

بررسی میزان شیوع ویروس سیتومگال در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتیک مزمن: یک گزارش کوتاه

چکیده

دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۸ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۳/۱۱/۰۱

زمینه و هدف: گزارش شده است که ویروس سیتومگال انسانی ممکن است در بیماری‌زایی لوسمی لنفوسیتیک مزمن نقش داشته باشد. بنابراین هدف این مطالعه بررسی میزان فراوانی ویروس سیتومگال در این بیماران می‌باشد.

روش بررسی: پس از خون‌گیری از ۴۰ بیمار ارجاع داده شده به آزمایشگاه دکتر دانشبد شهر شیراز از ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱ و جداسازی بافی کوت، DNA استخراج و تعداد ویروس به روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. گلبول‌های خونی شمارش و میزان لاکتات دهیدروژناز سرم با استفاده از کیت و نتایج اختلالات کروموزومی و مارکر CD38 از پرونده بیماران استخراج شد.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران $62/25 \pm 10/49$ سال بود. میانگین گلبول‌های سفید بیماران در زنان به‌طور معناداری بیشتر از مردان بود ($P=0/031$). دو نفر از بیماران دارای ژنوم ویروس سیتومگال بودند. میزان لاکتات دهیدروژناز، مارکر CD38 در بیماران زن و مرد تفاوت معناداری نداشت ($P=0/362$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ویروس سیتومگال انسانی در بیماری‌زایی لوسمی لنفوسیتیک مزمن نقش ایفا نمی‌کند.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوسیتیک مزمن، ویروس سیتومگال، سرطان خون.

فرخنده اژدری^۱، ابوالفضل قشلاقی^۱، آیدا شکیبیا، شیرین حقیقت^۲، مرضیه جمالی دوست^۳، جمال سروری^{۴*}

- ۱- گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شیراز، ایران.
- ۲- گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
- ۳- مرکز تحقیقات میکروپ شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول: شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه باکتری و ویروس شناسی.
تلفن: ۰۷۱-۳۳۳۰۷۹۵۳
E-mail: sarvarij@sums.ac.ir

مقدمه

لنفوئیدی تقسیم می‌شود.^۳ گروه لنفوئیدی براساس سرعت پیشرفت بیماری و بلوغ سلول‌های نئوپلاستیک به لوسمی لنفوسیتیک حاد (Acute lymphocytic leukemia) و لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic lymphocytic leukemia) تقسیم می‌شود.^۳ عوامل مختلفی مانند وراثت، جهش‌های ژنتیکی، تغییرات اپی‌ژنتیکی، اشعه‌ها، مواد شیمیایی، داروها، سیگار و برخی عوامل ویروسی مانند ویروس لنفوتروپیک انسانی T (Human T-lymphotropic virus type 1)، ویروس اِپستین بار (Epstein-Barr virus)، هرپس ویروس ۶ (Human Herpes Virus 6) و ویروس سیتومگال در ایجاد آن نقش دارند.^۴

مطالعات مختلف نشان داده‌اند ویروس سیتومگال احتمالاً در ایجاد بعضی از سرطان‌های انسانی نقش دارد. اخیراً پروتئین‌ها و ژنوم

ویروس سیتومگال انسانی (Human cytomegalovirus) یک بتا هرپس ویروس شایع است که به صورت نهفته در سلول‌های رده میلوئیدی به صورت مادام‌العمر ماندگار می‌شود.^۱ سرطان خون یکی از سرطان‌های شایع در جهان است که ۸٪ از کل موارد سرطان را تشکیل می‌دهد.^۲ در سال ۲۰۱۸ میزان ابتلا و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان خون در دنیا به ترتیب ۴۳۷۰۳۳ و ۳۰۹۰۰۶ نفر بوده است. رتبه کشندگی سرطان خون در جهان و ایران به ترتیب دوم و پنجم می‌باشد.^۲

سرطان‌های خونی یک گروه ناهمگن از بدخیمی‌های خونی می‌باشد و براساس نوع سلول درگیر به دو دسته کلی میلوئیدی و

بلافاصله پس از خونگیری، تست شمارش کامل گلبول خونی‌های با استفاده از اتوآنالیزور هماتولوژی SysmexKX-21N انجام شد. تعداد گلبول‌های سفید، غلظت هموگلوبین و تعداد پلاکت اندازه‌گیری شده، برای بررسی و آنالیز آماری با نتایج بار ویروس استفاده شد. میزان لاکتات دهیدروژناز نمونه‌های سرمی با استفاده از کیت شرکت پارس ژن و دستگاه هیتاچی ۹۱۷، به‌صورت دو بار تکرار اندازه‌گیری شد. اختلالات کروموزومی رایج شامل حذف در (ATM) 11q و 17p (TP53) و میزان بیان مولکول CD38 از پرونده بیماران استخراج شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها، آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS software, version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. از آزمون Student t و Shapiro-wilk و Mann-Whitney U-test برای مقایسه بین گروهی متغیرهای مستقل استفاده شد. رابطه بین متغیرهای کیفی با استفاده از Chi-square test و یا Fisher's exact test بررسی شد.

یافته‌ها

از ۴۰ بیمار مورد مطالعه ۱۲ نفر زن (۳۰٪) و ۲۸ نفر مرد (۷۰٪) بودند. میانگین سنی بیماران ۱۰/۴۹±۶۲/۲۵ سال و بازه سنی آنها ۴۲ تا ۷۷ سال بود. میانگین سنی بیماران مرد ۱۱/۶۶±۶۳/۳۹ بود، درحالی‌که میانگین سنی بیماران زن ۹/۹۶±۵۹/۵۸ بود. بررسی‌های آماری تفاوت معناداری بین سن بیماران زن و مرد نشان نداد (P=۰/۶۱۰).

میانگین تعداد گلبول‌های سفید بیماران ۱۰/۹۲±۱۰/۲۱×۱۰^۹ بود که در مردان ۱۰/۹۴±۳/۷×۱۰^۹ در لیتر بود. این پارامتر در زنان ۱۰/۴۲±۷/۰۷×۱۰^۹ در لیتر و به‌طور معناداری بیشتر از بیماران مرد بود (P=۰/۰۳۱).

میانگین سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز بیماران ۱۰۳/۵۶±۳۱۷/۱۵ U/L بود. میانگین این پارامتر در بیماران مرد ۱۰۶/۰۶±۳۱۰/۵۴ U/L بود و در بیماران زن ۱۲۷/۹۱±۳۳۳/۷۵ بود. میانگین سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز بیماران زن و مرد تفاوت معناداری نداشت (P=۰/۵۳۲). براساس اطلاعات پرونده بیماران ۷ نفر (۳۱/۸۲٪) از این بیماران برای مارکر CD38 مثبت و ۱۵ نفر

ویروس سیتومگال در سرطان پستان، مغز، پروستات، کولون و غدد بزاقی شناسایی شده‌اند.^۵

در رابطه با مکانیسم‌های سرطان‌زایی ویروس بیان شده است که پروتئین‌های اولیه فوری (Immediate early proteins) ویروس بیان برخی از ژن‌های ویروسی و سلولی را تنظیم می‌کنند. پروتئین IE2 به پروتئین رتینوبلاستوما (Retinoblastoma) متصل می‌شود، همچنین این پروتئین با اتصال به پروتئین سرکوب کننده‌ی تومور p53 مانع از آپوپتوز سلول‌های آلوده می‌شود.^۶

در مطالعه Kostareli و همکاران ارتباط معناداری بین عفونت پایدار و نهفته ویروس سیتومگال و مجموعه‌ای از موارد لوسمی لنفوسیتیک مزمن که ژن IGHV-4 را بیان می‌کند گزارش شد.^۷ بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان فراوانی ویروس سیتومگال در بیماران مبتلابه لوسمی لنفوسیتیک مزمن و همچنین بررسی ارتباط بین این ویروس با مارکرهای رایج پیش‌آگهی لوسمی لنفوسیتیک مزمن می‌باشد.

روش بررسی

انتخاب بیماران و نمونه‌گیری، این مطالعه مقطعی بر روی ۴۰ بیمار مبتلابه لوسمی لنفوسیتیک مزمن ارجاع داده شده به آزمایشگاه دکتر دانشد شهر شیراز از سال ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱ انجام شد. شرط ورود به مطالعه تشخیص قطعی بیماری براساس یافته‌های آزمایشگاهی و ایمونوفنوتایپینگ به روش فلوسیتومتری بود. برای اطمینان از تشخیص، پرونده بیماران بررسی و اطلاعات مربوط به تشخیص قطعی لوسمی براساس نتایج تست‌ها بررسی مجدد شد. افراد به صورت داوطلبانه و پس از پر کردن فرم رضایت‌آگاهانه (کد اخلاق به شماره IR.SUMS.REC.1399.471) وارد مطالعه شدند و خونگیری از آنها انجام شد. روش‌های آزمایشگاهی: از ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA، بافی کوت نمونه‌ها جداسازی و استخراج DNA ویروسی با استفاده از کیت (Roche, Mannheim, Germany) انجام شد در ادامه بررسی وجود یا عدم وجود ژنوم سیتومگال ویروس و بار آن با استفاده از کیت اختصاصی Real-time PCR advanced HCMV (Primerdesign GENSIG, UK) و با کمک دستگاه ABI Onestep Plus (USA) اندازه‌گیری شد.

براساس نتایج مندرج در پرونده بیماران، ناهنجاریهای کروموزومی، حذف در 11q (ATM) و 17p (TP53)، به ترتیب در سه (۷/۵٪) و چهار (۱۰٪) بیمار مشاهده شد. آنالیز آماری ارتباط معناداری بین جنسیت با حذف 11q، (P=۰/۱۵) و یا 17p (P=۰/۳۱۵) نشان نداد. نتایج روش Real time PCR نشان داد که سطح ژنوم ویروس فقط در نمونه سرمی دو نفر (۵٪) از بیماران حد قابل تشخیص (۷۰۰ و ۲۵۵۰ کپی در هر میلی لیتر) بود.

CD38 (۶۸/۱۸٪) منفی بودند. ارتباطی بین وضعیت CD38 و جنسیت بیماران مشاهده نشد (P=۰/۲۶۲). در بررسی پرونده پزشکی بیماران، درصد سلولهای بدخیم (لنفوسیت‌های CD19⁺/CD5⁺)، در ۳۱ بیمار ثبت شده بود. میانگین درصد سلولهای بدخیم (لنفوسیت‌های CD19⁺/CD5⁺) این بیماران ۷۸/۴۱٪ بود. این پارامتر در بیماران مرد ۷۴/۰۳±۳/۷۷ و در بیماران زن ۷۰/۲۶±۴/۹۵ بود. اختلاف معناداری بین بیماران زن و مرد نشان نداد (P=۰/۳۶۲).

جدول ۱: مقایسه پارامترهای بالینی و آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

متغیرهای بالینی	Mean ± SD	Median(Range)
سن	۶۲/۵±۱۰/۴۹	۶۳(۴۲-۷۷)
تعداد گلبول‌های سفید خون ×۱۰ ^۹ /لیتر	۴۹/۱±۱۰/۹۲	۲۹/۹(۳۸-۲۱۵/۲۹)
تعداد مطلق لنفوسیت‌های خون ×۱۰ ^۹ /لیتر	۳۵/۶±۸/۴۴	۲۴/۸۲(۰/۹-۱۹۸/۶۴)
تعداد پلاکت‌های خون ×۱۰ ^۹ /لیتر	۱۷۲/۹۵±۶۵/۰۷	۱۷۷(۴۴-۳۲۷)
هموگلوبین (گرم/دسی لیتر)	۱۳/۷۲±۲/۲۲	۱۴/۴(۷/۲-۱۷/۱۰)
سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز (واحد/لیتر)	۳۱۷/۵±۱۰۳/۵۶	۳۰۱/۵ (۱۶۱-۵۹۹)

بحث

بود.^{۱۱} در مطالعه Kostareli و همکاران ۱۳ بیمار (۱۴٪) از نظر ویروس سیتومگال مثبت بودند.^{۱۲}

همانطور که گفته شد در این مطالعه، ارتباطی بین وضعیت CD38 و جنسیت بیماران مشاهده نشد Redondo-Munoz و همکاران گزارش کردند که CD38 ارتباط بالایی با پتانسیل مهاجرت سلولهای لوسمی لنفوسیتییک مزمن نشان می‌دهد و یک عامل پیش‌آگهی در این بیماران می‌باشد.^{۱۳} نتایج مطالعه دیگری نشان داد که افزایش جمعیت لنفوسیت‌های CD4⁺ که فنوتیپ CD28-CD57⁺ دارند از تغییرات بارز فنوتیپی در بیماران لوسمی لنفوسیتییک مزمن است که با سرولوژی مثبت ویروس سیتومگال در ارتباط می‌باشد.^{۱۴} مطالعات دیگری نیز ارتباط ویروس را با سایر فاکتورهای خونی بررسی کرده‌اند از جمله Xiao و همکاران گزارش کردند ویروس سیتومگال با آلوده کردن مگاکاریوسیت‌ها سبب کاهش پلاکت‌ها می‌شوند.^{۱۵} از مهمترین محدودیت‌های این مطالعه، کمبود اطلاعات پیگیری بیماران به دلیل

نتایج این تحقیق نشان داد که نمونه سرمی دو نفر از بیماران (۵٪) از نظر ویروس سیتومگال مثبت بودند. در تایید مطالعات ما Parry و همکاران هیچ شواهدی مبنی بر ارتباط ویروس سیتومگال و پیشرفت لوسمی لنفوسیتییک مزمن مشاهده نکردند.^{۱۶} Steininger و همکاران گزارش کردند هیچ ارتباطی بین عفونت این ویروس و پیشرفت لوسمی لنفوسیتییک مزمن وجود ندارد.^۹ در یک مطالعه کوهورت آینده‌نگر هیچ ارتباط معناداری بین عفونت ویروس سیتومگال و پیشرفت به سمت لوسمی لنفوسیتییک مزمن مشاهده نشد.^{۱۰}

مطالعات دیگری نیز انجام شده است که نتایجی متفاوتی با نتایج این تحقیق گزارش کرده‌اند به‌عنوان مثال Steininger و همکاران شیوع سرمی ویروس سیتومگال را در ۷۹ نفر (۷۹٪) و ۵۷ نفر (۵۷٪) به‌ترتیب در گروه بیماران و افراد سالم گزارش کردند که معنادار

ارتباطی بین فراوانی ویروس سیتومگال و فاکتورهای خونی وجود ندارد. مطالعات بیشتری برای تایید این نتایج لازم است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی میزان شیوع ویروس سیتومگال در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتیک مزمن" در مقطع دکترای حرفه‌ای در سال ۱۴۰۲ با کد ۲۳۹۸۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی شیراز اجرا شده است.

دوره کوتاه تحقیق بود. همچنین حجم کم نمونه بیماران یکی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه بود؛ که افزایش حجم نمونه بیماران، امکان معنادار شدن برخی فاکتورهای پیش‌آگهی و رابطه‌های متاثر از حجم نمونه افزایش خواهد یافت.

نتیجه‌گیری، با توجه به یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً ارتباطی بین ویروس سیتومگال و لوسمی لنفوسیتی مزمن وجود ندارد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً

References

- Bakhtiyarizadeh S, Hosseini SY, Yaghobi R, Safaei A, Sarvari J., Almost complete lack of human cytomegalovirus and human papillomaviruses genome in benign and malignant breast lesions in Shiraz, Southwest of Iran. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 2017. 18(12): p. 3319.
- Hajizadeh, E. and A. Haji Fathali, Mixture and non-mixture cured models in survival analysis of leukemia patients: A cohort study. *Studies in Medical Sciences*, 2020. 31(10): p. 802-812.
- Hallek, M., Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*, 2019. 94(11): p. 1266-1287.
- Kassahun W, Tesfaye G, Bimerew LG, Fufa D, Adissu W, Yemane T, Prevalence of Leukemia and Associated Factors Among Patients With Abnormal Hematological Parameters in Jimma Medical Center, Southwest Ethiopia: A Cross-Sectional Study. *Advances in Hematology*, 2020.(1):2014152.
- Muhsin MA. Molecular Detection of Human Cytomegalovirus genes in infertile and breast cancer women in Baghdad province. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2014. 3(4): p. 316-322.
- Mohammed A, Kadhim H, Ghani A. Investigation the role of human cytomegalovirus in the invasive ductal breast carcinoma. *Clinical Cancer Investigation Journal*. 2015. 4(2): p. 199.
- Kostareli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N, Darzentas N, Athanasiadou A, Gounari M, Bikos V, Agathagelidis A, Touloumenidou T, Zorbas I, Kouvatsi A. Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia*. 2009 May;23(5):919-24.
- Parry HM, Damery S, Hudson C, Maurer MJ, Cerhan JR, Pachnio A, Begum J, Slager SL, Fegan C, Man S, Pepper C. Cytomegalovirus infection does not impact on survival or time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2016 Aug;91(8):776-81.
- Steininger C, Widhopf GF, Ghia EM, Morello CS, Vanura K, Sanders R, Spector D, Guiney D, Jäger U, Kipps TJ. Recombinant antibodies encoded by IGHV1-69 react with pUL32, a phosphoprotein of cytomegalovirus and B-cell superantigen. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2012 Mar 8;119(10):2293-301.1.
- Parry HM, Damery S, Hudson C, Maurer MJ, Cerhan JR, Pachnio A, Begum J, Slager SL, Fegan C, Man S, Pepper C. Cytomegalovirus infection does not impact on survival or time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*. 2016 Aug;91(8):776-81.
- Steininger C, Rassenti LZ, Vanura K, Eigenberger K, Jaeger U, Kipps TJ, Mannhalter C, Stilgenbauer S, Popow-Kraupp T. Relative seroprevalence of human herpes viruses in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of clinical investigation*. 2009 Jun;39(6):497-506.
- Kostareli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N, Darzentas N, Athanasiadou A, Gounari M, Bikos V, Agathagelidis A, Touloumenidou T, Zorbas I, Kouvatsi A. Molecular evidence for EBV and CMV persistence in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Leukemia*. 2009 May;23(5):919-24.
- Redondo-Munoz J, Escobar-Díaz E, Samaniego R, Terol MJ, García-Marco JA, García-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by $\alpha 4\beta 1$ integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3143-51.
- Pourghaysari B, Moss P. High level of CMV-specific CD4+ and CD8+ cells immune response and correlation between them in B-cell Chronic lymphocytic leukemia patients. *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2009; 7 (4): 235-244.
- Xiao Y, Lin W, Liu Q, Jin R, Fei H. Direct infection of colony forming unit-megakaryocyte by human cytomegalovirus contributes the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2006 Oct;26(5):555-7.

Frequency of cytomegalovirus in patients with chronic lymphocytic leukemia: a brief report

Abstract

Received: 08 Dec. 2024 Revised: 15 Dec. 2024 Accepted: 12 Jan. 2025 Available online: 20 Jan 2025

Farkhondeh Ajdari M.Sc.¹
 Abolfazl Gheshlaghi M.Sc.¹
 Aida Shakiba M.D.¹
 Shirin Haghighat M.D.²
 Marzieh Jamalidoust Ph.D.³
 Jamal Sarvari Ph.D.^{1,4*}

1- Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

2- Department of Internal Medicine, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

3- Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4- Gastroenterohepatology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

* Corresponding author: Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
 Tel: +98-71-32307953
 E-mail: sarvarij@sums.ac.ir

Background: The exact cause chronic lymphocytic leukemia (CLL) is still unknown. Cytomegalovirus (CMV) may play a role in the development of CLL, Therefore, the aim of this study is to investigate the frequency of CMV in patients with CLL and its relationship with blood and genetic factors.

Methods: This cross-sectional study was conducted between April 2020 and October 2022 on 40 CLL patients that referred to Dr. Daneshbod Pathobiology Laboratory (Shiraz, Iran). After taking blood and separating the buffy coat, viral DNA was extracted using a commercial DNA extraction kit and the CMV burden was measured using Real-time PCR assay. Moreover, a blood cell count test was performed. The amount of lactate dehydrogenase of the serum was measured using the kit. Also, common chromosomal disorders and CD38 marker related data were extracted from the file patients. SPSS software and Student's t-test were used to result analysis.

Results: The mean age of the patients was 62.25 ± 10.49 years. Of the 40 patients, 28 were men (70%). The average number of white blood cells was $46.06 \pm 1.49 \times 10^9$, which was significantly higher in women than in men ($p=0.031$). Real-time PCR results showed that two patients (5%) have detectable amounts of CMV virus genome. The level of lactate dehydrogenase, CD38 marker, and the number of malignant cells in male and female patients did not differ significantly ($p=0.362$). Moreover, chromosomal abnormalities include deletions in 11q (ATM) and 17P (TP53), were observed in 3 (7.5%) and 4 (10%) patients, respectively.

Conclusion: Our finding indicated the CMV might not involve in the pathogenesis of CLL disease. More studies are recommended for clarify this finding.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, cytomegalovirus, leukemia.

Copyright © 2025 Ajdari. et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.