

Chất ức chế p97 thúc đẩy tế bào ung thư đại tràng chết theo chương trình

Bùi Khắc Cường^{1,2,3*}, Đỗ Quỳnh Chi¹, Nguyễn Thị Mai Ly⁴

(1) Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân Y

(2) Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân Y

(3) Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức (VG-CARE)

(4) Bộ môn Khoa Sinh hoá, Bệnh viện Quân Y 103

Tóm tắt

Đặt vấn đề: p97 là một protein đa chức năng có vai trò quan trọng trong quá trình sửa chữa tổn thương DNA và các quá trình liên quan đến chết tế bào theo chương trình. Chúng tôi sử dụng CB-5083, một chất ức chế đặc hiệu p97, nhằm mục tiêu đánh giá tác dụng ức chế tế bào tăng sinh theo cụm và thúc đẩy apoptosis trên dòng tế bào ung thư đại tràng HCT116. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm sử dụng chất ức chế p97 CB-5083 (Sellechem) và dòng tế bào ung thư đại tràng HCT116 (mã: CCL-247, ATCC). Thử nghiệm tạo cụm tế bào và thử nghiệm chết tế bào theo chương trình được sử dụng trong nghiên cứu. Phân tích số liệu trên phần mềm ImageJ và GraphPad Prism 9. **Kết quả:** Mật độ và kích thước các cụm tế bào ở nhóm điều trị 0,25 μ M CB5083 nhỏ hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhóm còn lại. Nhóm điều trị 0,25 μ M có tỉ lệ tế bào apoptosis cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm 0,125 μ M và nhóm chứng ($p < 0,0001$). Tỉ lệ tế bào hoại tử ở các nhóm điều trị 0,125 μ M, 0,25 μ M cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,0001$). **Kết luận:** Ức chế p97 bằng CB5083 kìm hãm tế bào tăng sinh theo cụm và thúc đẩy apoptosis trên tế bào ung thư đại tràng dòng HCT116.

Từ khóa: p97, sửa chữa tổn thương DNA, ung thư đại tràng, chết tế bào theo chương trình.

p97 inhibitor promotes apoptosis on colon cancer cells

Bui Khắc Cường^{1,2,3*}, Do Quỳnh Chi¹, Nguyen Thi Mai Ly⁴

(1) Laboratory Animal Research Center, Vietnam Military Medical University

(2) Department of Pathophysiology, Vietnam Military Medical University

(3) Vietnamese - German Centre for Medical Research (VG-CARE)

(4) Department of Biochemistry, Military Hospital 103

Abstract

Background: p97 is a multifunctional protein that plays an important role in DNA damage repair and processes related to programmed cell death. We used CB-5083, a specific p97 inhibitor, to evaluate the effect of inhibiting cluster proliferation and promoting apoptosis on HCT116 colon cancer cells. **Materials and methods:** Experimental research method used p97 inhibitor CB-5083 (Sellechem) and colon cancer cell line HCT116 (code: CCL-247, ATCC). Colony formation assay and apoptotic assay were used in this study. Data were analysed on ImageJ and GraphPad Prism 9 software. **Results:** The density and size of cell colonies in the 0.25 μ M CB5083 treatment group were statistically significantly smaller than the other groups. The 0.25 μ M treatment group had a statistically significant higher percentage of apoptotic cells compared to the 0,125 μ M group and the control group ($p < 0.0001$). The percentage of necrotic cells in the 0.125 μ M and 0.25 μ M treatment groups was statistically significantly higher than the control group ($p < 0.0001$). **Conclusion:** Inhibiting p97 by CB5083 suppressed cell colony formation and promoted apoptosis on HCT116 colon cancer cell line.

Key words: p97, DNA damage repair, colon cancer, apoptosis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư đại trực tràng là một trong những loại ung thư phổ biến nhất trên thế giới. Theo dữ liệu Globocan 2020, ung thư đại trực tràng là loại ung thư phổ biến thứ ba ở nam giới và phổ biến thứ hai

ở nữ giới, đồng thời là nguyên nhân đứng thứ hai gây tử vong liên quan đến ung thư ở cả hai giới [1]. Vào năm 2020, ước tính có khoảng 1,9 triệu ca ung thư đại trực tràng được phát hiện trên toàn thế giới. Ung thư đại trực tràng ở nam giới (1.044.254 trường

Tác giả liên hệ: Bùi Khắc Cường; Email: buikhaccuong@gmail.com

Ngày nhận bài: 5/4/2024; Ngày đồng ý đăng: 10/6/2024; Ngày xuất bản: 25/6/2024

DOI: 10.34071/jmp.2024.3.29

hợp) cao hơn 1,2 lần so với nữ giới (836.471 trường hợp). Tỷ lệ mắc ung thư đại tràng cao nhất ở Châu Âu, Úc/New Zealand và Bắc Mỹ. Tỷ lệ mắc ung thư đại trực tràng có xu hướng thấp ở các vùng Châu Phi và Nam Á. Ước tính đến năm 2040, gánh nặng ung thư đại trực tràng sẽ tăng lên 3,2 triệu ca mắc mới (tăng 63%) và 1,6 triệu ca tử vong mỗi năm (tăng 73%) [2]. Ở Việt Nam, số người mắc ung thư đại trực tràng khoảng 16.000 ca, đứng thứ 5 trong những loại ung thư phổ biến nhất ở cả hai giới, và đang có xu hướng trẻ hóa [3].

Yassuhiko và cộng sự (2004) đã phân tích bệnh nhân ung thư biểu mô đại trực tràng bằng hóa mô miễn dịch và phát hiện ra rằng các mô có ổ di căn gan biểu hiện p97 ở mức cao hơn, trong khi bệnh nhân bị u tuyến đại trực tràng biểu hiện protein ở mức thấp hơn [4]. Một nhóm khác đã báo cáo vào năm 2012 rằng nồng độ p97 trong huyết thanh đã tăng lên ở những bệnh nhân ung thư đại trực tràng [5]. p97 là một protein đa chức năng có vai trò quan trọng trong quá trình sửa chữa tổn thương DNA, chuyển hóa protein và cân bằng nội môi. Nó đóng vai trò như một chất phân tách để chiết xuất các protein mục tiêu từ màng bào quan của tế bào, phức hợp DNA hoặc phức hợp protein và thúc đẩy quá trình thoái hóa, tinh chế, tái chế và tái định cư của chúng. p97 tham gia vào một số quá trình tế bào trong các điều kiện sinh lý, bao gồm kiểm soát chất lượng protein, tiến trình chu kỳ tế bào, các quá trình liên quan đến chết tế bào như chết theo chương trình và tự thực, thoái hóa liên quan đến chất nhiễm sắc, tổng hợp Golgi...[6]

Đã có rất nhiều chất ức chế của p97 được tìm thấy và trải qua các thử nghiệm và điều trị lâm sàng, được phân loại là chất ức chế cạnh tranh ATP hoặc allosteric. Trong đó, CB-5083 là một chất ức chế p97 qua miền D2, cạnh tranh với ATP và khả dụng sinh học qua đường uống [7]. Việc điều trị các tế bào khối u bằng CB-5083 có thể kích hoạt nhánh apoptotic của hệ thống ubiquitin-proteasome (UPS), dẫn đến sự tích tụ các protein đa lượng và giữ lại các chất nền thoái hóa liên quan đến mạng lưới nội chất, gây ra căng thẳng ở lưới nội chất và chết tế bào theo chương trình [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng CB-5083 nhằm mục tiêu đánh giá tác dụng ức chế tế bào tăng sinh theo cụm và thúc đẩy apoptosis trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng HCT116.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chất ức chế đặc hiệu p97 CB-5083 (Selleckchem) có công thức phân tử $C_{24}H_{23}N_5O_2$, có hoạt tính sinh

học sử dụng được qua đường uống, có nồng độ 10mM/ml được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu để đánh giá hoạt tính. CB-5083 được bảo quản -30°C.

Dòng tế bào ung thư đại trực tràng HCT116 được lấy từ nguồn ATCC (mã: CCL-247). Trong quá trình nghiên cứu, tế bào được nuôi cấy, tăng sinh trong môi trường nuôi cấy theo quy trình tiêu chuẩn.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu này được thiết kế trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng HCT116. Để phục vụ cho các thí nghiệm, chúng tôi nuôi duy trì dòng tế bào HCT116. Thử nghiệm tạo cụm tế bào được thực hiện để đánh giá khả năng chống tăng sinh tế bào ung thư của CB-5083. Bên cạnh đó, khả năng ảnh hưởng tới chết tế bào theo chương trình cũng được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy.

Thử nghiệm tạo cụm tế bào: Tế bào ung thư được nuôi cấy trong đĩa 12 giếng, mỗi giếng gieo 300 tế bào, nuôi trong 1ml môi trường. Sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau (0,125 μ M; 0,25 μ M) và nhóm đối chứng là tế bào được nuôi cấy bình thường, không tiếp xúc với CB-5083. Kiểm tra đĩa 2 - 3 ngày/lần và chụp ảnh tế bào dưới kính hiển vi mỗi tuần 1 lần. Sau 2 tuần, tế bào được nhuộm với dung dịch tinh thể tím 1%. Sau đó đĩa tế bào được rửa và sấy khô. Hình ảnh các cụm tế bào đã nhuộm được quét bằng máy scan và phân tích hình ảnh trên phần mềm ImageJ.

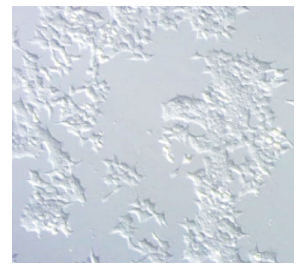
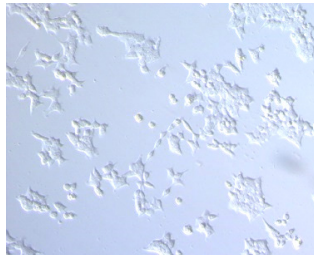
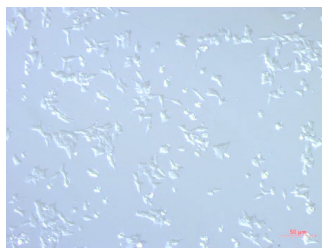
Thử nghiệm chết tế bào theo chương trình: Tế bào được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng, mỗi giếng 3×10^5 tế bào. Sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 được chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau (0,125 μ M; 0,25 μ M) và nhóm đối chứng là tế bào được nuôi cấy trong môi trường bình thường, không tiếp xúc với CB-5083. Tế bào được chụp lại ở các mốc thời gian 0, 24, 48 giờ sau khi cho thuốc thử. Sau 48 giờ, tế bào được xử lý và nhuộm theo quy trình với bộ kit Annexin V-FITC/PI Cell Apoptosis Detection Kit (BD) và phân tích trên hệ thống đếm tế bào dòng chảy BD Lyric.

Phân tích và xử lý số liệu: Để phân tích số liệu, chúng tôi dùng các thuật toán xử lý hình ảnh trên phần mềm ImageJ; thống kê, vẽ đồ thị bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Sử dụng phép kiểm định One-Way ANOVA để kiểm định sự khác nhau của giá trị trung bình khi so sánh nhiều hơn 2 nhóm.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả tăng sinh dòng tế bào HCT116

Tế bào HCT116 được nuôi trong môi trường tương ứng và duy trì trong tủ nuôi cấy tế bào. HCT116 phát triển tốt, tốc độ mọc nhanh, tăng sinh gấp đôi sau khoảng 24 giờ (Hình 1).



(A)

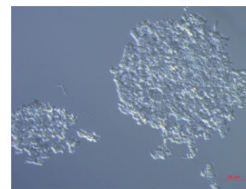
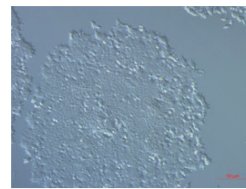
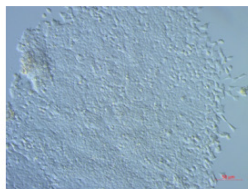
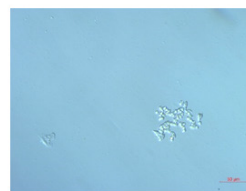
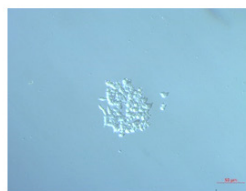
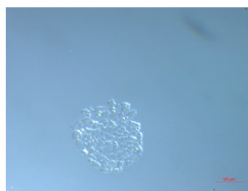
(B)

(C)

Hình 1. Ảnh tế bào sau 24 giờ (A), 48 giờ (B), 72 giờ (C) gieo trên đĩa nuôi cấy

3.2. Kết quả đánh giá khả năng ức chế tạo cụm tế bào bằng thuốc nhuộm tím thể tím (Crystal Violet)

Theo dõi tế bào sau 5 ngày điều trị thấy sự khác nhau tương đối giữa các giếng với các nồng độ chất ức chế khác nhau. Ở hình ảnh chụp dưới kính hiển vi có thể thấy rõ các cụm tế bào ở nồng độ điều trị 0,25 μM mọc rất thưa và nhỏ hơn hẳn so với nồng độ điều trị 0,125 μM và nhóm chứng (Hình 2).



(A)

(B)

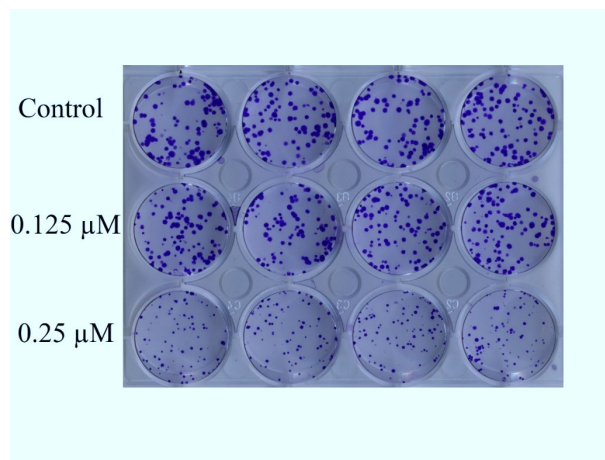
(C)

Ảnh chụp các giếng ở các nồng độ khác nhau sau 5 ngày (hàng trên) và 9 ngày (hàng dưới)

A: Nhóm Control; B: Nhóm 0,125 μM ; C: Nhóm 0,25 μM

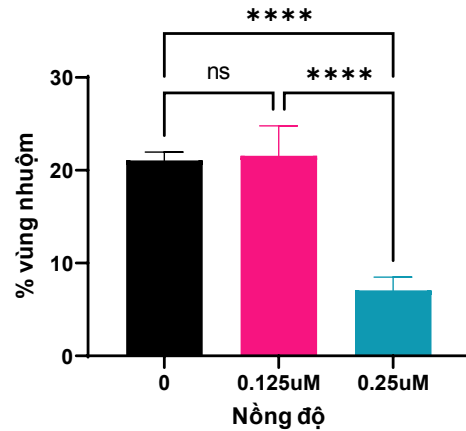
Hình 2. Ảnh chụp các giếng ở các nồng độ khác nhau sau 5 ngày (trên) và 9 ngày (dưới) được điều trị với CB-5083

A: Nhóm chứng; B: Nhóm 0,125 μM ; C: Nhóm 0,25 μM



Hình 3. Điều trị CB-5083 ức chế sự tăng sinh theo cụm của tế bào HCT116

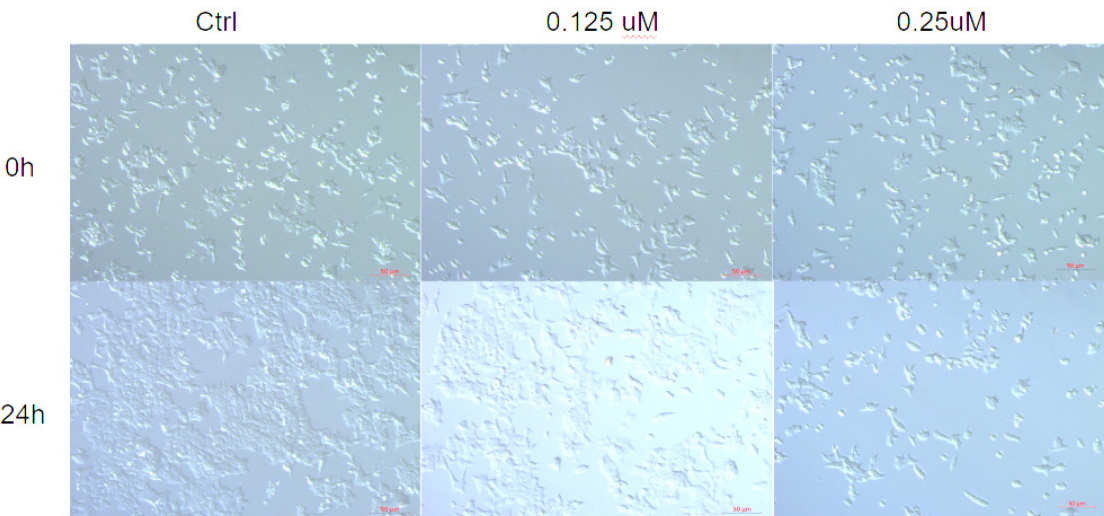
Tế bào được gieo ở mật độ 300 tế bào/giếng trong đĩa 12 giếng. Sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 với các nồng độ 0 μM , 0,125 μM , 0,25 μM . Sau 2 tuần, tế bào được nhuộm tím thể tím (1% trong 20% methanol pha trong nước cất) và chụp hình



Hình 4. Phần trăm diện tích các cụm tế bào trong mỗi giếng với các nồng độ điều trị khác nhau

Các cụm tế bào được nhuộm với Crystal violet, kết quả cho thấy ở nhóm điều trị 0,25 μM CB5083, mật độ và kích thước các cụm tế bào nhỏ hơn so với các nhóm còn lại (Hình 3). Hình ảnh sau đó được xử lý bằng phần mềm ImageJ để xác định mật độ cụm tế bào trên mỗi giếng, kết quả chỉ ra rằng ở nhóm điều trị 0,25 μM CB5083 có sự giảm có ý nghĩa thống kê về mật độ và kích thước của các cụm tế bào so với các nhóm còn lại ($p < 0,0001$, Hình 4).

3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của CB-5083 đối với chết tế bào theo chương trình

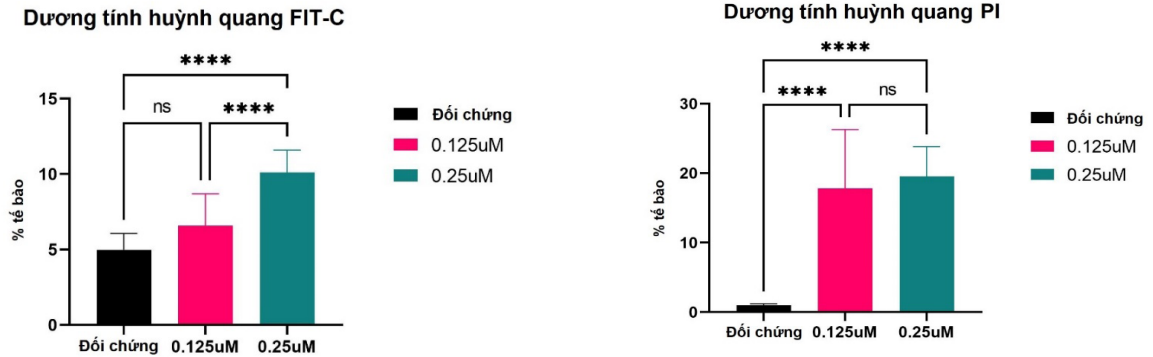


Hình 5. Hình ảnh tế bào HCT116 trong thử nghiệm tế bào chết theo chương trình

Tế bào được gieo ở mật độ 300.000 tế bào/giếng trong đĩa 6 giếng. Sau 24 giờ, tế bào được tiếp xúc với CB-5083 ở các nồng độ điều trị 0 μM, 0,125 μM, 0,25 μM. Tế bào sau đó được chụp hình ở các thời điểm 0 giờ và 24 giờ.

Tại thời điểm 24h đã có sự khác biệt tương đối rõ ở nhóm điều trị 0,25 μM so với hai nhóm còn lại khi quan sát trên kính hiển vi. Lượng tế bào còn sống ở nồng độ 0,25 μM thưa hơn, hầu như không thể mọc thành cụm; trong khi đó nhóm điều trị 0,125 μM ít

hơn nhóm chứng (Hình 5). Sau 48 giờ, tế bào được thu lại và đưa vào phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy với chất chỉ thị AnnexinV/PI, mỗi lần phân tích 10^4 tế bào. Kết quả phân tích được thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Biểu đồ kết quả thử nghiệm apoptosis trên dòng tế bào HCT116

Kết quả ở các nhóm điều trị 0,25 μM có tỉ lệ tế bào apoptosis cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm 0,125 μM và nhóm chứng ($p < 0,0001$). Không có khác biệt thống kê giữa nhóm 0,125 μM và nhóm chứng về tỉ lệ tế bào apoptosis ($p = 0,0754$). Tỉ lệ tế bào hoại tử ở các nhóm điều trị 0,125 μM , 0,25 μM cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,0001$).

4. BÀN LUẬN

Thử nghiệm tạo cụm tế bào là một trong những thử nghiệm đặc trưng cho khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư. Thử nghiệm này sử dụng thuốc nhuộm tinh thể tím để xác định số lượng tế bào còn sống sau khi tiếp xúc với thuốc. Nhuộm tinh thể tím có thể xác nhận rằng CB-5083 làm giảm đáng kể khả năng tồn tại của tế bào HCT116 thông qua hiện màu các cụm tế bào. Có nhiều nghiên cứu đã sử dụng thử nghiệm nhuộm tím tinh thể để đánh giá hoạt tính chống ung thư trên dòng tế bào HCT116. Li H và cộng sự (2021), đã sử dụng thử nghiệm nhuộm tinh thể tím để đánh giá khả năng chống tăng sinh tế bào SW480 và HCT116 của Tetramethylpyrazine, kết quả nhuộm màu cho thấy sự tăng sinh và khả năng tồn tại của cả hai loại tế bào đều giảm dần khi tăng nồng độ điều trị và kéo dài thời gian tiếp xúc [9]. Như vậy, thử nghiệm tạo cụm tế bào tinh thể tím có thể coi là một trong những cách tiếp cận có giá trị trong nghiên cứu tiềm năng chống ung thư *in vitro*. Kết quả đánh giá khả năng ức chế tạo cụm tế bào của chúng tôi đã khẳng định khả năng ức chế tế bào HCT116 *in vitro* của CB-5083. Tỉ lệ cụm tế bào sống ở nhóm nồng độ thuốc 0,25 μM thể hiện rõ sự ức chế tăng sinh HCT116 của CB-5083 với các cụm tế bào nhỏ lẻ, thưa thớt.

Bên cạnh đó, apoptosis đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh học và bệnh lý. Đối với ung thư, thúc đẩy con đường tế bào chết theo chương trình đã được coi là một chiến lược phát triển thuốc chống ung thư [10]. Trong nghiên cứu này, khi quan

sát tế bào HCT116 tiếp xúc với CB-5083, tế bào HCT116 chết theo chương trình có hình ảnh co tròn, tách rời nhau, tế bào kết đặc lại. Điều này phù hợp với các nghiên cứu về apoptosis trước đây. Các dấu hiệu hình thái học của quá trình chết theo chương trình bao gồm nhân kết đặc và phân mảnh, tế bào co lại, bào quan tập trung. Các mảnh vỡ tế bào teo lại, bào quan tự tiêu hủy và được thực bào hoặc thoái biến. Chết tế bào theo chương trình và tăng sinh tế bào luôn liên quan chặt chẽ với nhau. Chúng tôi đã sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy để kiểm tra tác động của CB-5083 đối với quá trình chết theo chương trình và phát hiện ra rằng các tế bào HCT116 được điều trị bằng CB-5083 cho thấy nồng độ chất ức chế càng cao, tỉ lệ tế bào chết theo chương trình càng tăng. Tuy nhiên, ngoài cơ chế kích hoạt con đường tế bào chết apoptosis, tế bào còn có thể chết theo nhiều cơ chế khác, như là gây hoại tử tế bào [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ tế bào hoại tử tăng ở các nhóm điều trị so với nhóm chứng. Do đó, cần có nhiều nghiên cứu hơn để đánh giá tế bào chết theo chương trình cũng như các cơ chế giết chết tế bào ung thư ngoài con đường kích hoạt tế bào chết theo chương trình. Một nghiên cứu đã chỉ ra rằng quá trình tự thực diễn ra để hạn chế các tác động có hại của sự ức chế p97 với CB-5083, và hiệu ứng này đặc biệt đáng chú ý trong các tế bào đã cạn kiệt GCN2 [12] except for younger adults (younger than 50 years. Anderson DJ và cộng sự đã chỉ ra rằng quá trình tự thực có khả năng được kích hoạt bởi CB-5083, phù hợp với các nghiên cứu báo

cáo việc gây ra căng thẳng ở lưới nội chất dẫn đến kích hoạt quá trình tự thực mạnh mẽ [1]. Vì thế, cũng có thể nghiên cứu rộng hơn về các con đường gây chết tế bào khác của CB-5083.

Tuyên bố về xung đột lợi ích: Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2019.324.

5. KẾT LUẬN

Ức chế p97 bằng CB5083 kìm hãm tế bào tăng sinh theo cụm và thúc đẩy apoptosis trên tế bào ung thư đại tràng dòng HCT116.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Globocan, 'Vietnam's cancer 2020'. [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/704-viet-nam-fact-sheets.pdf>
- [2] X. Zhang *et al.*, 'Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 14, pp. E1705-1714, Apr. 2015, doi: 10.1073/pnas.1418820112.
- [3] X. Chen, H. Li, F. Guo, M. Hoffmeister, and H. Brenner, 'Alcohol consumption, polygenic risk score, and early- and late-onset colorectal cancer risk', *eClinicalMedicine*, vol. 49, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101460.
- [4] 'Expression of Valosin-Containing Protein in Colorectal Carcinomas as a Predictor for Disease Recurrence and Prognosis | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research'. Accessed: Jan. 30, 2024. [Online]. Available: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/10/2/651/183652/Expression-of-Valosin-Containing-Protein-in>
- [5] M.-N. Laguë *et al.*, 'Proteomic Profiling of a Mouse Model for Ovarian Granulosa Cell Tumor Identifies VCP as a Highly Sensitive Serum Tumor Marker in Several Human Cancers', *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, p. e42470, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042470.
- [6] S. Costantini, F. Capone, A. Polo, P. Bagnara, and A. Budillon, 'Valosin-Containing Protein (VCP)/p97: A Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Cancer', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 18, Art. no. 18, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms221810177.
- [7] K. Parzych *et al.*, 'The coordinated action of VCP/p97 and GCN2 regulates cancer cell metabolism and proteostasis during nutrient limitation', *Oncogene*, vol. 38, no. 17, pp. 3216–3231, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0651-z.
- [8] H. Li *et al.*, 'Tetramethylpyrazine inhibits proliferation of colon cancer cells *in vitro*', *World J. Clin. Cases*, vol. 9, no. 18, pp. 4542–4552, Jun. 2021, doi: 10.12998/wjcc.v9.i18.4542.
- [9] 'Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions - ScienceDirect'. Accessed: Jan. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016748891100190X>
- [10] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, and B. Baradaran, 'The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review', *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 7, no. 3, pp. 339–348, Sep. 2017, doi: 10.15171/apb.2017.041.
- [11] S. McNabb *et al.*, 'Meta-analysis of 16 studies of the association of alcohol with colorectal cancer', *Int. J. Cancer*, vol. 146, no. 3, pp. 861–873, Feb. 2020, doi: 10.1002/ijc.32377.
- [12] S. Lotfollahzadeh, A. Recio-Boiles, and B. Cagir, 'Colon Cancer', in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Accessed: Jan. 30, 2024. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>