مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی خواص بیولوژیکی ترکیب نشاندار: ^{99m}Tc -DTPA- Herceptin در سلول های سرطانی

سمیرا رسانه[1*]، حسین رجبی[2]، سمیرا حیدری[3]

۱- استادیار پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای
۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- مربی دانشگاه علوم پزشکی همدان

چکیده

سابقه و هدف: هرسپتین یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی، علیه آنتی ژن HER۲ است که برای درمان سرطان های پستان در مراحل ابتدایی که بیان کننده آنتی ژن HER۲ هستند، مورد استفاده قرار می گیرد. هرسپتین، پتانسیل استفاده به عنوان داروی رادیوایمونوسنتی گرافی در تشخیص سرطان های بیان کننده HER۲ را دارد. در این تحقیق نشاندارسازی آنتی بادی هرسپتین با تکنسیم، به عنوان اولین قدم در تولید یک رادیو داروی جدید تشخیصی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: نشاندارسازی با شلاتور DTPA: Diethylene Triamine Pentaacetic Acid انجام گرفت کلیه تست های کنترل کیفی شامل بازده نشاندارسازی، پایداری در بافر و سرم، ایمونوراکتیویته و پایداری در بدن موش سالم برای آن انجام شد.

یافته ها: بازده نشاندارسازی۲±۹۷٪، پایداری در بافر۱ ±۹۶٪ و سرم ۲± ۹۰٪ بعد از ۲۴ ساعت و ایمونوراکتیویته۳ ±۸۳٪ محاسبه شد. میزان اتصال هرسپتین نشاندار به سطح سلول های MCF۷،SKBR۳ و A۴۳۱ با افزایش بیان آنتی ژن HER۲ افزایش می یابد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان دادند که ترکیب نشاندار ^{99m}Tc -DTPA- Herceptin احتمالا می تواند یک کاندیدای امیدوارکننده برای کاربردهای تشخیصی در طیف وسیعی از سرطان های بیان کننده آنتی ژن HER۲ بکار برده شود که نیاز به مطالعات تکمیلی در آینده دارد.

واژگان کلیدی: هرسپتین ، HER۲ ، سرطان پستان، تکنسیم ۹۹

مقدمه

در ایران، سرطان سومین عامل مرگ و میر پس از بیماری های قلبی- عروقی و سوانح است. سالانه بیش از ۳۰ هزار نفر در اثر سرطان جان خود را از دست می دهند. در این میان سرطان پستان، شایع ترین سرطان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ایرانی است. متاسفانه میانگین سن بروز سرطان پستان در زنان ایرانی، ۱۰-۱۵ سال کمتر از کشورهای غربی است (۱۵). اکثر محققین امروزه بر این عقیده اند که تشخیص صحیح و زودرس سرطان، کلید درمان موفق آن است .

روش های مختلفی برای تشخیص سرطان بکار برده می شود. در حال حاضر با کمک تصویر برداری ماموگرافی و MRI وجود توده سرطانی در پستان تشخیص داده می شود. برای تصمیم گیری در مورد روش های درمان قطعی، نمونه برداری (بیوبسی) به صورت باز یا بسته با بی حسی موضعی انجام می گیرد. انجام این روش (بیوبسی) به دلیل تهاجمی بودن، برای بیمار و پزشک خوشایند نیست.

روش های تشخیصی ماموگرافی و ام آر آی، هر دو شامل دسته های تصویربرداری آناتومیکی هستند. در صورت وجود توده ای در بافت، ماموگرافی و ام آر آی بسته به قدرت تفکیک ذاتی (بزرگ و کوچک بودن توده) آن را تشخیص می دهند. ولی هیچ کدام خوش خیم و بدخیم بودن و یا نوع بیان آنتی ژن آن را اعلام نمی کند. معمولا پزشک با توجه به شکل ظاهری توده

نویسنده مسئول :
سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، گروه پژوهشی رادیوایزوتوپ
ایمیل :srasaneh@aeoi.org.ir
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۰۲/۳۱
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۵/۰۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

بیمار را برای انجام بیوبسی انتخاب می کند. البته در این حین تعداد زیادی از بیوپسی بیماران، توده ای خوش خیم گزارش شده است که فقط باعث ایجاد درد و ناراحتی، هزینه و استرس زیاد به بیمار می شود(۳).

بررسی های مولکولی نشان داده اند که سرطانی شدن سلول ها، بیان برخی آنتی ژن ها را در سطح آنها افزایش می دهد(۳،۴،۱۱،۱۳). این یافته می تواند در شناسایی تومور ها بسیار کمک کننده باشد. رادیوایمونوسینتی گرافی یک روش جدید در تشخیص اولیه سرطان است که از بیان آنتی ژن های مختلف در سطح سلول برای شناسایی هدفمند به کمک رادیونوکلئیدها استفاده می کند. طی این روش، آنتی بادی مشخصی علیه آنتی ژن موردنظر انتخاب شده و با رادیوایزوتوپ تشخیصی مناسب نشاندار می گردد. کمپلکس حاصل به بیمار تزریق و پرتو گسیل شده از رادیوایزوتوپ، زمینه را برای تصویربرداری و تشخیص غیر تهاجمی نوع تومور فراهم می کند(۴). رادیوایمونوسینتی گرافی در مرحله بندی بیماران قبل از جراحی، پیگیری بیماران با ریسک بالای ابتلا به سرطان و یا عود مجدد، بسیار موثر است. توجه شود که رادیوایمونوسینتی گرافی، آنتی ژن های سطح سلول توموری را شناسایی کرده و اساسا با دیگر روش های تصویر برداری متفاوت است (۴).

بیشتر انواع فاکتورهای رشد به عنوان محرک های تکثیر سلولی در سرطان زایی مطرح شده اند. HER۲ یک گیرنده فاکتور رشد تیروزین کیناز عرضی غشا است که حاصل بیان ژن HER۲ (erbB۲/neu) بوده، در رشد و تمایز فیزیولوژیک سلول نقش دارد. این پروتئین با سیگنال دهی مسیرهای مرتبط با سرطان: تکثیر، حرکت و تهاجم به بافت های سالم را افزایش می دهد. بزرگی بیان ژن ممکن است۵۰-۱۰۰ برابر حالت نرمال باشد. HER۲ در ۲۵-۲۰٪ سرطان های پستان دارای بیانی بیش از حد نرمال است(۲، ۱۱، ۱۳).

آنتی بادی های مونوکلونال، پروتئین هایی هستند که در درمان هدفمند به طور چشمگیری مورد استفاده قرار گرفته و گیرنده های فاکتور رشد و مسیرهای سیگنال دهی آنها را هدف قرار می دهند(۱۱،۱۳). هرسپتین با نام تجاری Trastuzumab یکی از معروفترین و اولین آنتی بادی مونوکلونال انسانی از نوع IgG۱ است که در ۱۹۹۸به تایید FDA رسیده و در زمینه درمان و تشخیص سرطان پستان مورد استفاده قرار گرفته است. این آنتی بادی به پروتئین خارج سلولی گیرنده HER۲ اتصال پیدا می کند(۲).

تا به حال آنتی بادی های مختلفی به منظور استفاده تشخیصی به روش رادیوایمونوسنتی گرافی با ایزوتوپ های تشخیصی مختلف نشاندار شده است. از بین آنها هرسپتین که علیه HER۲ است با ایزوتوپ های ایندیم-۱۱۱، ید-۱۳۱، گالیم-۶۷ نشاندار شده است(۷، ۱۴، ۸ ، ۱). با تکنسیم-۹۹ هم به روش مستقیم با استفاده ازکیت کربونیل نشاندار شده است(۶).

تکنسیم-۹۹ (عنصر دختر)، از دوشیدن ژنراتور مولیبدن-۹۹(عنصر مادر) بدست می آید. مولیبدن-۹۹، یکی از محصولات شکافت اورانیوم-۲۳۵ است. تکنسیم با نیمه عمر ۶ ساعت و تک انرژی گامای ۱۴۰ کیلوالکترون ولت، بسیار مناسب برای تصویربرداری به روش پزشکی هسته ای است(۵).

.در این پژوهش سعی شده تا با نشاندارسازی هرسپتین با تکنسیم-۹۹ به روش غیر مستقیم و با استفاده از شلاتور DTPA: Diethylene Triamine Pentaacetic Acid یک ترکیب دارویی رادیوایمونوسنتی گرافی برای تشخیص زود هنگام بیان آنتی ژن در سطح سلول های سرطانی ساخته شود.

مواد و روش ها

آنتی بادی هرسپتین از داروخانه ۱۳آبان خریداری شد. رده های سلولی سرطان پستان انسانMCF۷، A۴۳۱ و SKBR۳ از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شد. این سلول ها درجات متفاوتی از آنتی ژن HER۲ را در سطح خود بیان می کنند. سلول های SKBR۳، بیان کننده مقدار زیاد، سلول های MCF۷ مقدار متوسط و سلول های A۴۳۱ درجات کم از این آنتی ژن را در سطح خود بیان می کنند. سلول ها در محیط کشت DMEM همراه با FBS ۱۵ درصد و ال-گلوتلمین ۲ میلی مولار کشت داده شدند. شلاتور(DTPA) Diethylene Triamine Pentaacetic Acid که از شرکت Macrocyclice و کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت سیگما خریداری گردید.

روش کار

نشاندارسازی با کمک شلاتور DTPA طبق روش Perik و همکارانش(۱۴) انجام شد. به طور خلاصه DTPA در بافر سدیم استات pH= ۹ با غلظت۵۰ برابر مولی هرسپتین حل شده و در نهایت به هرسپتین در بافر سدیم استات اضافه می شود. برای اتصال ۲۴ ساعت زمان داده و در نهایت در بافر آمونیم استات pH= ۵/۲ خالص می گردد. برای نشاندارسازی، حدود ۱۰ میلی کوری از تکنسیم-۹۹ با ۲۰۰ میکروگرم هرسپتین متصل به DTPA در دمای اتاق اضافه شده و به آرامی مخلوط می شود(۵ ، ۹).

کنترل کیفی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

۱-تعیین بازده نشاندار سازی: بازده نشاندارسازی توسط TLC با استفاده از نوارهای واتمن شماره ۱ به عنوان فاز ثابت و در بافر سالین به عنوان حلال ارزیابی گردید.

۲- پایداری کمپلکس: پایداری در بافر سالین و سرم خون سنجیده شد به این ترتیب که نمونه های ۱میلی لیتری سرم خون تازه انسانی تهیه گردید. از کمپلکس هرسپتین-تکنسیم (Ciμ۲۵۰) به هر نمونه اضافه و نمونه ها در ۳۷°C انکوبه شدند. نمونه ها در ساعت های ۱، ۲، ۴، ۶ و ۲۴ساعت پس از انکوباسیون توسط TLC بررسی شدند. روش مشابه برای بررسی پایداری کمپلکس در شرایط ۴°C، دمای اتاق و بافرسالین نیز انجام گردید.

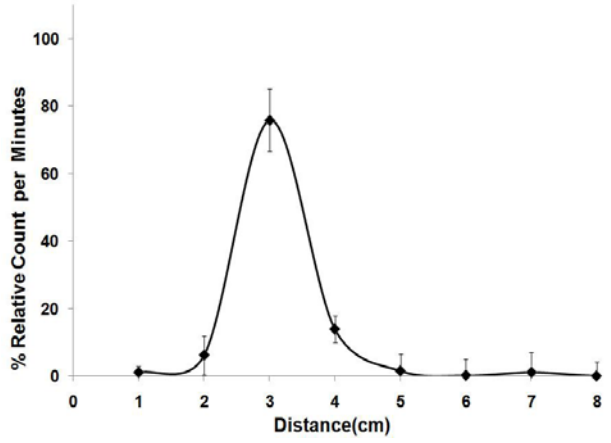
۳-تعیین ایمونوراکتیویته: ایمونوراکتیویته، توانایی آنتی بادی را در اتصال به آنتی ژن مورد نظر پس از انجام پروسه نشاندارسازی بررسی می کند. این تست با استفاده از سلول های سرطان پستان SKBR۳که به صورتHER۲ Overexpress هستند و مطابق با روش Lindmo انجام شد(۱۰).

۴- بررسی سمیت سلولی: در plateهای ۲۴ خانه ای تعداد $۱۰^۴$ سلول در هر چاهک، کشت داده شد. بعد از یک شبانه روز سلول ها سه بار شسته شدند و غلظت های ۰ ، ۲۰، ۵۰ ، ۸۰ و ۱۰۰ نانوگرم هرسپتین نشاندار به چاهک ها اضافه شد. سلول ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در داخل انکوباتور $CO_۲$ استراحت داده شدند. بعد از برداشتن محلول و شسته شو دادن آن ها، محیط کشت اضافه شد. ۲۴ ساعت بعد از تاثیر ترکیب نشاندار، با روش MTT اسی میزان سمیت بررسی و درصد بقای سلولی محاسبه گردید (۱۲). این کار برای هر سه رده سلولی تکرار شد.

۵-توانایی اتصال سلولی: تعداد $۱۰^۶ \times ۵$ در ml ۰/۵ محیط کشت به چاهک ها اضافه شد. غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ نانوگرم از آنتی بادی نشاندار (در ml ۰/۵ محیط کشت) به چاهک ها اضافه شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، سلول ها با ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و اکتیویته در رسوب و سوپرناتانت شمارش شد. این کار برای هر سه رده سلولی انجام شد.

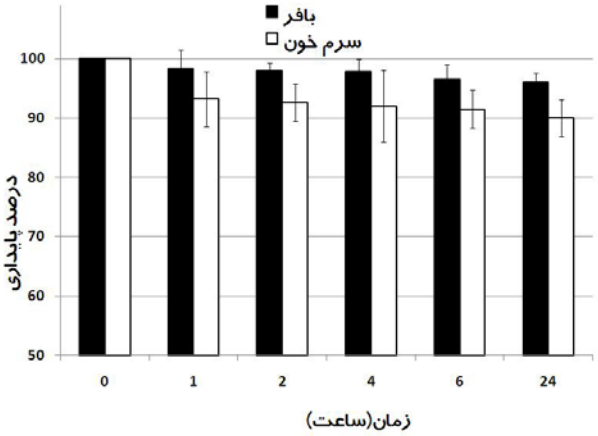
نتایج

بازده نشاندارسازی کمپلکس در ۱ ساعت پس از انکوباسیون بیشتر از ۲±۹۷٪ بدست آمد. همانگونه که در شکل ۱ مشخص است بالاترین اکتیویته در قسمت پایین کاغذ دیده می شود که نشان دهنده اتصال آنتی بادی به تکنسیم است.



شکل ۱. خلوص رادیوشیمیایی نشاندارسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک. شمارش ها از قطعات مختلف کاغذ ثبت شده است و بیشترین شمارش مربوط به هرسپتین-تکنسیم در محل لکه گذاری می باشد.

نتایج بررسی پایداری در شکل ۲ نمایش داده شده است. بعد از یک شبانه روز هرسپتین-تکنسیم در بافر تا ۱±۹۶٪ و در سرم خون تا۲±۹۰٪ پایدار بود که این نتایج پایداری قابل قبولی را نشان می دهد. البته پایین بودن درجه پایداری در سرم خون نسبت به بافر به علت حضور آنزیم های مختلف و اثرگذاری آنها در اتصال بین آنتی بادی و تکنسیم است ولی باز هم در حد قابل قبولی قرار دارد.

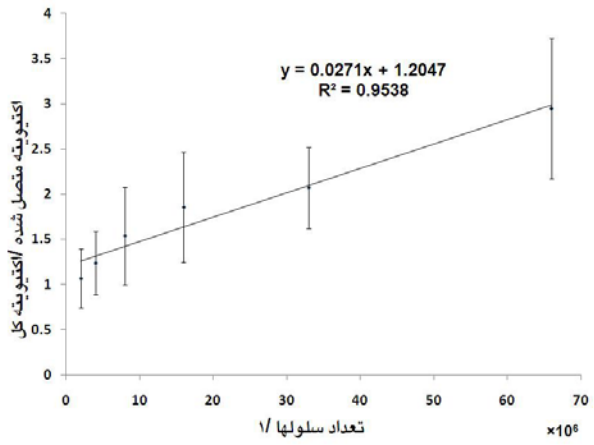


شکل ۲. پایداری in vitro هرسپتین-تکنسیم در بافر فسفات و سرم خون

ایمونوراکتیویته کمپلکس که با کمک سلول های SKBR۳ تعیین شد ۸۳ درصد بدست آمد که نشان دهنده توانایی بالای کمپلکس در اتصال اختصاصی به آنتی ژن مورد نظر است و نتایج آن در شکل ۳ نمایش داده شده است.

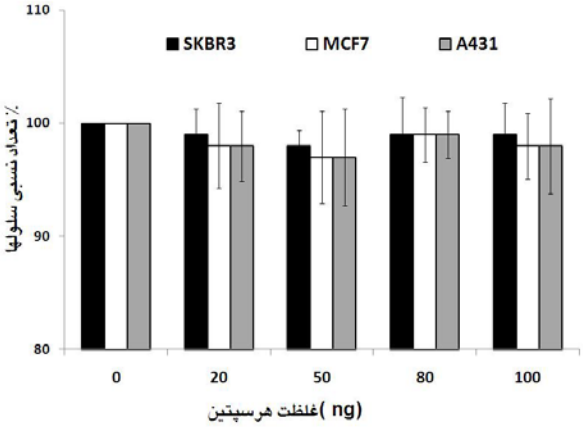
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]



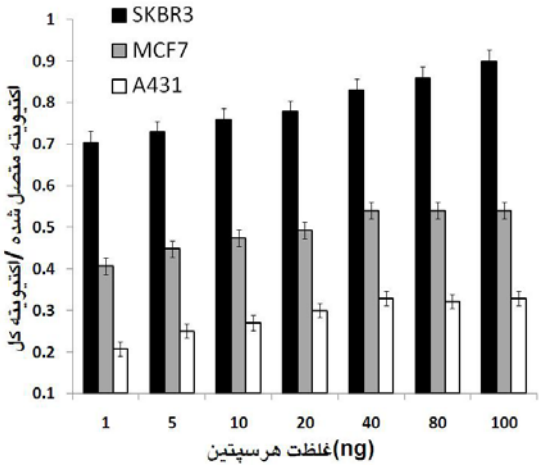
شکل۳. ایمونوراکتیویته هرسپتین نشاندار که از روش Lindmo بر روی سلول های SKBR۳ ۸۳ درصد بدست آمده است

نتایج مربوط به آزمون MTT نشان داد که تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم هیچ کاهش معنی داری در تعداد سلول ها مشاهده نمی شود (p-value >۰/۰۵) و می توان این طور نتیجه گرفت که تا این غلظت ترکیب نشاندار اثر سمیتی بر روی سلول ها ندارد و بنابراین به راحتی می توان در این غلظت اتصال سلولی را بررسی کرد. نتایج این آزمون در شکل ۴ نمایش داده شده است.



شکل ۴. تعداد نسبی سلول ها در غلظت های مختلف هرسپتین نشاندار

توانایی اتصال هرسپتین نشاندار به سلول های سرطان پستان که درجات مختلفی از آنتی ژن HER۲ را بیان می کردند، بررسی و نتایج آن در شکل ۵ نمایش داده شده است. همان طور که مشاهده می شود با افزایش درجه بیان آنتی ژن میزان اتصال کمپلکس نشاندار به سلول ها نیز افزایش یافته است.



شکل۵. میزان اکتیویته اتصالی به سلول ها نسبت به کل اکتیویته اضافه شده در برابر غلظت هرسپتین نشاندار

بحث

در تحقیق حاضر، آنتی بادی هرسپتین که به طور رایج در درمان سرطان پستان مورد استفاده است به صورت غیرمستقیم و با استفاده از DTPA به عنوان چلاتور با رادیوایزوتوپ ^{99m}Tc نشاندار شد. آزمایش های کنترل کیفی روی کمپلکس صورت گرفت. بررسی درجه نشاندارسازی نشان داد ۹۷ درصد تکنسیم ها به آنتی بادی اتصال پیدا کرده و میزان اکتیویته آزاد کمپلکس بسیار پایین است. نتایج آزمون پایداری در بافر در فاصله ی ۶ ساعت ، فقط ۳/۵٪ جدایی آنتی بادی از تکنسیوم را نشان دادند. هم چنین پایداری در سرم بعد از ۲۴ ساعت، ۹۰٪ به دست آمد که بر این اساس شاید به توان گفت کمپلکس مربوطه جهت کارهای درون تنی از پایداری قابل قبولی برخوردار است. با توجه به این که پروسه نشاندارسازی روی ایمونوراکتیویته ی آنتی بادی اثر می گذارد، بررسی ایمونوراکتیویته یکی از تست های کنترل کیفی لازم الاجرا است. بررسی ایمونوراکتیویته نشان داد که کمپلکس توانایی خود را در اتصال به آنتی ژن به خوبی در حد حفظ کرده است.

با توجه به اینکه این کمپلکس برای اولین بار است که ساخته می شود، ابتدا در رده های سلولی مورد بررسی قرار گرفت که در صورت ارائه نتایج قابل قبول وارد فاز بعدی تحقیقات، در موش و در نهایت فاز کلینیکی شود. نکته با اهمیت در این بررسی این است که کمپلکس تهیه شده تشخیصی بوده و میزان غلظت مجاز برای عدم ایجاد سمیت سلولی را باید در نظر گرفت. بر این اساس، با روش MTT میزان سمیت بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزودن غلظت هرسپتین نشاندار تا ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر، هیچ سمیت معنا داری در سلول ها ایجاد نشد (P-value >۰/۰۵).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

یک آزمون مهم دیگر در این زمینه، بررسی توانایی آنتی بادی در شناسایی آنتی ژن در سطح سلول ها می باشد. در این تحقیق سه رده سلولی سرطان پستان A۴۳۱، MCF۷ وSKBR۳ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج میزان اتصال آنتی بادی به رده های سلولی قابل توجه بود. به نحوی که سلول هایی که میزان بالاتری از HER۲ را بیان می کردند، اتصال بیشتری به آنتی بادی از خود نشان دادند. این امر بیانگر عملکرد اختصاصی کمپلکس در شناسایی آنتی ژن مورد نظر می باشد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب نشاندار Herceptin-^{۹۹m}Tc-DTPA احتمالا می تواند یک کاندیدای امیدوار کننده جهت مطالعات تشخیصی درطیف وسیعی از سرطان های بیان کننده آنتی ژن HER۲ باشد که نیاز به مطالعات بیشتری از جمله مطالعات حیوانی در آینده دارد.

سپاسگزاری

از حمایت و پشتیبانی گروه رادیو دارو، به ویژه بخش کشت سلولی پژوهشکده کاربرد پرتوها در پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تشکر و قدردانی می گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

منابع

1. Alirezapour B, Jalilian AR, Bolourinovin F, Moradkhani S. Production and Quality Control of [^{67}Ga]-DOTA-trastuzumab for Radioimmunoscintigraphy. Iran J Pharm Res. 2013; 12: 355–66.

2. Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. Adv Exp Med Bio, 2003; 532: 253-68.

3. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. Nat Med, 2001; 7: 548-52.

4. Borjesson PK, Postema EJ, de Bree R, Roos JC, Leemans CR, Kairemo KJ, van Dongen GA. Radioimmunodetection and radioimmunotherapy of head and neck cancer. Oral Oncol, 2004;40 : 761-72.

5. Chemlal L, Makram S, Zoubir B, Cherrah Y, Faouzi MA. In vitro comparative study of plasma protein binding of 99mTc-DTPA used in renal scintigraphy. Ann Pharm Fr, 2013; 71: 418-22.

6. Chen WJ, Yen CL, Lo ST, Chen KT, Lo JM. Direct ^{99m}Tc labeling of Herceptin (trastuzumab) by ^{99m} Tc(I) tricarbonyl ion. Appl Radiat Isot, 2008; 66: 340-345.

7. Costantini DL. Chan A. Cai Z, Vallis KA, Reilly RM. ^{111}In-labeled trastuzumab (Herceptin) modified with nuclear localization sequences (NLS): An auger electron-emitting radiotherapeutic agent for HER2/neu-amplified breast cancer. J Nucl Med, 2007; 48: 1357-68.

8. Fan YX, Shi WM, Huang KL, Liu QZ, Li KB, Wu JZ, Luo RC . In vivo and in vitro stability of ^{131}I-Herceptin and its form of existence in the blood of rabbits. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010; 30: 2463-5.

9. Hamed MA. New advances in assessment of the individual renal function in chronic unilateral renal obstruction using functional CT compared to ^{99m}Tc-DTPA renal scan. Nucl Med Rev Cent East Eur, 2014; 17:59-64.

10. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Bunn PJ. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J Immunol Methods, 1984; 72: 77-89.

11. Metro G, Mottolese M, Fabi A. HER-2-positive metastatic breast cancer: trastuzumab and beyond.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

Expert Opin Pharmacother, 2008; 9: 2583-2601.

12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 1983; 65: 55-63.

13. Nahta R, Esteva F. HER-2-Targeted Therapy– Lessons Learned and Future Directions. Clin Cancer Res, 2003; 14: 5078-84.

14. Perik PJ, Lub-De Hooge MN, Gietema JA, van der Graaf WT, de Korte MA, Jonkman S, Kosterink JG, van Veldhuisen DJ, Sleijfer DT, Jager PL, de Vries EG. Indium-111-labeled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol, 2006; 24: 2276-82.

15. Widakowich C, Gil T, Cardoso F, Dinh P, Awada A, Piccart-Gebhart M. Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now?. Int J Biochem Cell Biol, 2007; 39: 1375-87.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.20.11.5] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]