, D. Goldstein, R. Little, J. England, C. M. Peterson, "What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry", *Clin. Chem.* Vol. 44, No. 9, pp. 1951-1958, 1998.
- [3] F. B. Araujo, D. S. Barbosa, C. Y. Hsin, R. C. Maranhao, D. S. Abdalla, "Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia", *Atherosclerosis*, Vol. 117, No. 1, pp. 61-71, 1995.
- [4] P. K. Singal, N. Khaper, V. Palace, D. Kumar, "The role of oxidative stress in the genesis of heart disease", *Cardiovasc. Res.* Vol. 40, No. 3, pp. 426-432, 1998.
- [5] L. Liu, S. Hood, Y. Wang, R. Bezverkov, C. Dou, A. Datta, C. Yuan, "Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples", *Clin. Biochem.* Vol. 41, No. 7, pp. 576-583, 2008.
- [6] L. Liu, N. Xia, Y. Xing, D. Deng, "Boronic acid-based electrochemical sensors for detection of Biomolecules", *Int. J. Electrochem. Sci.* Vol. 8, No. 9, pp. 11161-11174, 2013.
- [7] V. V. Shumyantseva, E. V. Suprun, T. V. Bulko, A. I. Archakov, "Electrochemical methods for detection of post-translational modifications of proteins", *Biosens. Bioelectron.* Vol. 61, pp. 131-139, 2014.
- [8] C. S. Pundir, S. Chawla, "Determination of glycated hemoglobin with special emphasis on biosensing methods", *Anal. Biochem.* Vol. 444, pp. 47-56, 2014.
- [9] S. H. Ang, M. Thevarajah, Y. Alias, S. M. Khor, "Current aspects in hemoglobin A1c detection: A review", *Clin. Chim. Acta* Vol. 439, pp. 202-211, 2015.
- [10] B. Wang, J. Anzai, "Recent Progress in Electro-chemical HbA1c Sensors: A Review", *Materials*, Vol. 8, pp. 1187-1203, 2015.
- [11] C. E. L. Myhre, C. J. Nielsen, "Optical properties in the UV and visible spectral region of organic acids relevant to tropospheric aerosols", *Atmos. Chem. Phys.*, Vol. 4, pp. 1759-1769, 2004.
- [12] K. A. Marx, "Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface", *Biomacromolecules* Vol. 4, No. 5, pp. 1099-1120, 2003.
- [13] D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, A. J. Ricco, G. C. Frye, E. T. Zellers, H. Woltjen, *Acoustic Wave Sensors*, Academic Press, New York, pp. 80-82, 1997.
- [14] D. Kim, W. L. Daniel, C. A. Mirkin, "Microarray-based multiplexed scanometric immunoassay for protein cancer markers using gold nanoparticle probes", *Anal. Chem.* Vol. 81, No.21, pp. 9183-9187, 2009.
- [15] A. Shrivastava, V. B. Gupta, "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods", *Chronicles of Young Scientists*, Vol. 2, No. 1, pp. 21-25, 2011.