



'24

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 65

бр. 4 (септембар)

YU ISSN 04406826
UDC 54.011.93



Век од рођења

оснивача модерне хемије
на Универзитету у Београду

CONFIGURATION AND REACTIVITY OF TEN-
MEMBERED 5,10-SECO-COMPOUNDS OBTAINED BY
FRAGMENTATION OF 5-HYDROXY-STERIODS

M. LJ. MIHAILOVIĆ, LJ. LORENC, M. GAŠIĆ, M. ROGIĆ,¹

A. MELBER² and M. STEFANOVIĆ

Department of Chemistry, Faculty of Sciences¹ and Institute of Chemistry, Technology and

Metalurgy, Belgrade, Yugoslavia

(Received 2 December 1965)

OPENING OF STEROID RING A BY MEANS
OF LEAD TETRAACETATE¹

M. STEFANOVIĆ, M. GAŠIĆ, LJ. LORENC and M. LJ. MIHAILOVIĆ²

Department of Chemistry, Faculty of Sciences

and

Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy,

Belgrade, Yugoslavia

(Received 22 June 1964)

Милутин Стефановић
(1924 - 2009)

Михаило Михаиловић
(1924 - 1998)

Хемијски Преглед
www.shd.org.rs/hp.htm

српско хемијско друштво

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Editor-in-Chief
DRAGICA D. TRIVIĆ
Deputy Editor-in-Chief
VESNA D. MILANOVIĆ
MAŠTRAPOVIĆ
Honorary editor
RATKO M. JANKOV

Volume 65
NUMBER 4
(September)

Годиште 65

број 4
септембар

Publisher
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Игор ПАШТИ, Иван ГУТМАН
Igor Pašti, Ivan Gutman
ЗАШТО ЛИТИЈУМ
WHY LITHIUM? 74

Бранислав КОКИЋ
Branislav Kokić
ОДАБРАНИ НАПРЕЦИ У ОРГАНСКОЈ ХЕМИЈИ У ДРУГОМ
КВАРТАЛУ 2024. ГОДИНЕ
SELECTED ADVANCEMENTS IN ORGANIC CHEMISTRY
PUBLISHED IN THE SECOND QUARTER OF 2024 78

Јелена КИЈАЦ, Катарина МИРЈАЧИЋ МАРТИНОВИЋ,
Милена ЧАВИЋ
Jelena Kijac, Katarina Mirjačić Martinović, Milena Čavić
ЗНАЧАЈ ЦИРКУЛИШУЋИХ ЦИТОКИНА У РАЗВОЈУ
КАРЦИНОМА, ПРОГНОЗИ И ОДГОВОРУ
НА АНТИКАНЦЕРСКУ ТЕРАПИЈУ
THE SIGNIFICANCE OF CIRCULATING CYTOKINES IN CANCER
DEVELOPMENT, PROGNOSIS AND RESPONSE TO
ANTICANCER THERAPY 81

Петар КУКИЋ
Petar Kukić
„ЖЕЛЕ СЛАНИНИЦА - СЛАТКА МЛЕЧНА ПОСЛАСТИЦА“
JELLY BACON - A SWEET MILK DELICACY 91

Сузана ЈОВАНОВИЋ ШАНТА
Suzana JOVANOVIĆ ŠANTA
РАДНА ГРУПА СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА ЗА РЕФОРМУ
НАСТАВЕ ХЕМИЈЕ: ФОРМИРАЊЕ И АКТИВНОСТИ ОД ЈУНА
2022. ДО ЈУЛА 2024. ГОДИНЕ
WORKING GROUP OF THE SERBIAN CHEMICAL SOCIETY FOR
THE REFORM OF CHEMISTRY TEACHING - FOUNDATION AND
ACTIVITIES FROM JUNE 2022 TO JULY 2024 98

Издаје
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК
Драгица Д. Тривић

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ УРЕДНИКА
Весна Д. Милановић Маштраповић

ПОЧАСНИ УРЕДНИК
Ратко М. Јанков

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ
Душанка М. Милојковић Опсеница, Тамара Р. Тодоровић,
Игор М. Опсеница, Милан Р. Николић, Ксенија Стојановић,
Александра Дапчевић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР
Иван Гутман, Душан Сладић, Снежана Зарић, Сузана
Јовановић Шанта, Драган Марковић, Радомир Саичић,
Мелина Калагасидис Крушић, Живорад Чековић
(председник)

Web site: <https://www.shd-pub.org.rs/index.php/HP>

e-mail редакције: hempred@chem.bg.ac.rs

Припрема за штампу и штампа:
РИЦ графичког инжењерства
Технолошко-металуршки факултет
Београд, Карнегијева 4

Насловна страна:
Слободан и Горан Ратковић
RatkovicDesign
www.ratkovicdesign.net
office@ratkovicdesign.net

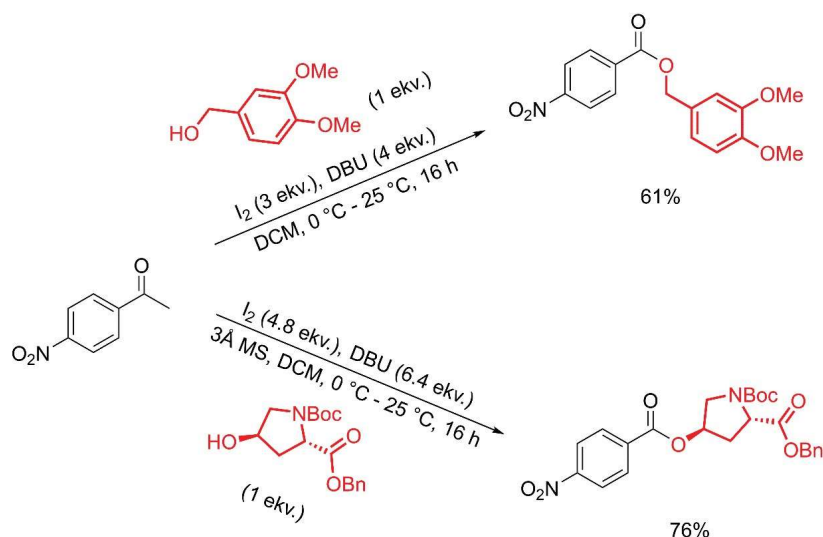


Схема 5. Добијање естара реакцијом метил-кетона са стехиометријском количином примарних и секундарних алкохола

(20), e202403766. <https://doi.org/10.1002/anie.202403766>
 Loh, Y. K., Gojiashvili, L., Melaimi, M., Gembicky, M., Munz, D., & Bertrand, G. (2024). Isolation of a pentadienyl-type radical featuring a central secondary carbon. *Nature Synthesis*, 3, 727-731. <https://doi.org/10.1038/s44160-024-00516-6>
 Rowett, A. C., Sweeting, S. G., Heard, D. M., & Lennox, A. J. J. (2024). A Stoichiometric Haloform Coupling for Ester

Synthesis with Secondary Alcohols. *Angewandte Chemie International Edition*, 63 (21), e202400570. <https://doi.org/10.1002/anie.202400570>
 Wang, T.; Guo, Z.; English, L. E.; Stephan, D. W.; Jupp, A. R.; Xu, M. (2024). Synthesis and Reactivity of the [NCCCO]⁻ Cyanoketenate Anion. *Angewandte Chemie International Edition* 2024, 63 (20), e202402728. <https://doi.org/10.1002/anie.202402728>



Јелена КИЈАЦ, Катарина МИРЈАЧИЋ МАРТИНОВИЋ,
 Милена ЧАВИЋ
 Институт за онкологију и радиологију Србије

Е-пошта: jelena.kijac@ncrc.ac.rs
katarina.mirjacic@ncrc.ac.rs
milena.cavic@ncrc.ac.rs

ЗНАЧАЈ ЦИРКУЛИШУЋИХ ЦИТОКИНА У РАЗВОЈУ КАРЦИНОМА, ПРОГНОЗИ И ОДГОВОРУ НА АНТИКАНЦЕРСКУ ТЕРАПИЈУ

ИЗВОД

Цитокини представљају растворне протеине који поспешују или смањују запаљенске процесе у организму, а њихова функција може да варира у зависности од њихове концентрације, природе сигнала који их активира, као и присуства других цитокина. Установљено је да је запаљенска микросредина саставна компонента свих малигних тумора, те сходно томе цитокини могу играти улогу у про- или антитуморском имунитету. Цитокини своје биолошке функције могу вршити удаљено, преко циркулације, те су пронађене повишене концентрације циркулишућих цитокина код пацијен-

тата који болују од различитих типова малигних тумора. Увођење течне биопсије омогућило је детекцију циркулишућих цитокина из узорака крви пацијената, чиме се добија релевантнија информација о тумору, на молекулском нивоу. Један од методолошких приступа, који се све више развијају у циљу квантификације цитокина из течних биопсија, представљају тзв. мултиплекс есеји, засновани на микрокуглицама, који имају бројне предности у поређењу са стандардним тзв. униплекс методама и огроман потенцијал.

Кључне речи: цитокини, туморска микросредина, течне биопсије, мултиплекс есеји

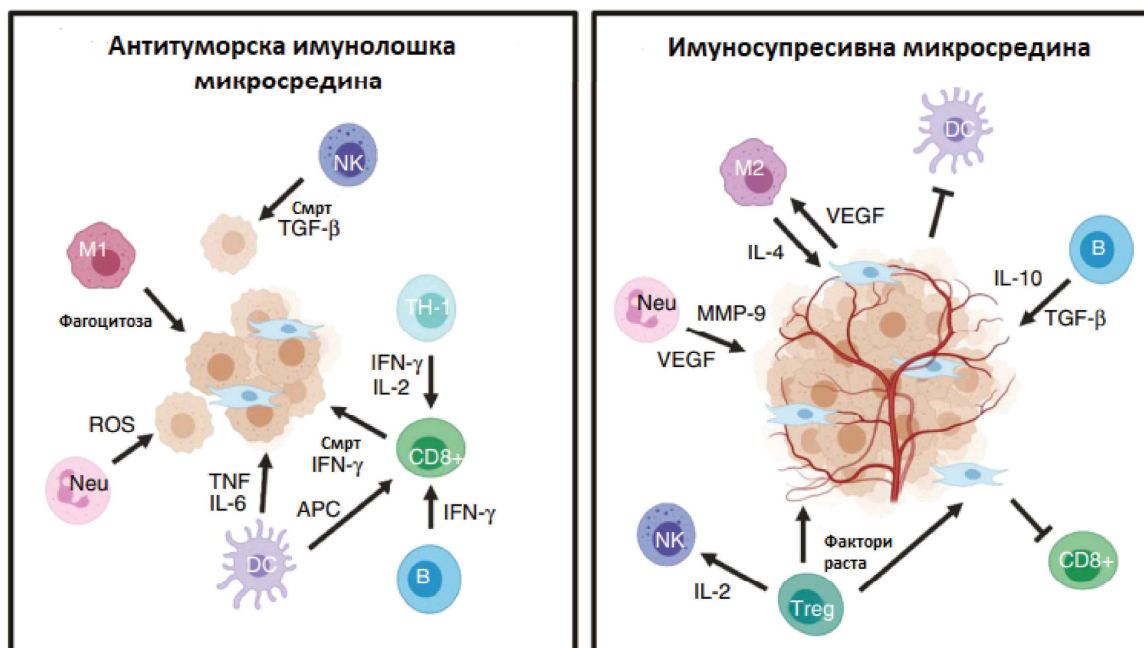
УВОД

Цитокини су мали растворни протеини које продукује велики број ћелија и важни су медијатори комуникације међу ћелијама (Griffin, 2008). Учествују у процесима важним за регулацију имунских и запаљенских реакција, те се могу сматрати хормонима имунског система. Своју функцију остварују аутокриним, паракриним или ендокриним дејством, чиме контролишу пролиферацију, диференцијацију, активност и миграцију ћелија имунског система (Elenkov, 2008; Borish & Steinke, 2023). На основу структуре и функције цитокини се класификују у суперфамилије: интерферони (енг. interferons - IFNs), интерлеукини (енг. interleukins - ILs), фактори некрозе тумора (енг. tumor necrosis factors - TNFs), фактори трансформације раста (енг. tumor growth factors - TGFs), хемотактички цитокини (хемокини) и фактори стимулације колонија (енг. colony stimulating factors - CSFs) (Miller & Krangel, 1992). Одређени цитокини или поспешују или смањују запаљенске процесе, међутим, ефекти које остварују зависе и од њихове концентрације, природе циљне ћелије, природе сигнала који их активира и од присуства других цитокина (Cavaillon, 2001). На пример, иако цитокини обавештавају ћелије имунског система о присуству инфекције и оштећењу ткива, константна продукција цитокина у одређеном делу организма може стимулисати имунске ћелије да производе још више

цитокина, који доводе до стања хроничног запаљења, које заузврат промовише развој тумора (Greten & Grivennikov, 2019). Установљено је да и ћелије тумора могу да продукују цитокине, који аутокриним дејством, позитивном повратном спрегом, могу да стимулишу сопствену пролиферацију, ширење и резистенцију на лекове, а паракриним дејством доводе до активације и диференцијације различитих ћелија у микросредини тумора (MCT) (Kartikasari et al., 2021).

УЛОГА ЦИТОКИНА У РАЗВОЈУ КАРЦИНОМА

Док се мали број малигних тумора јавља као последица мутација у ћелијама заметне линије (јанним ћелијама и сперматозоидима), већина карцинома повезана је са соматским мутацијама и факторима средине (Aggarwal et al., 2009). Многи фактори средине у вези су са неким обликом хроничног запаљења, попут хроничне инфекције, пушења, удисања штетних супстанци и лоших навика у исхрани које воде ка гојазности (Aggarwal et al., 2009). Улога запаљења у туморигенези је данас опште прихваћена, и постало је сасвим јасно да је запаљенска микросредина повезана са настанком и развојем тумора (Mantovani et al., 2008). Реактивне кисеоничне и азотне врсте настале у запаљенском процесу не само да оштећују молекуле ДНК, већ и друге



Слика 1. Утицај цитокина и ћелија имунског система на микросредину тумора. Улога ћелија имунитета у микросредини тумора може бити у спречавању настанка и раста тумора (антитуморска микросредина) или поспешивању настанка тумора (имуносупресивна микросредина), у зависности од типа и концентрације цитокина и врсте тумора (адаптирано из Anderson & Simon, 2020). APC, антиген-презентујућа ћелија; B, B лимфоцит; VEGF, васкуларни ендотелни фактор раста; DC, дендритска ћелија; IL-2, интерлеукин-2; IL-4, интерлеукин-4; IL-6, интерлеукин-6; IL-10, интерлеукин-10; IFN- γ , интерферон-гама; M1, макрофаг популације M1; M2, макрофаг популације M2; MMP-9, металопротеиназа матрикса-9; Neu, неутрофил; NK, урођеноубилачка ћелија; ROS, реактивна кисеонична једињења; TGF- β , фактор трансформације раста-бета; TNF- α , фактор некрозе тумора-алфа; TH-1, помоћнички T лимфоцит-1; Treg, регулаторни T лимфоцит; CD8+, цитотоксични T лимфоцит.

молекуле попут липида и протеина, што мења њихову функцију и води до активирања онкогенних сигналних путева и ефеката који стимулишу раст малигних тумора (Murata, 2018). Као резултат различитих облика запаљења, микросредина тумора, поред самих туморских ћелија и њихове строме, садржи и ћелије урођеног имунитета (макрофаги, неутрофили, мастоцити, дендритске ћелије, урођеноубилачке ћелије – енг. natural killer cells, NK ћелије) и ћелије адаптивног имунитета (Т и Б лимфоцити) (de Visser et al., 2006). Ове различите ћелије комуницирају међусобно директним контактом и продукцијом цитокина, те тако контролишу и утичу на развој тумора (Grivennikov et al., 2010). С обзиром на то да цитокини могу имати различито дејство на запаљенске процесе, њихова експресија као и присуство и активација одређених типова ћелија у МСТ је та која диктира у ком правцу ће бити „нагнута“ равнотежа, и да ли ће се развити запаљенски процес који стимулише или спречава раст тумора (Слика 1) (Grivennikov et al., 2010).

Током урођеног имунског одговора међу најважнијим типовима ћелија које се активирају јесу макрофаги, који се могу класификовати у М1 и М2 макрофаге. Ове две групе се разликују по томе што продукују различите цитокине и рецепторе за цитокине. М1 макрофаги, активирани од стране IFN- γ и микроорганизама, продукују цитокине запаљења као што су: IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 и TNF- α (Seruga et al., 2008; Grivennikov et al., 2010). С друге стране, М2 макрофаги, који се *in vitro* активирају помоћу IL-4, IL-10, и IL-13, продукују цитокине који инхибирају имунски одговор, попут IL-10, TGF- β , као и високе нивое молекула који инхибирају IL-1 и његове рецепторе (Seruga et al., 2008; Grivennikov et al., 2010). Већина цитокина који стимулишу раст и ширење тумора припадају М2 цитокинима – цитокинима које продукују М2 макрофаги (Grivennikov et al., 2010). Ћелије које се активирају током адаптивног имунског одговора су ћелије које изазивају дужи и специфичан имунски одговор, а оне које се налазе најчешће у микросредини тумора су Т лимфоцити. Зреле Т ћелије се деле у две велике групе, у зависности од типа рецептора (енг. T-cell receptors - TCRs) које експресују на својој површини – $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ рецепторе. $\alpha\beta$ Т лимфоцити се даље деле у зависности од њихове ефекторне функције на CD8⁺ цитотоксичне Т лимфоците (енг. cytotoxic T cells - CTLs), који се класификују у Тс1 и Тс2 ћелије, и CD4⁺ помоћничке Т лимфоците (енг. T helper - Th), који могу бити Th1, Th2, Th17, и Tfh подтипови (Mosmann & Li, 1997; Grivennikov et al., 2010; Dong, 2021). Тс1 лимфоцити секретују IFN- γ , док Тс2 група секретује IL-4 и IL-5 (Mosmann & Li, 1997). Th1 ћелије продукују IFN- γ у циљу појачања презентације антигена и убрзавају бактерицидну улогу макрофага, што значи да су важни чиниоци у ћелијском имунитету. Th2 ћелије секретују IL-4, IL-5 и IL-13. IL-4 стимулише пролиферацију Б лимфоцита и продукцију IgE, односно посредује у хуморалном имунитету (Dong, 2021).

Комуникација цитокинима се не одвија само локално, већ цитокини из МСТ могу вршити своје биолошке функције удаљено, преко циркулације, што значи да ако стимулишу хронично запаљење могу промовисати метастазу (Binnewies et al., 2018). Наиме, у мноштву студија пронађене су повишене концентрације циркулишућих цитокина и њихових растворних рецептора у узорцима крви пацијената са различитим типовима карцинома, како код пацијената са примарним туморима, тако и код оних са метастазама, у поређењу са узорцима узетим од здравих особа (Seruga et al., 2008). Повишене концентрације се могу објаснити чињеницом да се цитокини и њихови рецептори у туморским ћелијама често прекомерно продукују, не само захваљујући директном порасту интензитета транскрипције, већ и појачаном стабилизацијом броја и структуре молекула рибонуклеинске киселине (РНК) у ћелији, што изазива прекомерну синтезу протеина цитокина, а што даље појачава развој хроничног запаљења и туморигенезе (Kartikasari et al., 2021). Сет цитокина укључен у процес запаљења у МСТ у одређеном тренутку може бити врло специфичан, што се може приписати чињеници да различите ћелије могу отпуштати различите цитокине који поспешују патолошки процес у специфичном тренутку прогресије болести (Kartikasari et al., 2021). Стога, детекција и мерење концентрације циркулишућих цитокина, могу да помогну у поузданој дијагностици тумора, процењивању фазе болести, одређивању терапије и праћењу развоја болести.

УЛОГА ЦИТОКИНА У ДИЈАГНОСТИЦИ, ПРОГНОЗИ И ОДГОВОРУ НА ТЕРАПИЈУ КОД ОНКОЛОШКИХ ПАЦИЈЕНАТА

Дијагностички значај циркулишућих цитокина

Туморски биомаркери могу водити порекло од туморских ћелија, али и здравих, околних ћелија које реагују на развој тумора у својој околини (Chechlińska et al., 2008). У пракси се за одређене карциноме користе већ познати биомаркери, али до сада се ниједан није показао идеалним (Pavlou et al., 2013). Последњих година, како је разумевање биологије канцера значајно напредовало, велики број доказа указује на то да цитокини играју важну улогу у свим фазама туморигенезе, те потенцијално могу служити као додатни маркери и значајно унапредити дијагностику (Chechlińska et al., 2008). Неки цитокини стимулишу све фазе развоја тумора од настанка до инвазије и метастазирања, док се за неке друге сматра да су специфични за стадијум болести (Long & Raufman, 2011). На пример, повећани нивои TNF α , IL-17, IL-23, IFN- γ и IL-6 укључени су у туморигенезу, док повећане концентрације TNF α , IL-1, IL-6, IL-11, IL-22 и IL-23 посредују у промовисању развоја тумора (Long & Raufman, 2011). Постоје индикације да је TGF- β , иако спада у цитокине који инхибирају запаљенске процесе, због своје улоге у епителијално-мезенхи-

малној транзицији (EMT) активан у промоцији развоја и инвазији тумора (Long & Raufman, 2011). Показано је да су код пацијената са метастатским меланомом пре системске терапије измерене повишене вредности TGF- β у односу на здраве особе (Mirjačić Martinović et al., 2022). Сматра се да IL-1, IL-6 и TNF α учествују у инвазији и метастази тумора (Long & Raufman, 2011). Биолошка улога цитокина повезана је са стадијумом развоја тумора у којој ће дати цитокин учествовати (Long & Raufman, 2011). Неки цитокини највише учествују у одговору на запаљенски процес, док су други укључени у преживљавање и диференцијацију ћелија (Long & Raufman, 2011). Ове разлике у функцији одређују да ли ће одређени цитокин више учествовати у туморигенези или метастази (Long & Raufman, 2011). Ипак, плејотропна карактеристика неких цитокина, тј. способност једног цитокина да испољава различите активности (често и контрадикторне) у зависности од свог перекла, типа и стадијума диференцијације циљне ћелије, неким омогућава да буду укључени у више фаза или све фазе развоја тумора (Chechlinska et al., 2008).

Код здравих људи установљена је релативно ниска концентрација цитокина у крви (Kleiner et al., 2013). Повишене концентрације цитокина и њихових растворних рецептора нађене су у крви особа са различитим патолошким стањима, попут инфекција, аутоимунских болести, повреда ткива и тумора (Ruka, 2001; Chechlinska et al., 2008). Међутим, код већине болести примећена је пролазна прекомерна експресија цитокина, док код тумора продукција цитокина расте са напретком болести и чак доприноси његовој прогресији (Chechlinska et al., 2008). Опсервационе студије су показале да су у крви пацијената који болују од различитих типова карцинома нађене повишене концентрације циркулишућих цитокина (најчешће проинфламаторног цитокина IL-6) приликом дијагнозе примарног тумора и метастазе, у поређењу са узорцима крви здравих људи и бенигну контрола (Seruga et al., 2008). На пример, Кампан и сарадници (Kamran et al., 2020) су у својој студији показали да IL-6 може самостално и у комбинацији са СА-125 служити као добар дијагностички и прогностички маркер за разликовање малигну и бенигну тумора јајника. У студији Пенгјуна и сар. (Pengjun et al., 2013) показано је да IL-8 потенцијално може служити као маркер за постављање дијагнозе колоректалног карцинома, услед значајно повишених вредности концентрација у крви оболелих пацијената и да од свих анализираних цитокина може имати највећи дијагностички значај. Ли и сар. (Li et al., 2018) осмислили су дијагностички модел, који поред традиционалних туморских маркера СЕА и СА-724 користи цитокине IL-6, IL-8 и TNF- α за ефикаснији скрининг и детекцију карцинома желуца.

Прогностички значај циркулишућих цитокина

Постоји велики број студија које указују на то да је тип и ниво продукованих цитокина у корелацији са прогнозом малигну тумора. IL-6 је један од најчешће испитиваних цитокина код онколошких пацијената, а његове високе концентрације у узорцима

крви оболелих пацијената углавном су повезане са лошом прогнозом (Rutkowski et al., 2002; Ebrahimi et al., 2004; Gudbrandsdottir et al., 2021) Показано је да после операције пацијената са саркомом меких ткива високе концентрације IL-6 имају негативан прогностички значај на целокупно преживљавање (Rutkowski et al., 2002). У истој студији је доказано да и IL-8 самостално може служити као прогностички маркер, такође негативан. Приликом анализе нивоа цитокина код пацијената који болују од карцинома бубрега, установљено је да високе концентрације IL-6 и IL-27 у серуму указују на лош исход и враћање болести након лечења (Gudbrandsdottir et al., 2021). Ебрахими и сар. (Ebrahimi et al., 2004) су показали да неколико цитокина – IL-6, IL-10 и IL-1RA – у високим концентрацијама у крви указују на лошу прогнозу карцинома панкреаса. У једној од студија показано је да се у узорцима крви пацијената са метастаским меланомом чија је болест унапредовала налази статистички значајно виша концентрација IL-6 пре терапије, у односу на пацијенте код којих болест није унапредовала (Mirjačić Martinović et al., 2024). С друге стране, када су у питању нивои цитокина који указују на добру прогнозу, Ордитур и сар. (Orditura et al., 2000) показали су да пацијенти који болују од неситноћелијског тумора плућа, који имају повишене концентрације IL-2, показују бољи одговор на хемиотерапију. Ши и сар. (Shi et al., 2022) открили су да повишене вредности IL-1 β и IFN- γ у узорцима крви пацијената који болују од неситноћелијског тумора плућа, током терапије, могу служити као позитиван индикатор успешности хемиоимунотерапије, док повишене вредности IL-6 у крви пацијената указују на мању ефикасност и лош клинички исход. Свакако, фаза развоја тумора је важан прогностички фактор у свим типовима карцинома, а студије указују да постоји конзистентан тренд виших нивоа цитокина у унапредовалим фазама болести него у ранијим фазама (Seruga et al., 2008).

Значај циркулишућих цитокина у одговору на антихематолошку терапију

На продукцију и секрецију цитокина поред самог тумора могу утицати и различите антихематолошке терапије, као што су терапија зрачењем, хемиотерапија и имунотерапија. Терапија зрачењем доводи до повишене секреције цитокина, која се може одржати месецима и годинама након примања терапије (Shan et al., 2007). Та повишена експресија последично води до појаве радијационог оштећења здравог ткива, нпр. оштећења у виду стварања фиброзе (Rubin et al., 1994; Müller & Meineke, 2007). Сматра се да цитокини који су највише укључени у стварање фиброзе различитих ткива у одговору на терапију јесу: IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β (Rubin et al., 1994; Müller & Meineke, 2007). Међутим, у студији Демарија и сар. (Demaria et al., 2004) закључено је да цитокини које продукују активирани Т лимфоцити могу учествовати у регресији неозраченог тумора који је удаљен и ван домета зрачења примарног тумора и тако значајно повољно утицати на здравствено стање пацијента (енг. abscopal effect).

У организмима пацијената који примају хемиотерапију често се развију различити симптоми као последица примене терапије, при чему у тим процесима цитокини представљају значајне посреднике. На пример, установљено је да бројни пацијенти након хемиотерапије развију гастроинтестинални мукозитис, у ком су IL-1 β , IL-6 и TNF- α од кључног значаја, услед чињенице да иницирају процес запаљења који води до оштећења ткива (Keefe, 2004; Sultani et al., 2012). Као последица хемиотерапије неретко се могу јавити и различити поремећаји когнитивних функција (Minisini et al., 2004). У студији која је спроведена на пацијентима који болују од карцинома дојке, установљено је да су повишене концентрације IL-1 β и IL-6 повезане са лошијим одговором пацијената на когнитивном тесту брзине обраде података и брзине одговора на стимулус, као и са проблемима у когнитивним функцијама попут памћења и концентрације (Cheung et al., 2015). Иста студија сугерише да повишене концентрације IL-4 имају улогу у борби против когнитивних поремећаја узрокованих хемиотерапијом.

Када је реч о имунотерапији, циркулишући цитокини могу служити као биомаркери који могу предвидети ризик од имунски посредованих нежељених ефеката изазваних овом терапијом. Ако се ови нежељени ефекти на време открију мерењем нивоа цитокина, омогућава се правовремени прекид терапије и третман имуносупресивним лековима (Stassi et al., 2003).

Добро је познато да секреција одређених цитокина из туморских ћелија може узроковати резистентност на антитуморску терапију. На пример, аутокрини деловање IL-4 и IL-10 ћелија тиреоидног тумора узрокује прогресију тумора и отпорност на хемиотерапију, позитивном регулацијом антиапоптотичких протеина (Yang et al., 2015). Такође, постоје индикације да је IL-10 медијатор који узрокује резистенцију на хемиотерапију леком паклитаксел код пацијенткиња са карциномом дојке, повећањем експресије *BCL2* гена, тј. промовисањем инхибирања апоптозе (Lim et al., 2019).

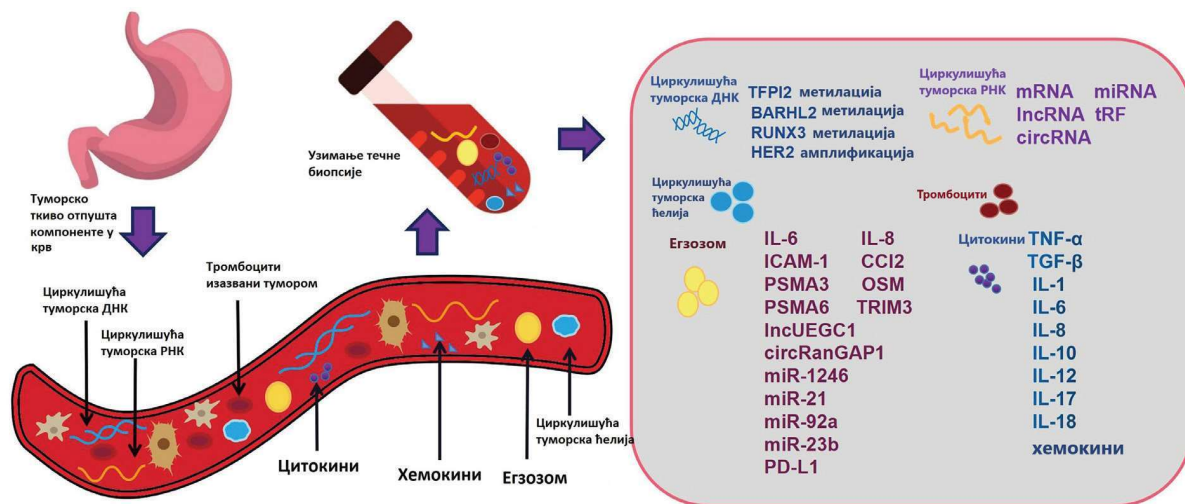
Циркулишући цитокини показују велики потенцијал у развоју дијагностичких и прогностичких алата код различитих типова карцинома. Међутим, проблем представља неконзистентност података у различитим студијама, мали број њихових понављања и/или недовољан број пацијената на којима су вршена истраживања. Да би цитокини ушли у рутинску клиничку праксу потребно је детаљније профилисање сета цитокина, оптимизација потенцијалних панела и њихова валидација. Дефинисање серумских цитокинских профила помоћу течних биопсија, у комбинацији са мерењем концентрације протеина специфичних на тумор у узорцима крви, може значајно смањити морталитет побољшањем дијагностике болести у раним фазама, одређивањем тачног стадијума болести и указивањем на прогресију тумора.

ЦИРКУЛИШУЋИ ЦИТОКИНИ И ТЕЧНЕ БИОПСИЈЕ

Традиционални приступ одређивања молекуларног профила различитих тумора подразумева детекцију мутација на молекулима деоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и/или РНК, изолованих из узорака примарних малигних тумора или метастаза (Siravegna et al., 2017). Из добијеног молекуларног профила датог ткива на основу анализираних ДНК/РНК, одређује се даљи ток дијагностике и терапија. Међутим, молекуларни профил тумора се динамично мења током времена, услед брзе еволуције туморских ћелија које успевају да одолевају утицају бројних спољашњих и унутрашњих фактора (Siravegna et al., 2017). Узорци ткива узети из различитих делова примарног тумора, као и из метастатског ткива, могу показивати значајну хетерогеност (Gerlinger et al., 2012). Управо та хетерогеност може изазвати потешкоће приликом одабира одговарајуће терапије за пацијента, зато што узорак из једне биопсије ткива може да не пружи праву геномску слику тумора (Crowley et al., 2013). С обзиром на то да је процедура узорковања ткивне биопсије инвазивна и болна за пацијента, да постоје потенцијалне хируршке компликације, да неки тумори нису приступачни за узорковање, да сама процедура повећава ризик од метастазирања тумора – узорковање више серијских биопсија није практично, ни препоручљиво (Crowley et al., 2013). Да би се превазишли ови кључни проблеми, дизајниране су течне биопсије, које су се показале као приступ са огромним потенцијалом у онкологији (Finotti et al., 2018).

Течне биопсије се користе за детекцију потенцијалних биомаркера везаних за настанак, раст, ширење тумора из различитих телесних течности, најчешће из крви (Bossmann, 2020). Наиме, људска крв садржи компоненте – фрагменте нуклеинских киселина, протеине, везикуле (нпр. егзозоме), који воде порекло од различитих ћелија у организму, укључујући и ћелије тумора (Слика 2) (Alix-Panabieres et al., 2012; Siravegna et al., 2017; Finotti et al., 2018). Ове компоненте садрже молекуларну информацију о тумору, а њихова концентрација је често пропорционална величини и развоју карцинома (Ma et al., 2022). Код онколошких пацијената се неретко у периферној крви налазе и саме вијабилне туморске ћелије које су се одвојиле од своје туморске масе (Alix-Panabieres et al., 2012; Siravegna et al., 2017). Поред периферне крви, друге телесне течности, као што су урин, пљувачка, плеурална течност, цереброспинална течност, и столица, могу се користити за детекцију биомаркера (Siravegna et al., 2017; Hofman et al., 2019).

Течне биопсије представљају приступ који је минимално инвазиван, економичан, и који веома брзо даје информације клиничару о току болести и ефекту терапије (Hofman et al., 2019). Могу се учесталије понављати да би се пацијент праatio током терапије, па се сматра да течне биопсије представљају анализу туморских ћелија и њихових продуката у реалном време-



Слика 2. Принцип течне биопсије. Туморско ткиво отпушта ДНК, РНК, цитокине, егзозоме, тромбоците и вијабилне туморске ћелије у крвоток. Течна биопсија узета из крви садржи дате компоненте које потом могу да се детектују и квантификују (адаптирано из Ma et al., 2022).

ну (Pantel & Alix-Panabieres, 2019; Heidrich et al., 2021). Константно се развијају и унапређују у корист ране дијагностике тумора, одређивања тачне фазе болести, давања прогнозе, предикције одговора на терапију, као и детекције поновне појаве болести након првобитно успешног лечења (Castro-Giner et al., 2018). Такође, традиционална биопсија туморског ткива се не може узети сем ако већ не знамо да тумор постоји и на којој локацији у телу, док се течне биопсије могу користити за откривање непознатих лезија и за скрининг постојања малигних тумора у здравој популацији (адаптирано из Ma et al., 2022).

Циркулишући цитокини су погодни за детекцију и квантификацију у овако добијеним биопатима услед њихове релативно лаке изолације, а методе које се користе за њихово мерење су високо сензитивне и могу се поуздано стандардизовати (Hofman et al., 2019). Доказано је да тип цитокина и његова концентрација у циркулацији могу бити повезани са присуством одређеног типа карцинома, озбиљношћу болести и ефикасношћу терапије. Цитокини могу служити као квалитетни биомаркери, који би помогли да се прати ток болести и терапија персонализује и прилагоди еволуцији тумора (Kartikasari et al., 2021) Како цитокини у зависности од своје концентрације могу имати улогу и у супресији тумора и у његовој прогресији/метастази, профилисање цитокина и њихових солубилних рецептора помоћу течних биопсија (као и класичних) може бити кључно у детекцији болести, праћењу тока болести и одабиру терапије (Bossmann, 2020; Kartikasari et al., 2021)

МЕТОДОЛОШКИ ПРИСТУПИ ЗА АНАЛИЗУ ЦИТОКИНА ИЗ ТЕЧНИХ БИОПСИЈА

Прецизна квантификација цитокина је кључна у праћењу имунског статуса пацијената, у одређивању и прилагођавању њихове терапије, поготово у болестима попут карцинома (Liu et al., 2021). Међутим, у пракси

је прецизна детекција цитокина отежана, због њихове изузетно ниске концентрације у организму, динамичног облика секреције и кратког полуживота (Liu et al., 2021). Фактори попут присуства цитокин-везујућих протеина, инхибитора и солубилних цитокинских рецептора такође утичу на резултате мерења (Henev and Whicher, 1995). Веома је важан и начин на који се скупљају, процесују и чувају узорци течних биопсија, као и понашање пацијената пре давања узорка – изложеност стресу, ниво физичке активности, квалитет сна, исхрана и време узимања последњег оброка пре узоровања и те како утичу на измерене концентрације (Zhou et al., 2010).

Постоји више метода за мерење цитокина *in vitro*, а једна од најчешће коришћених је ензимски имунсорбентски есеј (енг. enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA). Традиционално, ELISA се смара златним стандардом за анализу серумских цитокина, нарочито њена варијација позната као „сендвич“ ELISA (Ungaro et al., 2020). „Сендвич“ есеј подразумева имобилисано антитело (везујуће антитело) специфично за одређени антиген тј. цитокин, за које се везује дати цитокин из узорка. Потом се додаје детекционо антитело које се такође везује за антиген, па се тако формира везујуће антитело-циљни антиген-детекционо антитело „сендвич“. Циљни антиген тј. цитокин се детектује и квантификује индиректно мерењем интензитета сигнала који потиче од ензима тј. репортера коњугованог за детекционо антитело (Слика 3) (Li et al., 2003). Имобилено антитело које хвата тј. везује протеин обезбеђује везивање и специфичност, док детекционо антитело омогућава детекцију и амплификацију сигнала (Ungaro et al., 2020). Иако представља златни стандард, ова метода има своја ограничења. Само један цитокин се може анализирати у датом испитивању, што значајно успорава процес анализе (Ungaro et al., 2020). Услед чињенице да је често само одређена количина узорка доступна истраживачима, некад се не могу анализирати сви жељени цитокини – нема довољне количи-

не појединачног узорка за манипулисање (Zhou et al., 2010). Резултати теста значајно зависе од квалитета антитела, произвођача комплета за анализу и вештине и искуства истраживача који изводи есеј (Aziz et al., 1999). Додатно, с обзиром на то да код ове методе постоји линеарна зависност између концентрације цитокина и очитане апсорбанце ензима, узорци који прелазе распон могућих очитаних апсорбанци се морају разблажити и поново анализирати. То захтева додатан физички рад, узимање додатног волумена узорка, и искује додатне трошкове.

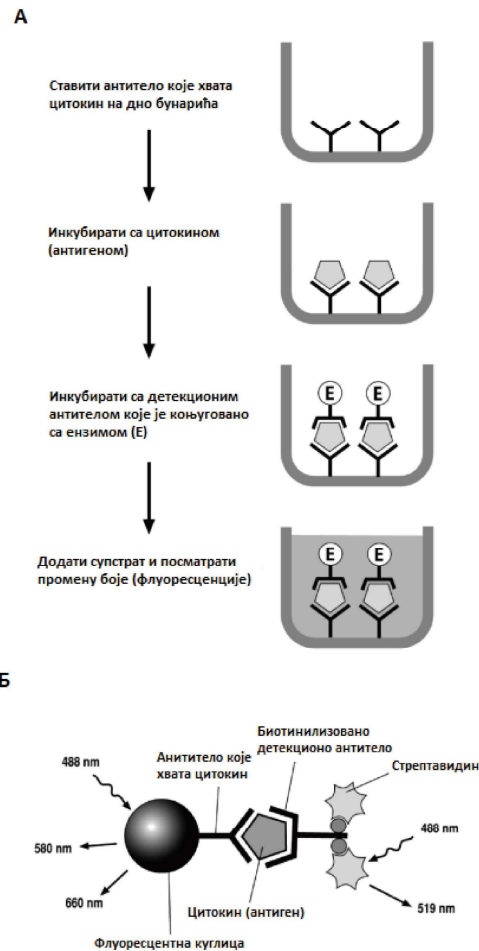
С обзиром на то да цитокини свој ефекат не испољавају самостално већ у оквиру мреже, методе које дозвољавају истовремену паралелну анализу већег броја цитокина су све популарније. Мултиплекс методе су развијене од традиционалних ELISA метода у сврху мерења већег броја цитокина у истом узорку у исто време (Leng et al., 2008). Доступне су у неколико различитих формата, у зависности од тога да ли се заснивају на проточној цитометрији, хемилуминисценцији или електрохемилуминисценцији (Leng et al., 2008). Мултиплекс есеји засновани на проточној цитометрији, односно есеји засновани на микрокуглицама, представљају једну од најчешће коришћених метода. Есеји са микрокуглицама од произвођача BD Biosciences и Lumiplex технологија за мултианалитно профилисање (xMAP) користе микрокуглице које се могу детектовати и разликовати у проточном цитометру (Слика 3) (Leng et al., 2008). Куглице имају различите светлосне ознаке, односно пре коришћења су обележене различитим флуоресцентним бојама (Lumiplex, 2021). Затим се облажу антителима која су специфична за одређен аналит. Свако специфично антитело које везује одређен, различит аналит, односно цитокин, ковалентно је везано за куглицу која има својствене светлосне ознаке што омогућава разликовање аналита касније током анализе. Као што је речено, специфична антитела везују задати аналит из узорка течне биопсије, потом се додају биотинилизована детекциона антитела специфична за исти аналит од интереса и формира се антитело-антиген-антитело сендвич. Затим се додаје стрептавидин-фикоеритрин репортер, који се везује за детекционо антитело. Коришћењем дуалног ласерског система, светлосна ознака сваке куглице се идентификује, као и присуство и интензитет репортера повезаних са куглицама. Овим мерењима добијају се информације и о идентитету и о концентрацији циљних аналита у узорку (Lumiplex, 2021).

У поређењу са ELISA есејем, мултиплекс методе нуде многобројне предности: 1) истовремену анализу више цитокина 2) потребна је мања количина појединачног узорка, 3) потребно је мање времена и новца за спровођење анализе, 4) могућност да се евалуира ниво једног инфламаторног молекула у контексту са више других инфламаторних молекула у узорку, 5) могућност понављања анализе истог цитокинског панела на истим узорцима под истим експерименталним условима, 6) могућност да се поуздано детектују различити протеини у широком распону концентрација (Zhou et al., 2010).

Ипак, неопходан је опрез приликом коришћења мултиплекс есеја у истраживањима. Мултиплекс есеји се базирају на интеракцијама између више различитих антитела и цитокина (антигена) у узорку/раствору (појава која се често назива „ефекат матрикса“) (Elshal & Mccoу, 2006; Zhou et al., 2010). Пре коришћења комплета за мултиплекс есеј мора се утврдити да појединачни цитокини не реагују са осталим антителима која су неспецифична за њих, а препоручује се коришћење најмање могуће запремине узорка и реагенса да би се што више смањиле међусобне реакције више антигена са више антитела (енг. cross-reactions) (Elshal & Mccoу, 2006; Zhou et al., 2010). Такође, не-цитокински циркулишући протеини у плазми или серуму могу утицати на резултате мултиплекс анализе. У мултиплекс есеју заснованом на микрокуглицама све реакције се одвијају међу молекулима и антигенима који се слободно крећу у раствору, док ELISA есеј подразумева имобилизацију антитело-антиген-антитело комплекса на дну бунарића микротитар плоче (Leng et al., 2008). Зато није изненађујућа чињеница да се мултиплекс есеји показују као много сензитивнији на различите нивое циркулишућих протеина и инхибитора, за разлику од ELISA есеја. Оно што је такође веома важно, јесте да се нивои анализираних цитокина могу разликовати у узорку плазме и узорку серума истог пацијента, услед присуства различитих компоненти плазме/серума (Leng et al., 2008).

С обзиром на то да су ELISA есеји опште прихваћени као методе квантификације цитокина, прихватање мултиплекс есеја заснованих на микрокуглицама у рутинској клиничкој пракси зависи од постизања сличних резултата као оних добијених ELISA тестовима (Elshal & Mccoу, 2006). Већина објављених студија је показала добру корелацију између ELISA и мултиплекс есеја за тестиране цитокине, али нема подударности између квантитативних вредности две врсте теста, нити су степени корелације међу студијама истоветни. Међутим, компаративне студије које су користиле идентичне парове везујућих и детекционих антитела, сличне реагенсе и блокирајуће агенсе у својим униплекс ELISA и мултиплекс есејима са микрокуглицама, показале су да ове детерминанте играју значајну улогу у постизању сличних апсолутних вредности концентрација и високих нивоа корелације међу есејима (Elshal & Mccoу, 2006).

Студија Кан и сар. (Khan et al., 2004) је утврдила, поредећи податке добијене коришћењем мултиплекс есеја различитих произвођача, да се измерене концентрације циркулишућих цитокина разликују у својим апсолутним вредностима, али да показују сличан квалитативни тренд. Осим различитих антитела која се користе у комплетима различитих произвођача, оно што вероватно утиче на квантитативне разлике јесте и различит препоручени период инкубације узорка. Стога није препоручљиво поредити резултате мерења добијене коришћењем различитих комплета за анализу, већ је боље користити комплет једног произвођача током спровођења студије.



Слика 3. Шематска илустрација експерименталног принципа ELISA есеја и мултиплекс есеја заснованог на куглицама. Обе методе подразумевају коришћење две врсте антитела специфичне за одређене цитокин(е). Детекција се заснива на мерењу сигнала који потиче од детекционог антитела обележеног ензимом или флуорофором. А – протокол за традиционалну сендвич ELISA методу. Б – Микрокуглице пружају додатну диференцијалну детекциону моћ код мултиплекс есеја заснованих на микрокуглицама (адаптирано из Leng et al., 2008).

Иако мултиплекс есеји показују велики потенцијал када је реч о квантификацији циркулишућих цитокина, интерпретација резултата добијених овим путем може бити захтевна и изазовна, те захтева детаљно познавање молекуларних сигналних путева регулације цитокинима. Пажљиво планирање студије и анализа података су неопходни приликом коришћења овог метода и доношења закључака, а још истраживања је потребно да би квантификација цитокина мултиплекс технологијом ушла у рутинску дијагностику.

ЗАКЉУЧАК И БУДУЋИ ПРАВЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Цитокини су у великој мери укључени у регулацију сложених процеса развоја и напредовања тумора. Они имају значајне ефекте како на туморске, тако и на ћелије имунског система и могу довести до про- или антитуморске активности, у зависности од услова околине и присуства других цитокина. Велики број студија је показао да су цитокини мали гласници, који представљају важан фактор у МСТ. Утицај и терапијски потен-

цијал цитокина почињу да се откривају кроз постојеће терапијске принципе, али и велики број лекова који су у фази испитивања. Нова истраживања која се фокусирају на сложен однос између ћелија тумора, имунитета и цитокина и даље су преко потребна да би се повећало разумевање регулације имунских процеса код онколошких пацијената. Истраживања везана за цитокине и даље играју кључну улогу у откривању молекуларних механизма везаних за настанак, развој и ширење тумора и идентификацију нових терапијских принципа.

ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад је проистекао из истраживања у оквиру пројекта Twinning for a European Consortium of Rectal Cancer Research Institutions through Stepping Up Scientific, Technological and Innovation Excellence of IORS, Horizon Europe Framework Programme (HORIZON-WIDERA-2021-ACCESS-03, STEPUP-IORS - 101079217) уз подршку Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (бр. уговора 51-03-66/2024-03/200043).

Abstract

THE SIGNIFICANCE OF CIRCULATING CYTOKINES IN CANCER DEVELOPMENT, PROGNOSIS AND RESPONSE TO ANTICANCER THERAPY

Jelena KIJAC, Katarina MIRJAČIĆ MARTINOVIĆ, Milena ČAVIĆ, Institute of Oncology and Radiology of Serbia

Cytokines are soluble proteins that can either enhance or suppress inflammatory processes in the human body. Their function varies depending on their concentration, the activating signal's nature, and the presence of other cytokines. It was demonstrated that an inflammatory microenvironment is a fundamental component of every tumor. Consequently, cytokines can influence both pro- and anti-inflammatory immune responses. Cytokines can exert their biological effects systemically *via* circulation. Therefore, higher concentrations of circulating cytokines have been observed in patients diagnosed with various types of cancer. The advent of liquid biopsies has enabled the detection of circulating cytokines in patients' blood samples, providing more relevant molecular information about tumors. One evolving methodological approach for cytokine quantification from liquid biopsies is bead-based multiplex assays. These assays offer numerous advantages over standard singleplex assays and show enormous potential in this regard.

Key words: *cytokines, tumor microenvironment, liquid biopsies, multiplex assays*

ЛИТЕРАТУРА

- Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V., & Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, 15(2), 425-430.
- Alix-Panabières, C., Schwarzenbach, H., & Pantel, K. (2012). Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annual Review of Medicine*, 63, 199-215.
- Aziz, N., et al. (1999). Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(1), 89-95.
- Binnewies, M., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5), 541-550.
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), S460-S475.
- Bossmann, S. H. (2020). Liquid biopsies for early cancer detection. In *Biomaterials for Cancer Therapeutics* (pp. 233-259). Woodhead Publishing.
- Castro-Giner, F., et al. (2018). Cancer diagnosis using a liquid biopsy: Challenges and expectations. *Diagnostics*, 8(2), 31.
- Cavaillon, J. M. (2001). Pro-versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. *Cellular and Molecular Biology*, 47(4), 695-702.
- Chechlinska, M., Kowalska, M., & Kaminska, J. (2008). Cytokines as potential tumour markers. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 2(6), 691-711.
- Cheung, Y. T., et al. (2015). Association of proinflammatory cytokines and chemotherapy-associated cognitive impairment in breast cancer patients: A multi-centered, prospective, cohort study. *Annals of Oncology*, 26(7), 1446-1451.
- Crowley, E., et al. (2013). Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(8), 472-484.
- De Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6(1), 24-37.
- Demaria, S., et al. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International Journal of Radiation Oncology*, 58(3), 862-870.
- Dong, C. (2021). Cytokine regulation and function in T cells. *Annual Review of Immunology*, 39, 51-76.
- Ebrahim, B., et al. (2004). Cytokines in pancreatic carcinoma: Correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101(12), 2727-2736.
- Elenkov, I. J. (2008). Neurohormonal-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochemistry International*, 52(1-2), 40-51.
- Elshal, M. F., & McCoy, J. P. (2006). Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317-323.
- Finotti, A., et al. (2018). Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology. *International Journal of Oncology*, 53(4), 1395-1434.
- Gerlinger, M., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 883-892.
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*, 51(1), 27-41.
- Griffin, D. E. (2008). *Cytokines and chemokines*. Academic Press.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gudbrandsdottir, G., et al. (2021). Serum levels of the IL-6 family of cytokines predict prognosis in renal cell carcinoma (RCC). *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70, 19-30.
- Heidrich, I., et al. (2021). Liquid biopsies: Potential and challenges. *International Journal of Cancer*, 148(3), 528-545.
- Heney, D., & Whicher, J. T. (1995). Factors affecting the measurement of cytokines in biological fluids: Implications for their clinical measurement. *Annals of Clinical Biochemistry*, 32(4), 358-368.
- Hofman, P., et al. (2019). Liquid biopsy in the era of immunoncology: Is it ready for prime-time use for cancer patients? *Annals of Oncology*, 30(9), 1448-1459.
- Kampan, N. C., et al. (2020). Pre-operative sera interleukin-6 in the diagnosis of high-grade serous ovarian cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 2213.
- Kartikasari, A. E. R., et al. (2021). Tumor-induced inflammatory cytokines and the emerging diagnostic devices for cancer detection and prognosis. *Frontiers in Oncology*, 11, 692142.
- Khan, S. S., et al. (2004). Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: Comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 61(1), 35-39.

- Kleiner, G., et al. (2013). Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators of Inflammation*, 2013, Article 685647.
- Leng, S. X., et al. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(8), 879-884.
- Li, J., et al. (2018). Multiple cytokine profiling in serum for early detection of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 24(21), 2269-2278.
- Li, Y., Nath, N., & Reichert, W. M. (2003). Parallel comparison of sandwich and direct label assay protocols on cytokine detection protein arrays. *Analytical Chemistry*, 75(19), 5274-5281.
- Liu, C., et al. (2021). Cytokines: From clinical significance to quantification. *Advanced Science*, 8(15), 2004433.
- Long, T. M., & Raufman, J. P. (2011). The diagnostic and prognostic role of cytokines in colon cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, 1, 27-39.
- Luminex Corporation. (2015, May 14). *Luminex MAGPIX SYSTEM* [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=uZ3ZPWn9gp4>
- Mantovani, A., et al. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.
- Martinović, K. M., et al. (2022). Increased circulating TGF- β 1 is associated with impairment in NK cell effector functions in metastatic melanoma patients. *Growth Factors*, 40(5-6), 231-239.
- Martinović, K. M., et al. (2024). Circulating IL-6 is associated with disease progression in BRAFwt metastatic melanoma patients receiving anti-PD-1 therapy. *Journal of Clinical Pathology*, 77(5), 343-351.
- Miller, M. D., & Krangel, M. S. (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: A family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Critical Reviews in Immunology*, 12(1-2), 17-46.
- Minisini, A., et al. (2004). What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology*, 5(5), 273-282.
- Mirjačić Martinović, K., et al. (2024). Circulating IL-6 is associated with disease progression in BRAFwt metastatic melanoma patients receiving anti-PD-1 therapy. *Journal of Clinical Pathology*, 77(5), 343-351.
- Mroczo, B., et al. (2007). Diagnostic usefulness of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in esophageal cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45(3), 515-519.
- Nuzzo, P. V., et al. (2020). Prognostic and predictive blood-based biomarkers in prostate cancer: Current and emerging players. *Current Opinion in Oncology*, 32(3), 242-247.
- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid biopsy and minimal residual disease—Latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 409-424.
- Ray, C. A., et al. (2005). Multiplexed bead-based immunoassays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317-323.
- Rincon, M. (2012). Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in Immunology*, 33(11), 571-577.
- Robert, C. (2020). Precision oncology in metastatic melanoma. *The Lancet Oncology*, 21(1), e8.
- Schenk, B., et al. (2021). Liquid biopsy in clinical management of breast, lung, and colorectal cancer. *Frontiers in Medicine*, 8, 657033.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
- Seneviratne, D. M., & Huynh, K. T. (2021). The role of cytokine and chemokine signaling in cancer. *Cancer Research*, 81(10), 2338-2345.
- Singh, S. K., et al. (2017). Role of cytokines in the pathophysiology of cancer. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 9(1), 197-212.
- Sun, L., et al. (2012). The role of IL-6/STAT3 signaling in the regulation of inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1209, 14-23.
- Tan, E. M., et al. (2009). Autoantibodies in cancer: From serological biomarkers to therapeutic targets. *Cancer Letters*, 281(1), 8-21.
- Toh, H. C. (2020). Staging metastatic cancer: Revisiting its definition and potential. *JAMA Oncology*, 6(4), 565.
- Topalian, S. L., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454.
- Wang, J., et al. (2020). Circulating tumor DNA correlates with recurrence in esophageal squamous cell carcinoma patients undergoing surgery. *Frontiers in Oncology*, 10, 764.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Whiteside, T. L. (2016). Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Advances in Clinical Chemistry*, 74, 103-141.
- Woolston, A., et al. (2021). Liquid biopsy for advanced melanoma: A review of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Current Oncology Reports*, 23(7), 77.
- Zhang, X., et al. (2020). Circulating tumor cells in cancer: Detection methods and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 130.
- Zhang, Y., et al. (2007). IL-6 promotes tumor progression through JAK/STAT3 signaling. *Cancer Research*, 67(7), 2793-2799.
- Zhao, H., et al. (2020). Circulating tumor DNA as a marker for minimal residual disease in gastric cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(10), 3348-3361.
- Zheng, H., et al. (2019). Progress and prospects of prognostic biomarkers for esophageal cancer: A review of the literature. *Frontiers in Oncology*, 9, 998.

