

Odnos imunohistokemijske izraženosti MAGEA3 i CD86/CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga s prognozom dukalnog adenokarcinoma gušterače

Glavčić, Goran

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:946674>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Goran Glavčić

**Odnos imunohistokemijske izraženosti
MAGEA3 i CD86/CD163 pozitivnih
intratumorskih makrofaga s prognozom
duktalnog adenokarcinoma gušterače**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Goran Glavčić

**Odnos imunohistokemijske izraženosti
MAGEA3 i CD86/CD163 pozitivnih
intratumorskih makrofaga s prognozom
duktalnog adenokarcinoma gušterače**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena na Klinici za kirurgiju, na Odjelu za kirurgiju gornjeg probavnog trakta, te na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, Klinički Bolnički Centar Sestre Milosrdnice, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: doc.dr.sc. Mario Zovak i dr.sc. Petra Radulović, znanstveni suradnik

Zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Mariu Zovaku i dr.sc. Petri Radulović na stručnom vodstvu i pomoći u izradi ovog rada te svima ostalima koji su pomogli u ostvarenju ovog istraživanja.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na odricanju i potpori bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

SADRŽAJ

POPIS SKRAĆENICA

POPIS TABLICA

POPIS SLIKA

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Epidemiologija i klasifikacija	1
1.2. Kirurško liječenje	4
1.3. Onkološko liječenje	9
1.4. MAGE proteini	11
1.5. MAGEA3	12
1.6. Makrofagi	14
1.7. M1/M2 polarizacija makrofaga	15
1.8. Makrofagi povezani s tumorom (TAM)	16
1.9. SVRHA ISTRAŽIVANJA	19
2. HIPOTEZA	20
3. CILJEVI RADA	21
4. MATERIJALI I METODE	22
4.1. Uzorci	22
4.2. Metode	22
4.3. Statistička obrada podataka	23
5. REZULTATI	25
5.1. Karakteristike ispitanika	25
5.2. Duljina praćenja (engl. time to event)	27
5.3. Analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis) varijabli uzorka	37

5.4. Analiza povezanosti demografskih, kliničkih i patohistoloških varijabli ispitanika	40
6. RASPRAVA	45
7. ZAKLJUČCI.....	53
8. SAŽETAK.....	54
9. SUMMARY	56
10. POPIS LITERATURE.....	58
11. ŽIVOTOPIS	75

POPIS SKRAĆENICA

CA 19-9 – karbohidratni antigen 19-9, tumorski marker

ERCP - endoskopska retrogradna koledokopankreatografija

CT – kompjuterizirana tomografija

MR – magnetna rezonanca

AJCC – engl. American Joint Committee of Cancer

R(0,1,2) – tip resekcije ovisan o rezidualnom ostatku tumora

DGE – engl. delayed gastric emptying - odgođeno pražnjenje želuca

PPPD – pankreatikoduodenektomija s čuvanjem pilorusa

FOLFIRINOX – onkološki protokol (folatna kiselina, fluorouracil, irinotekan oksaliplatina)

SBRT – stereotaktična radioterapija tijela

Gy – grej, SI izvedena mjerna jedinica za apsorbiranu dozu ionizirajućega zračenja

MAGE – melanom asocirajući antigeni

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

IFN – interferon

IL – interleukin

TAM – engl. tumor-associated macrophages – makrofagi povezani s tumorom

VEGF – engl. vascular endothelial growth factor - vaskularni endotelni faktor rasta

TGF – engl. transforming growth factor - transformirajući faktor rasta

PD - protein programirane stanične smrti

CTLA - citotoksični T-limfocitni antigen

ROC analiza - engl. receiver operating characteristic - radna karakteristika prijemnika

HLA – humani leukocitni antigen

POPIS TABLICA

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma gušterače

Tablica 2. Stadiji bolesti po 8. izdanju AJCC

Tablica 3. Deskriptivna statistika varijabli u uzorku

Tablica 4. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost povezanosti broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i preživljenja bolesnika s adenokarcinomom gušterače

Tablica 5. Prikaz ukupnih varijanci analize glavnih komponenti izražaja antigena kod adenokarcinoma gušterače

Tablica 6. Prikaz koeficijenata korelacije u matriksu prve tri glavne komponente izražaja antigena kod adenokarcinoma gušterače

Tablica 7. Prikaz rezultata statističke obrade povezanosti poznatih varijabli testirane Spearmanovim rho koeficijentom korelacije

POPIS SLIKA

Slika 1. Preparat nakon Whippleove operacije (glava gušterače, distalni želudac i duodenum s divertikulom)

Slika 2. Prikaz prepariranja gušterače kod distalne pankreatektomije

Slika 3. Određivanje lokacije tumora gušterače uz planiranu dozu zračenja

Slika 4. Prikaz kod planiranja za SBRT tumora gušterače

Slika 5. Kaplan Meier krivulja praćenja preživljenja

Slika 6. Krivulja porasta hazarda u odnosu na praćenje preživljenja

Slika 7. Kaplan Meierova krivulja preživljenja po T kategoriji bolesti

Slika 8. Kaplan Meierova krivulja preživljenja po N stadiju bolesti

Slika 9. Pozitivna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD86, povećanje 200x

Slika 10. Negativna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD86, povećanje 200x

Slika 11. Negativna reakcija makrofaga u području tumora na CD163, povećanje 200x

Slika 12. Pozitivna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD163, povećanje 200x

Slika 13. ROC analiza broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i njegove povezanosti s preživljenjem ispitanika

Slika 14. Povezanost broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i preživljenja pacijenta ($p = 0.025$)

Slika 15. Povezanost broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i porasta hazarda u odnosu na preživljenje pacijenata

Slika 16. Izraženost MAGEA3 u tumorskim stanicama, povećanje 200x

Slika 17. Izraženost MAGEA3 u normalnim stanicama gušterače, povećanje 200x

Slika 18. Prikaz svojstvenih vrijednosti u analizi glavnih komponenti koji označava prve tri glavne komponente kao značajne deskriptore varijance

Slika 19. Negativna reakcija na MAGEA3 u tumorskim stanicama, povećanje 200x

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Epidemiologija i klasifikacija

Adenokarcinom gušterače je neoplazma koja u većini slučajeva (85%) nastaje iz duktalnog epitela gušterače (1). Po smrtnosti na svjetskoj razini svrstava se na 7. mjesto i kod muškaraca i kod žena (2). Incidencija je veća u razvijenim područjima poput SAD-a, Zapadne Europe i dijelova istočne Azije (2). Bolest se rijetko javlja prije 45 godine života, incidencija je najveća u dobnoj grupi od 65 do 69 godina za muškarce odnosno 75 do 79 godina za žene (2). Nešto češće obolijevaju muškarci (1.3:1) (3). U faktore rizika za pojavu ove bolesti ubrajaju se pušenje, pretilost, dijabetes, način prehrane, alkoholizam kao i genetski čimbenici (4–6). Epizode rekurentnog akutnog kao i kronični pankreatitis povećavaju rizik za pojavu bolesti (7).

Genetske mutacije povezane s povećanim rizikom od raka gušterače uključuju STK11/LKB1, CDKN2A (p16), BRCA1/2, PRSS1/SPINK1/CFTR, gen za popravak neusklađenosti (MLH1/MSH6/MSH2/PMS2), ATM i PALB2 (jedan od novijih gena osjetljivosti na rak gušterače) (8). Također je otkriveno da je rak gušterače povezan s ovim obiteljskim sindromima raka za koje odgovaraju genetske mutacije, kao što je Peutz-Jeghersov sindrom (STK11/LKB1), obiteljski atipični melanom s više madeža (CDKN2A), nasljedni rak dojke, sindrom raka jajnika (BRCA1/2) i sindrom nasljednog nepolipoznog kolorektalnog karcinoma (8).

Osim ovih općepriznatih faktora rizika, posljednjih desetljeća višestruki i vrlo složeni učinci oralne i crijevne mikrobiote na rak gušterače identificirani su kao potencijalni čimbenici rizika za razvoj i napredovanje ovog tumora (9–11). Također, vrše se istraživanja koja bi pokazala ima li mikrobiota koja se nalazi u pankreasu utjecaj na razvoj neoplazme (12).

Kirurška resekcija je jedini potencijalno kurativni tretman dostupan u sadašnjem liječenju, no u trenutku dijagnoze samo 15 do 20 posto pacijenata je kandidat za resekciju gušterače (13). Najčešći simptomi bolesti su astenija, gubitak

težine, tupi bolovi u abdomenu, anoreksija, žutica, mučnina te bolovi u leđima (14). Sijelo tumora se u 60-70% slučajeva nalazi u glavi gušterače, 20-25% u tijelu/repu, a ostatak slučajeva zahvaća cijeli organ (15). Osnovu dijagnostike čine laboratorijski nalazi uključujući tumorski marker CA 19-9 koji se nadopunjuju ERCP-om i CT/MR-om (16–18).

U pacijenata koji nisu podvrgnuti operativnom zahvatu, stopa petogodišnjeg preživljenja bila je 0,8% 1975. i 0,9% 2011., što znači da je ostala otprilike ista između 1975. i 2011. (19). Petogodišnje preživljenje nakon R0 resekcije je 30% kod slučajeva gdje nisu zahvaćeni limfni čvorovi i 10% kod slučajeva s diseminacijom u limfne čvorove (13). Rak gušterače ima generalnu petogodišnju stopu preživljavanja, u rasponu od 2% do 9%, s malom razlikom između bogatih zemalja s visokim dohotkom te zemalja s niskim i srednjim dohotkom. Stoga, stopa 5-godišnjeg preživljavanja raka gušterače varira globalno u različitim regijama i zemljama, ali ne prelazi 10% (20). Tijekom dva desetljeća od 2001. do 2020., procijenjeni broj novih slučajeva i smrti od raka gušterače povećavao se iz godine u godinu u Sjedinjenim Državama, a isti je trend uočen među muškarcima i ženama (21). Također, procjenjuje se kako će incidencija ove bolesti biti u porastu u idućim desetljećima i u Europskoj Uniji (22). Na svjetskoj razini incidencija raka gušterače bila je 12,1 na 100 000 stanovnika u 2010. godini, a predviđa se da će porasti na 15,1 i 18,6 na 100 000 do 2030. odnosno 2050. godine, s prosječnim godišnjim rastom od 1,1% (23). U Republici Hrvatskoj je u 2020. zabilježeno 801 novi slučaj karcinoma gušterače, što je za 23 veći broj u odnosu na 2019. godinu (24).

U definiranju uznapredovalosti karcinoma koristi se TNM klasifikacija prema American Joint Committee of Cancer (Tablica 1), koja karcinome klasificira na temelju dubine invazije tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova tumorom (N) i prisustvu udaljenih metastaza (M) (25). Pri odluci o načinu liječenja važno je slijediti kriterije koji određuju neresektabilnu (lokalno i generalno proširenu) bolest, a koji uključuju odnos tumora prema velikim krvnim žilama kao i prisutnost udaljenih metastaza (Tablica 2) (26).

Na temelju stupnja diferencijacije tumora, adenokarcinom gušterače dijeli se na visoko diferenciran (G1), umjereno diferenciran (G2) i slabo diferenciran (G3). Kod određenih tumora se ne može procijeniti stupanj pa se koristi termin Gx (27). Bolesnici sa slabo diferenciranim tumorima imaju lošiju prognozu od onih s dobro diferenciranim tumorima (28).

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma gušterače

TNM stadij	Opis
T –stadij	
Tis	tumor in situ
T1	tumor<2 cm
T2	tumor>2 cm i <4 cm
T3	tumor>4 cm
T4	tumor zahvaća trunkus celijakus, zajedničku hepaticku ili gornju mezenteričnu arteriju
N - stadij	
N0	bez zahvaćenosti limfnih čvorova
N1	1-3 zahvaćena regionalna limfna čvora
N2	4 ili više zahvaćena limfna čvora
M- stadij	
M0	odsustvo udaljenih sekundarizama
M1	udaljeni sekundarizmi

U posljednje vrijeme neoadjuvantna kemoterapija se koristi u sve većem broju centara za onkološko liječenje granično resektabilnih slučajeva iako studije daju različite rezultate o učinkovitosti ovog pristupa (29,30). Nakon operacijskog zahvata provodi se kemoterapija kod skoro svih slučajeva (potencijalna iznimka su samo T1N0 stadij kod dobro diferenciranih tumora) (31).

Tablica 2. Stadiji bolesti po 8. izdanju AJCC

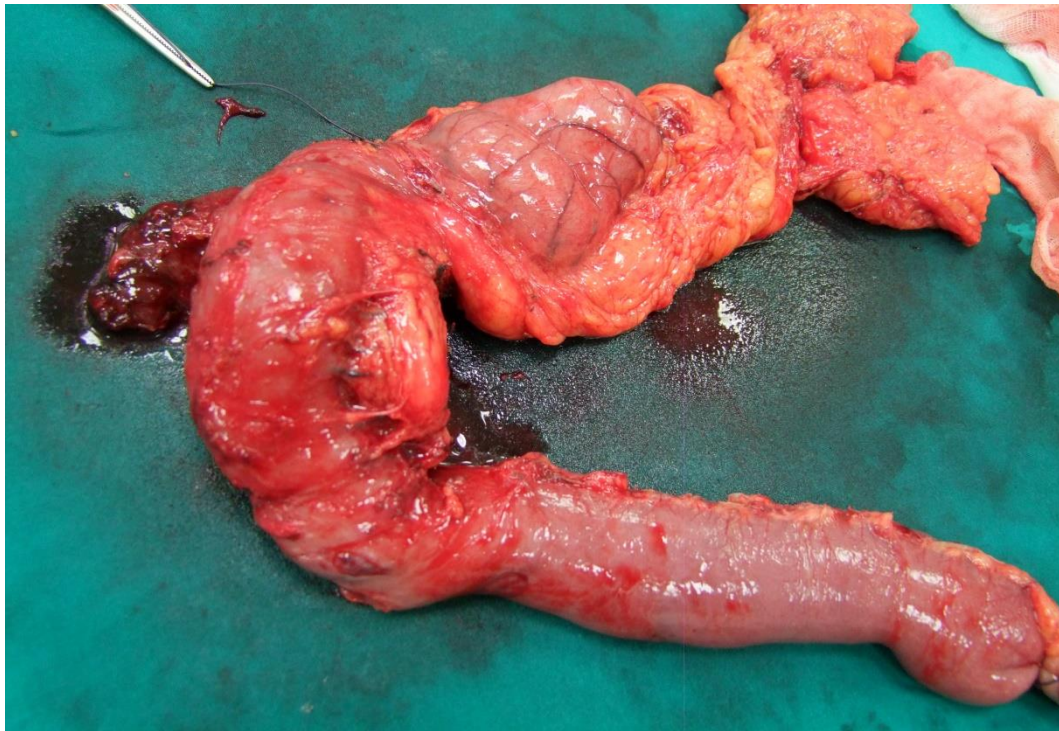
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
IIA	T3N0M0
IIB	T1, T2, T3 N1 M0
III	T1, T2, T3 N2 M0 T4, N bilo koji, M0
IV	bilo koji T, N, M1

1.2. Kirurško liječenje

Kirurško liječenje adenokarcinoma gušterače ovisi o lokaciji i proširenosti bolesti u trenutku dijagnoze. Resektabilnost tumora se procjenjuje ovisno o prisutnosti limfogenih ili udaljenih metastaza te zahvaćenosti vitalnih struktura,

poglavito vene porte i gornje mezenterične arterije. Za tumore smještene u glavi organa izvodi se najčešće cefalična pankreatikoduodenektomija (Whippleova operacija) (Slika 1), dok se za tumore tijela i repa organa izvodi distalna pankreatektomija (s ili bez splenektomije) (32). U slučajevima velikog ili multicentričnog tumora može se izvesti totalna pankreatektomija koju se u prošlosti izbjegavalo, no s napretkom endokrinološke terapije smanjen je postoperativni morbiditet i mortalitet (33). Kod inoperabilnih pacijenata najčešće je potrebno provesti palijativni zahvat kako bi se osigurao protok žuči i pasaža hrane iz želuca u tanko crijevo.

Za Whippleovu operaciju u nekim europskim zemljama koristi se još i termin Kausch-Whipple procedura. Povijesno gledano, prvu pankreatoduodenektomiju izveo je dr. Alessandro Codivilla, talijanski kirurg, 1898. godine, a kasnije ju je modificirao dr. Walter Kausch 1912. Operacija je tada izvođena kao zahvat u dvije faze, a dr. Allen Oldfather Whipple dodatno je poboljšao u jednofazni Whippleov postupak 1940. godine (34). Postoje dvije vrste pankreatoduodenektomija; opsežnija klasična Whippleova i pankreatoduodenektomija koja štedi pilorus (PPPD) (35). Kao što samo ime kaže, kod PPPD varijante očuvan je pilorus dok se kod klasične operacije odstranjuje i distalni dio želuca. U zadnjim desetljećima razvila se i laparoskopska varijanta ove operacije. Studije sugeriraju da je laparoskopski pristup povezan s kraćom hospitalizacijom, manjim gubitkom krvi i boljom disekcijom limfnih čvorova (36). Ipak, zbog velike tehničke zahtjevnosti zahvata većina kirurga se odlučuje za otvoreni pristup, pogotovo jer oba pristupa imaju podjednake onkološke ishode (37). Također, na kirurgu leži izbor rekonstrukcije pasaže egzokrinih produkata gušterače, glavni pankreatični vod može se nakon operacije drenirati u želudac ili jejunum ovisno o tehnici anastomoziranja (pankreatikojejuno ili pankreatikogastrična anastomoza). Većina velikih studija ne nalazi značajniju razliku u ishodima u tercijarnim centrima s velikim brojem operacija (38).



Slika 1. Preparat nakon Whippleove operacije (glava gušterače, distalni želudac i duodenum s divertikulom)

Kirurški zahvat izbora za benigne ili maligne lezije u tijelu ili repu gušterače je distalna pankreatektomija (Slika 2). Ova operacija uključuje uklanjanje dijela gušterače koji se nalazi lijevo od središnje linije i ne uključuje duodenum i distalne žučne vodove. Gušterača se obično resecira lijevo od debla gornje mezenterične vene/portalne vene, s točnom linijom presjeka ovisno o mjestu lezije. Zbog manje učestalosti bolesti gušterače i kasnijeg javljanja kliničkih simptoma u ovom dijelu organa, distalne pankreatektomije izvode se rjeđe nego resekcije glave gušterače (39). Zbog anatomske blizine lijenalne arterije i vene u prošlosti se skoro isključivo radila splenektomija uz ovaj zahvat. Ipak studije su pokazale kako splenektomija ima negativan utjecaj na dugoročno preživljenje nakon resekcije (40). Također, u bolesnika koji su podvrgnuti distalnoj resekciji gušterače zbog kroničnog pankreatitisa, neovisno o volumenu resecirane žlijezde, incidencija šećerne bolesti bila je manja nakon očuvanja slezene nego nakon en-bloc splenektomije. Osim toga, spašavanje slezene trebalo bi biti

poželjno jer eliminira rijetke, ali potencijalno fatalne komplikacije goleme infekcije inkapsuliranim bakterijskim organizmima (40).



Slika 2. Prikaz prepariranja gušterače kod distalne pankreatektomije

Kao što je prethodno spomenuto, totalna pankreatektomija u prošlosti je rijetko izvođena zbog visokog mortaliteta koji je najčešće bio posljedica malapsorpcije i dijabetesa refraktornog na terapiju (33). Osim multicentričnih tumora indikacija za ovu operaciju može biti komplikacija parcijalne pankreatektomije, tehnički problemi s kreiranjem anastomoze pankreatičnog voda ili bol koja ne odgovara na terapiju medikamentima (33). Napreci u kirurškoj tehnici su također doveli do toga da je perioperativna smrtnost i preživljenje na duže vrijeme slično u grupi operiranih totalnom i parcijalnom pankreatektomijom, te se zahvat koristi ako postoji onkološka indikacija (41).

Kod neresektabilnih tumora (poglavito glave gušterače) često dolazi do opstrukcije duodenuma te hrana i bilijarni sadržaj ne mogu proći u tanko crijevo. U tim slučajevima potreban je palijativni kirurški zahvat. Alternativa kojom se nekada može izbjeći kirurški zahvat zbog opstruktivnog ikterusa je stentiranje glavnog žučnog voda potpornicom koja se ugradi uz pomoć ERCP-a (42). Endoskopski postupak bio je povezan s kraćim trajanjem boravka, češćim

otpuštanjem kući i manjim ukupnim troškovima. Ipak, rekurentna bilijarna opstrukcija bila je češća nakon bilijarnog stentiranja. U velikoj multicentričnoj retrospektivnoj studiji, 20,3% endoskopskih i 4,5% kirurških pacijenata podvrgnuto je ponovnoj intervenciji (43). Kirurški zahvat koji je potrebno izvesti je hepatikojejunostomija po Roux metodi uz kolecistektomiju. Ranije se koristila koledohoduodenalna anastomoza, no nova metoda je razvijena kako bi se izbjegla ponovna pojava simptoma zbog urastanja tumora. Osim toga, rekonstrukcija po Rouxu je poželjnija u bolesnika s dužim očekivanim životnim vijekom jer smanjuje rizik od kolangitisa uzrokovanog refluksom crijevnog sadržaja u žučne vodove (44). Opstrukcija prolaska hrane tretira se gastrojejunalnom premosnicom, no neki centri su započeli s postavljanjem duodenalnih stentova koji ipak zahtijevaju češću reintervenciju nego nakon kirurškog liječenja (45).

Medijan preživljenja nakon potencijalno kurativnog zahvata je još uvijek nizak i po studijama iznosi oko 14-20 mjeseci (46), dok je bez kirurškog zahvata samo 4 do 8 mjeseci (47). Postoperativni mortalitet i poglavito morbiditet su relativno visoki. Iako neki tercijarni centri prijavljuju mortalitet 0-5%, morbiditet ostaje i do 50% (48,49).

Najčešće komplikacije zahvata uključuju dehiscenciju anastomoze, pankreatičnu fistulu, krvarenje, intraabdominalne apscese i odgođeno pražnjenje želuca (delayed gastric emptying-DGE) (50). DGE je nešto češća komplikacija kod PPPD varijante resekcije (51), te se javlja u oko 17% slučajeva (52). Dehiscencija pankreatikojeunalne ili pankreatikogastrične anastomoze (ovisno o kirurškoj tehnici kod Whippleove operacije) je na drugom mjestu po učestalosti s oko 10% (52), no najčešće zahtijeva reoperaciju u vidu odstranjenja ostatka gušterače; često zaostaje pankreatična fistula. Pankreatične fistule su nešto češće nakon distalne pankreatektomije, no većinom ih je moguće sanirati samo vanjskom drenažom (53). Također, zbog intimnog odnosa arterije i vene lijenalis distalnu pankreatektomiju često prati splenektomija, no u slučaju očuvanja organa smanjuje se mogućnost nastanka infektivnih komplikacija (54).

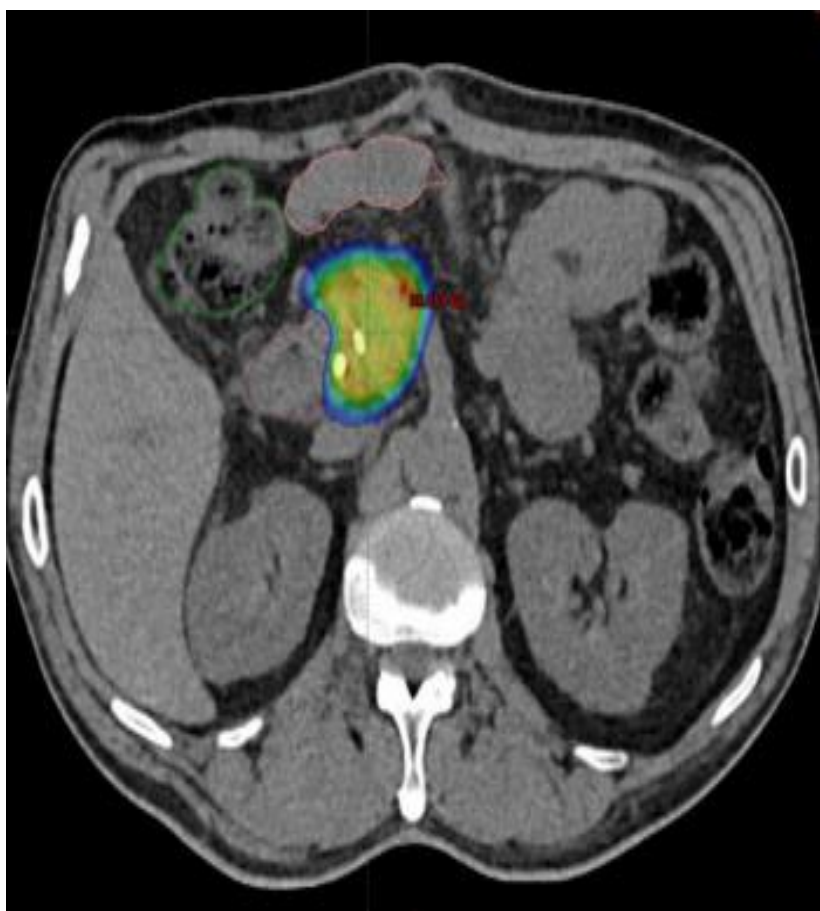
1.3. Onkološko liječenje

Po protokolu je nakon operacijskog liječenja indicirano adjuvantno onkološko liječenje. U usporedbi s pacijentima koji nisu primali naknadnu terapiju pacijenti liječeni adjuvantno imaju značajno duži period preživljenja (23 naprema 11 mjeseci), no recidivi nakon 2 godine se u i dalje učestali (55). Prvotno se koristila monoterapija gemcitabinom u 6 ciklusa (56); nakon dodatnih kliničkih ispitivanja u upotrebi je adjuvantna kemoterapija u kombinaciji gemcitabina i kapecitabina u trajanju od 6 mjeseci (57). U slučajevima prevelike toksičnosti može se koristiti i terapija fluorouracilom/folatnom kiselinom (57). Također, po novim studijama dobre rezultate pokazuje terapija modificiranim FOLFIRINOX protokolom (oksaliplatin, irinotekan, leukovorin i fluorouracil), no uz veće stope toksičnosti po pacijente (58).

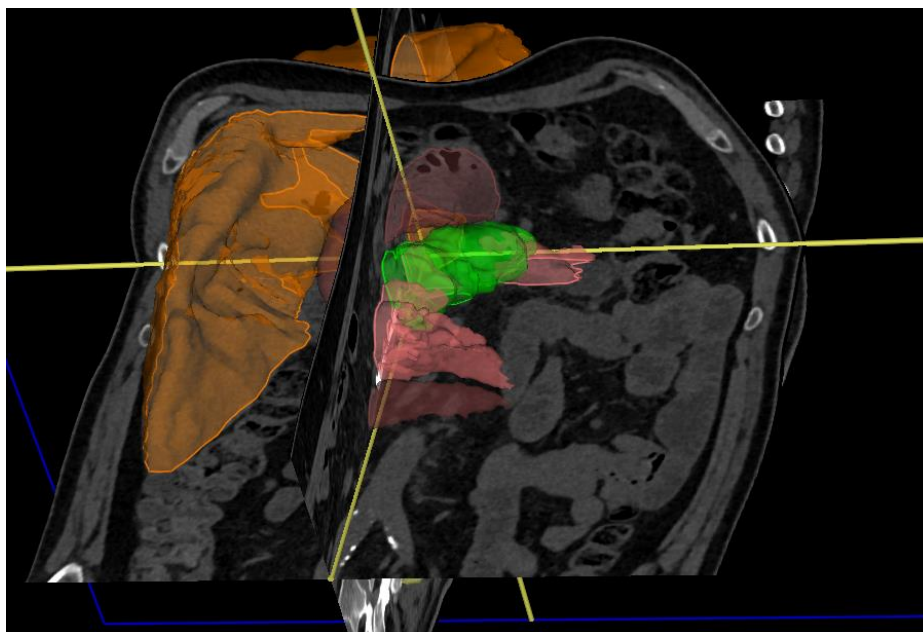
Neoadjuvantna terapija donedavno nije bila metoda izbora, poglavito zbog lošeg odgovora i nemogućnosti adekvatnog radiološkog stupnjevanja bolesti nakon provedenog liječenja (59–61). Prednosti ovog pristupa bi u teoriji uključivale smanjenje primarnog tumora kao i kontrolu mikrometastaza prisutnih u vrijeme dijagnoze ili operacije. Prednost se daje multidisciplinarnom pristupu, no sve više centara pristupa ovom modalitetu liječenja, najčešće po FOLFIRINOX protokolu (62). Druge opcije uključuju terapiju zračenjem i gemcitabinski baziranu kemoterapiju (62).

Najnoviji modalitet liječenja kod karcinoma gušterače predstavlja ciljani pristup radioterapijom, odnosno SBRT – “stereotactic body radiotherapy” (Slika 3 i 4). Ova metoda uključuje primjenu visokih doza zračenja koncentriranih na maloj površini, stoga je cilj redukcija primarnog tumora ili ablacija presadnica (63). Metoda se osim kod neresektabilnih tumora koristi i kod visokorizičnih ili starijih pacijenata kod kojih je očekivani životni vijek bitno skraćen. Studije su pokazale kako ova metoda ima dobre rezultate u smislu

kontrole lokalno uznapredovale bolesti, no udaljene metastaze su i dalje bile vodeći uzrok mortaliteta (64). Najčešće se koristi u 5 podijeljenih doza od 25 do 50 Gy, no potreban je oprez zbog rizika od striktura gastrointestinalnog trakta (63). SBRT se koristi i kod regulacije boli, za kontrolu inoperabilnih pacijenata te kod postoperativnih recidiva (65). Ipak dugoročni rezultati pokazuju kako je period preživljenja samo blago povišen kod pacijenata koji su reagirali na terapiju (9 naprema 6 mjeseci) (66).



Slika 3. Određivanje lokacije tumora gušterače uz planiranu dozu zračenja



Slika 4. Prikaz kod planiranja za SBRT tumora gušterače

Zbog generalno loših rezultata liječenja ove bolesti postoji potreba za pronalaskom učinkovitije terapije za adenokarcinom gušterače. Neke od vrsta terapija koje se razmatraju su razvoj inhibitora imunoloških kontrolnih točaka, ciljanih cjepiva te proučavanje tumorskog mikrookoliša (67). Većina ovih studija je u pretkliničkim fazama, te se nastavlja potraga za antigenom koji bi mogao biti valjani cilj ovih imunoterapija.

1.4. MAGE proteini

U potrazi za odgovarajućim antigenima koji bi u nekom obliku mogli biti cilj onkološke terapije u posljednjim studijama se istražuje MAGE (melanoma-associated antigen) (68). Ovu skupinu čini više od 40 vrsta ljudskih proteina, izraženi su najčešće u reproduktivnim tkivima (placenta i muške germinativne stanice), no ekspresija im je aktivirana i u nekim tumorskom tkivima (69). Neke od malignih bolesti kod kojih je dokazana izraženost ovog antigena su

neoplazme kolona, mozga, prostate, pluća i melanomi (70–74). MAGE tipa I kod ljudi uključuju članove podgrupe MAGE-A, -B i -C koji su grupirani na X-kromosomu dok se MAGE tipa II (podfamilije MAGE-D, -E, -F, -G, -H, -L i Necdin) izražavaju u mnogim tkivima u tijelu i nisu ograničeni na X kromosom (75).

Studije govore u prilog kako izraženost ovih antigena kod određenih vrsta neoplazmi ukazuju na loš prognostički ishod te s većom mogućnošću recidiva nakon provedenog liječenja (76–79). Također, kod nekih tumora pokazano je kako su upravo MAGE proteini uključeni u tumorogenezu, no studije su uglavnom izvođene in vitro ili in vivo kod laboratorijskih životinja (80–83). MAGE proteini nađeni su u visokim koncentracijama tumorskih matičnih stanica koje su otporne na kemoterapiju (84). Neke od malignih bolesti kod kojih je dokazana povećana izraženost MAGE antigena su planocelularni karcinom jednjaka i B-stanični limfom testisa (85,86).

Relativno ograničena izraženost u normalnim tkivima potaknula je istraživanja kako bi iskoristili MAGE antigene kao cilj imunoterapije. Rezultati dosadašnjih istraživanja u svrhu proizvodnje cjepiva su inkonkluzivni ili nisu pokazali statistički značajne razlike, no ostaje veliki potencijal za razvoj novih metoda liječenja (87–89).

1.5. MAGEA3

MAGEA su bili prvi antigeni povezani s ljudskim tumorima identificirani na molekularnoj razini (68). Potporodica MAGEA uključuje 12 visoko homolognih gena smještenih na kromosomu Xq28 (90,91). Kao i ostali MAGE proteini u zdravim tkivima izraženi su u testisu, posteljici i fetalnim jajnicima, no neke studije pronašle su izraženost i u središnjem živčanom sustavu (92). Najčešća unutarstanična lokacija ovih antigena je često drugačije za određene

podtipove; MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4 nalaze se većinom u citoplazmi dok se MAGEA10 koncentrira uglavnom u jezgri stanice (93–95). Izraženost MAGEA antigena i na genskoj i na proteinskoj razini povezana je sa proširenom demetilacijom DNK koja se često uočava kod proširenih malignih bolesti (96).

MAGEA3 je rano postao predmet interesa kao cilj onkološke terapije zbog činjenice kako ga kao antigen prepoznaju CD8⁺ T limfociti. Također stanice koje ga uobičajeno izražavaju, poput onih u testisu, su fiziološki zaštićene od imunološkog odgovora (91). Studije u kojima se pokušalo na primjeru raznih malignih bolesti izazvati klinički odgovor na cjepivo koje bi ciljalo ove antigene (u kombinaciji s drugim vrstama terapije) nisu pokazale značajne rezultate (97–99). Kod većine ovih istraživanja terapija je izazvala različite imunogene odgovore, no bez razlike u kliničkim rezultatima. Trenutni fokus istraživanja temelji se na postojanju imunoloških kontrolnih točaka (eng. checkpoint), te da bi davanje terapije protutijelima trebalo vremenski ciljati određene procese kako bi ih pospješilo ili inhibiralo (100,101).

Zbog loše prognoze adenokarcinoma gušterače, MAGEA3 je jedan od antigena čije se prisustvo pokušava povezati s ishodima liječenja kao i sa stupnjem bolesti u vrijeme dijagnoze. MAGEA3 u određenim uvjetima ima protumorski učinak inhibicijom apoptoze i pojačanjem izraženosti molekula poput survivina (koje pospješuju preživljenje tumora) (102). Prvotna istraživanja pokazuju mogućnost kombinacije agenasa za remodeliranje kromatina s imunološkom terapijom koja bi ciljala MAGEA3 (103). U jednoj od rijetkih kliničkih studija pokazano je kako je izraženost MAGEA3 antigena kod pacijenata s karcinomom gušterače 44%, te da je izraženost viša u slabije diferenciranim tumorima. Grupa pacijenata s povišenom izraženosti je također imala oko 50% lošije ukupno preživljenje (104). Ipak kada su se uključili svi klinički i patološki čimbenici, pokazalo se kako razlika ipak nije statistički značajna, te da je stupanj bolesti ipak klinički značajniji.

Studije su još uvijek malobrojne te ih je većina izvedena u in vitro ili laboratorijskim in vivo uvjetima, dok su one kliničke ograničene malim brojem pacijenata. Razlozi za to su višestruki, od značajnijih treba spomenuti nemogućnost dobivanja adekvatnog uzorka kod proširene bolesti, relativno kratko vrijeme preživljenja kao i cijenu te složenost određenih dijelova istraživanja.

1.6. Makrofagi

Makrofage je prvi opisao Élie Metchnikoff 1883. godine, nakon mikroskopskih promatranja pokretnih stanica koje reagiraju na ozljedu u larvi morske zvijezde izazvanu umetanjem trna (105). Rane studije su pretpostavljale da su makrofagi stanice tkiva koje su blisko povezane s vaskularnim endotelom, ali je kasnije pokazano da se diferenciraju od monocita u krvotoku (106). Naposljetku je razvijena ideja dvostrukog podrijetla tkivnih makrofaga, po tome što se u tkivima tijekom razvoja nalaze primitivni makrofagi iz fetalne jetre i žumanjčane vrećice, predstavljajući populaciju makrofaga koja boravi u tkivu, dok se u odrasloj dobi makrofagi također razvijaju iz hematopoetske matične stanice koje se nalaze u koštanoj srži, s monocitima u krvi kao intermedijarnom vrstom stanica (107).

Makrofagi su bitna komponenta urođenog imunološkog sustava, sa širokom distribucijom u limfoidnim i nelimfoidnim tkivima u cijelom tijelu. Imaju i ključne funkcije u homeostazi i mnogim fiziološkim procesima izvan urođenog imuniteta, uključujući metaboličku funkciju, uklanjanje staničnih ostataka te popravak i remodeliranje tkiva (108–110). Tijekom infekcije, upale ili ozljede tkiva, mogu slijediti kemotaktičke signale da migriraju do oštećenog tkiva/upalnog mjesta, gdje uništavaju patogene i stanične ostatke kroz proces koji se naziva fagocitoza i probavljaju ih u fagolizosomima. Lizosomi su membranski zatvorene organele koje sadrže skup hidrolaza koje mogu

razgraditi različite klase makromolekula. Ovaj proces olakšava prezentaciju rezultirajućih peptida stanicama specifičnog imunološkog sustava, poput T ili B limfocita (111). U cirkulaciji, normalni raspon monocita je između 2% i 8% broja bijelih krvnih stanica, što odgovara 200-800 monocita po mikrolitru krvi (111). U patogenim stanjima, tkivni makrofagi se mogu zamijeniti i pridružiti regrutiranim makrofagima izvedenim iz monocita kako bi se modulirao imunološki odgovor (112). Osim toga, na funkciju i fenotip makrofaga utječu različiti čimbenici u fiziološkim i patološkim stanjima, kao što su prehrana i citokini (113,114).

1.7. M1/M2 polarizacija makrofaga

Ranih 1990-ih je otkriveno da citokin interleukin 4 (IL-4) izaziva različite učinke na ekspresiju gena makrofaga u usporedbi s interferonom (IFN)-gama i lipopolisaharidom (LPS). Za razliku od klasične aktivacije makrofaga pomoću IFN-gama, ekspresija gena makrofaga izazvana IL-4 opisana je kao "alternativna aktivacija" (115,116). Godine 2000. predložena je nova klasifikacija makrofaga kao M1 ili M2. Ova terminologija proizašla je iz promatranja diferencijalnog metabolizma arginina u makrofagima u različitim sojevima miševa s CD4 pozitivnim T stanicama (stanice "pomoćnici") tipa 1 i 2 (117). Ovo je otkriće dovelo do konsenzusa unutar znanstvene zajednice da M1 (klasično aktivirani) makrofagi pokazuju proupalne funkcije, dok M2 (alternativno aktivirani) makrofagi pokazuju protuupalne funkcije. Naknadno su daljnje podijeljeni M2 makrofagi u podtipove M2a, M2b, M2c i M2d na temelju primijenjenih podražaja i induciranih transkripcijskih promjena (118). Fenotip M1 makrofaga karakterizira proizvodnja visokih razina proupalnih citokina, sposobnost posredovanja otpornosti na patogene, jaka mikrobicidna svojstva, visoka proizvodnja reaktivnih međuprodukata dušika i kisika i poticanje Th1 odgovora. Nasuprot tome, M2 makrofage karakterizira njihova uključenost u

kontrolu parazita, remodeliranje tkiva, imunološku regulaciju, promociju tumora i učinkovitu fagocitnu aktivnost (119).

Lipopolisaharidi, IFN-gama i čimbenik stimulacije kolonija granulocita-makrofaga (GM-CSF) polariziraju makrofage prema fenotipu M1, što inducira izlučivanje velike količine citokina kao što su IL-1-beta, faktor nekroze tumora (TNF), IL-12, IL-18 i IL-23. Ovo pomaže u pokretanju antigen specifičnih upalnih odgovora Th1 i Th17 stanica. Fenotipski, M1 makrofagi izražavaju visoke razine glavnog histokompatibilnog kompleksa klase II (MHC II) i ko-stimulatornih molekula CD80 i CD86 (120). Nasuprot tome, aktivaciju M2 makrofaga induciraju gljivične stanice, imunološki kompleksi, infekcije helmintima, komponente komplementa, apoptotičke stanice, faktor stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF), IL-4, IL-13, IL-10 i TGF-beta. Ova aktivacija dovodi do lučenja velikih količina IL-10 i niskih razina IL-12 (120). Kao marker izraženosti ovog fenotipa makrofaga najčešće se koriste kostimulatorne molekule CD163, CD204, CD 206 i arginaza (121). Molekula CD 68 pokazuje izraženost i kod M1 i kod M2 fenotipa (122). Iako stanje aktivacije M2 uključuje heterogene populacije makrofaga, neki markeri su zajednički između podtipova, stoga striktna podjela makrofaga na podtipove za sada nije moguća (123,124). Kao što je ranije spomenuto, tkiva sadrže složen niz podražaja koji dovode do miješanih populacija makrofaga sa širokim spektrom aktivacijskih stanja.

1.8. Makrofagi povezani s tumorom (TAM)

Makrofagi su jedna od glavnih populacija leukocita koji infiltriraju tkiva povezana sa solidnim tumorima, te ih sam tumor može privući iz okolnih tkiva putem izlučivanja kemotaktičkih molekula (125). Osim toga, monociti koji cirkuliraju u krvotoku mogu se infiltrirati u mikrookruženje tumora i sazrijeti u TAM-ove (126). Dokazano je da TAM-ovi potiču progresiju tumora i povezani

su s lošijom prognozom kod nekih tumora (127). Pojam TAM zapravo opisuje različite podskupove makrofaga koji variraju ovisno o ravnoteži citokina unutar mikrookruženja tumora, no prvenstveno su opisani s karakteristikama poput M2 fenotipa (128).

TAM-ovi induciraju angiogenezu, limfogenezu, remodeliranje strome i supresiju imuniteta te također igraju ključnu ulogu u promicanju invazije tumora i metastaza putem izlučivanja enzima plazmina, matriksnih metaloproteinaza (MMP) i katepsina B (129,130). Najjače izražen i dobro karakteriziran angiogenetski čimbenik koji proizvode TAM-ovi je vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A). TAM-ovi se nakupljaju u hipoksičnim regijama tumora, što inducira ekspresiju faktora inducibilnih hipoksijom (HIF-1) koji reguliraju ekspresiju VEGF (131). Uz VEGF-A, TAM-ovi izlučuju proangiogene čimbenike faktor nekroze tumora α (TNF α), osnovni faktor rasta fibroblasta, aktivator plazminogena tipa urokinaze, adrenomedulin i semaforin (131). Uz to, citokini koje proizvode TAM-ovi potiču tumorske stanice da proizvode proangiogene faktore, radeći na taj način kooperativno na uključivanju angiogene sklopke (132). Tumorska limfangiogeneza je povezana s tumorskom angiogenezom, a istraživanja pokazuju da su čimbenici koje proizvode TAM-ovi, posebno oni iz obitelji VEGF i njihovih receptorskih tirozin kinaza, odgovorni za ovu vezu (133).

Još jedna funkcija TAM-ova je suzbijanje protutumorskog imunološkog odgovora posredovanog T-stanicama. Analiza ekspresije gena mišjih modela raka dojke i fibrosarkoma pokazuje da TAM-ovi imaju imunosupresivne transkripcijske profile i ekspresijske faktore uključujući IL-10 i transformirajući faktor rasta β (TGF β) (134,135). Kod ljudi, pokazalo se da TAM-ovi izravno potiskuju funkciju T stanica putem površinske prezentacije liganda programirane smrti 1 (PD-L1) u hepatocelularnom karcinomu i B7-homologa u karcinomu jajnika. Ove molekule aktiviraju protein programirane stanične smrti 1 (PD-1) odnosno citotoksični T-limfocitni antigen 4 (CTLA-4) na T stanicama (136,137). Inhibicijski signali za PD-1 i CTLA-4 imunološke su kontrolne točke, stoga vezanje ovih inhibicijskih receptora njihovim ligandima sprječava

signaliziranje receptora T stanica, inhibira citotoksičnu funkciju T stanica i potiče apoptozu T stanica (138,139).

Po studijama, TAM-ovi su povezani s lošom prognozom kod raka dojke, raka jajnika, vrsta glioma i limfoma; no u nekim tumorima poput raka prostate i pluća rezultati su miješani (140). Modulacija odgovora M1 i M2 makrofaga mogla bi biti temelj razvoja novih terapija koje bi poboljšale učinkovitost liječenja i povećale preživljenje kod pacijenata s karcinomom gušterače (141). Strategije koje bi mogle pripomoći u onkološkom liječenju su cjepiva koja ciljaju TAM-ove, modulacija imunog odgovora u koji su uključeni, inhibiranje regrutiranja makrofaga te blokiranje funkcija TAM-ova za promicanje tumora (142,143).

1.9. SVRHA ISTRAŽIVANJA

U ovom istraživanju analiziran je međusobni odnos izraženosti MAGEA3 i broja CD86 te CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u karcinomima gušterače, njihova povezanost s kliničko-patološkim karakteristikama tumora i doživljenjem pacijenata što bi moglo ukazati na nove dijagnostičke i prognostičke pokazatelje ili potencijalne mete za ciljanu onkološku terapiju.

2. HIPOTEZA

Imunohistokemijska izraženost MAGEA3 i broj M2 intratumorskih makrofaga obilježenih s CD163 su veći dok je broj M1 intratumorskih makrofaga obilježenih s CD86 kao i omjer M1/M2 intratumorskih makrofaga manji u duktalnim adenokarcinomima gušterače s većim TNM stupnjem.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ: Analizirati imunohistokemijsku izraženost MAGEA3 te broj CD86 i CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u duktalnim adenokarcinomima gušterače.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Analizirati odnos imunohistokemijske izraženosti MAGEA3 s brojem CD86 pozitivnih intratumorskih makrofaga u adenokarcinomima gušterače.
2. Analizirati odnos imunohistokemijske izraženosti MAGEA3 s brojem CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u adenokarcinomima gušterače.
3. Analizirati odnos imunohistokemijske izraženosti MAGEA3 s omjerom CD86/CD163 intratumorskih makrofaga u adenokarcinomima gušterače.
4. Usporediti izraženost MAGEA3 te broj i omjer CD86 i CD163 makrofaga s patohistološkim karakteristikama tumora: veličinom tumora, dubinom invazije (pT stadij) tumora, statusom regionalnih limfnih čvorova (pN stadij) i limfovaskularnom invazijom.
5. Usporediti izraženost MAGEA3 te broj i omjer CD86/CD163 makrofaga s kliničkim karakteristikama pacijenata: dob, spol i doživljenje.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorci

Korišteni su arhivski materijali Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ dobiveni nakon resekcije gušterače zbog dukalnog adenokarcinoma u razdoblju od 1.1.2003. do 31.12.2019. godine. U istraživanje su uključeni samo oni bolesnici koji zadovoljavaju sljedeće uvjete: 1. da za bolesnika postoje svi potrebni klinički podaci i adekvatni patohistološki nalaz te praćenje; 2. da uz karcinom gušterače bolesnik nema drugi maligni tumor. Podaci o bolesnicima prikupljeni su iz Bolničkog informacijskog sustava KBC „Sestre milosrdnice“, dok su podaci o datumu smrti prikupljeni iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Doživljenje je praćeno minimalno 24 mjeseca. U istraživanju se nisu koristili osobni podaci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost pacijenta. Svaki bolesnik dobio je jedinstveni broj kojim je uključen u istraživanje, a pravi identitet ispitanika, radi zaštite osobnih podataka bolesnika, poznat je bio samo istraživačima.

4.2. Metode

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 μ m, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Za imunohistokemijsku analizu korištena su primarna monoklonalna protutijela MAGEA3 (ab140678, Abcam, UK), CD86 (ab234401, Abcam, UK) i CD 163 (ab156769, Abcam, UK). Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je EnVision FLEX-PTL metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako Autostainer automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje.

Imunohistokemijska reakcija na MAGEA3 određivana je semikvantitativno.

0: < 10% pozitivnih tumorskih stanica

1: $\geq$ 10% pozitivnih tumorskih stanica

Prema literaturi, M1 makrofagi pretežno izražavaju CD86 antigen, a M2 makrofagi CD163 antigen na površini stanice (144). Intratumorski makrofagi imunohistokemijski obilježeni s CD86 i CD163 brojani su u mjestu najveće koncentracije (tzv "hot spot") te su izraženi kao broj makrofaga po mm². Uzorci su se prema broju CD86, odnosno CD163 makrofaga svrstani u dvije skupine: skupina s niskim i skupina s visokim intratumorskim makrofagima. Za svaki uzorak tumora određen je i omjer intratumorskih makrofaga CD86/CD163 koja je također rangirana kao niski i visoki ovisno o medijanu vrijednosti utvrđenom tijekom istraživanja po primjeru prethodno izvršenih istraživanja o karcinomima želuca i ovarija (145,146).

4.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka trenutak uzimanja uzorka tijekom operativnog zahvata bio je početna točka istraživanja. Završna točka je bila ukupno preživljenje pacijenta. Cilj analize podataka je bio analizirati odnos imunohistokemijske izraženosti MAGEA3 s brojem CD86, CD163 i omjerom CD86/CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u uzorcima adenokarcinoma gušterače. Uspoređena je izraženost MAGEA3 te broj i omjer CD86 i CD163 makrofaga s patohistološkim karakteristikama tumora: veličinom tumora, dubinom invazije (pT stadij) tumora, statusom regionalnih limfnih čvorova (pN stadij) i limfovaskularnom invazijom, te varijablama kirurškog liječenja; komplikacijama, reoperacijom, tipom operacije i pozitivnim resekcijskim rubom. Imunohistokemijske i patohistološke varijable su uspoređene s kliničkim karakteristikama pacijenata: dobi, spolom i doživljenjem. Analiza normalnosti raspodjele podataka je provjerena testom Smirnov-Kolmogorov te su se shodno dobivenim rezultatima koristili parametrijski, odnosno neparametrijski testovi te odgovarajući prikaz kontinuiranih vrijednosti (aritmetičke sredine i standardne devijacije, odnosno medijan). Censusom je označen binarni ishod (živ ili

preminuo). Predviđen je veliki broj varijabli te su korišteni testovi koji mogu kompenzirati nepovoljne omjere broja ispitanika i varijabli. Kako bi se smanjio potencijalno negativni utjecaj malog broja ispitanika na testiranje većeg broja varijabli, učinjena je multivarijatna Coxova regresijska analiza (s vremenom do događaja kao vremenom praćenja u mjesecima). Potom je za svaku varijablu koja bi pokazala statistički značajnu povezanost s preživljenjem učinjena ROC analiza i određena je *cut-off* vrijednost pomoću Youden J faktora kako bi se kontinuirane varijable pretvorile u kategoričke, kao 0 = ispod *cut off* vrijednosti i 1 = iznad *cut off* vrijednosti. Koristeći tako posložene kategoričke varijable, rezultati su prikazani Kaplan Meierovom krivuljom preživljenja. Kao konfirmatorna metoda, učinjena je i analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis) s Obliminovom kosom rotacijom kako bi se izdvojile skupine varijabli koje se u pojavljuju zajedno te potvrdili rezultati multivarijatne regresijske analize. Varijable su uspoređene međusobno uz pomoć Spearmanovog rho koeficijenta korelacije. Svi statistički testovi su bili korišteni kao dvosmjerni. Vrijednosti p manje od i jednake 0.05 određene su statistički značajnima. Statistička obrada podataka je učinjena uz pomoć programa MedCalc (Verzija 11.2.1 © 1993-2010. MedCalc Software bvba Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium).

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanje je bilo uključeno 76 ispitanika koji su kirurški liječeni od histopatološki potvrđenog adenokarcinoma gušterače u Klinici za kirurgiju, KBC Sestre milosrdnice u vremenu od 1.1.2003. do 31.12.2019. godine. Bolesnici su postoperativno praćeni i evidentiran im je onkološki status. Pacijenti su u vrijeme postavljanja dijagnoze bili bez klinički detektibilne druge maligne bolesti.

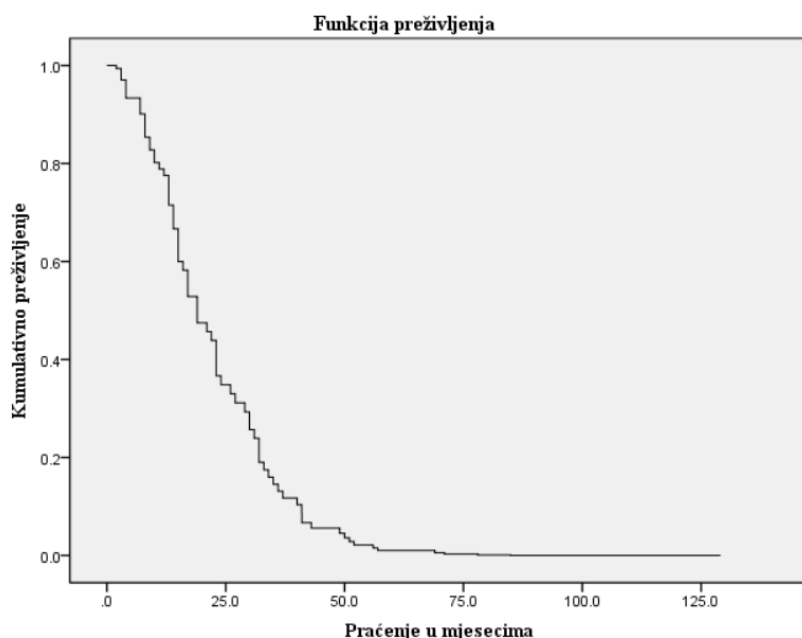
Bilo je 32 muških i 44 ženska ispitanika, što čini muško-ženski omjer od 0.73. Prosječna dob je bila 65.1, s rasponom od 32 do 86 godina starosti i sa standardnom devijacijom od 9.9 godina. Zabilježena je raspodjela demografskih i histopatoloških varijabli (Tablica 3). Prosječna dob muškaraca je bila 64.6 ± 10.3 godina, s medijanom od 65.5, a žena 65.6 ± 9.6 godina, s medijanom od 67 godina.

Tablica 3. Deskriptivna statistika varijabli u uzorku

Svi ispitanici	n=76
Dob u godinama	
Prosjek ± SD	65.14 ± 9.97
Medijan	66.5
Prosječne vrijednosti histopatoloških varijabli	
CD86 (N/mm²)	13.7
CD163 (N/mm²)	393.0
CD/CD163	0.05
MAGEA3	0.32
Pozitivitet MAGEA3 > 10% (N)	36 (47.4)
MAGEA3	32.3
TNM kategorije	
pT1	11
pT2	33
pT3	32
N0	38
N1	35
N2	3
Pozitivni reseksijski rub	18
Tip operacije	
Pankreatoduodenektomija Whipple	56
Totalna pankreatektomija	12
Distalna pankreatektomija	8
Komplikacije	13 (17.1%)
Reoperacija	11 (14.5%)
Broj preminulih pacijenata tijekom praćenja (kritični događaji)	64
Broj pacijenata s cenzoriranim praćenjem (census)	12
Prosjek praćenja u mjesecima	26

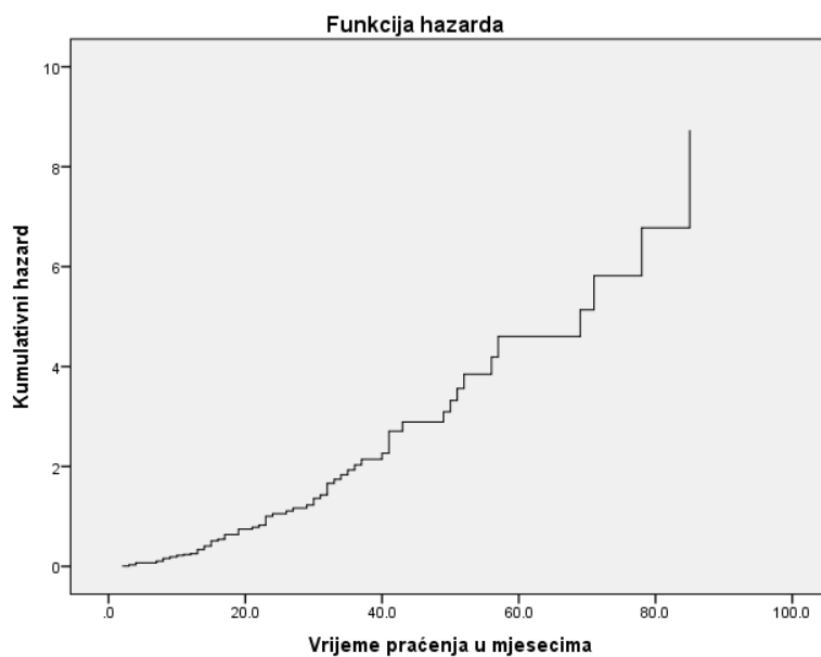
5.2. Duljina praćenja (engl. time to event)

Prosječna dužina praćenja bolesnika, izražena kao aritmetička sredina i standardna devijacija, bila je 26 ± 22 mjeseci. Zbog velike standardne devijacije medijan je preciznija mjera dužine praćenja i iznosi 19.33 mjeseci, uz raspon od 2–129 mjeseci. Detalji deskriptivne statistike za praćenje bolesnika prikazani su na histogramu duljine praćenja bolesnika dobivenom Kaplan Meier krivuljom preživljenja (Slika 5).



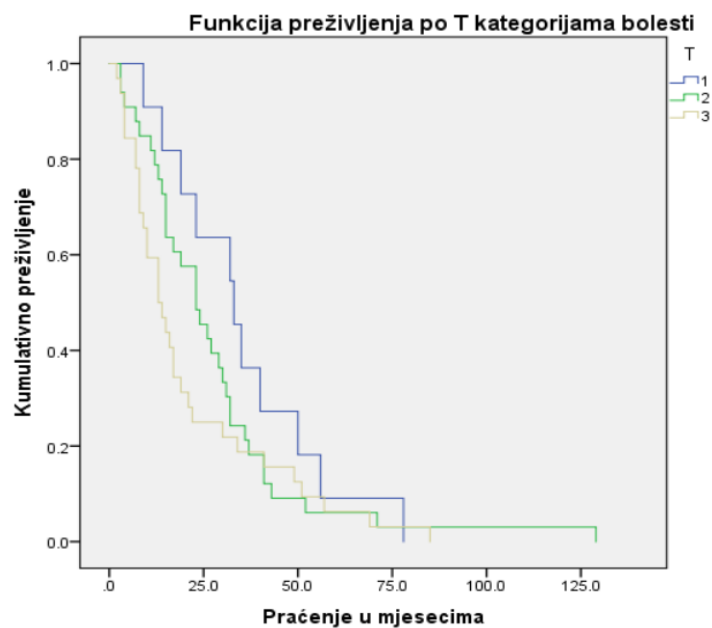
Slika 5. Kaplan Meier krivulja praćenja preživljenja

Kompletnost praćenja izražava se kao cenzorirano ili kompletno. Kompletno praćenje je ono kod kojeg je kritični događaj, u ovom slučaju smrt ispitanika, zabilježen u zadanom vremenu praćenja. Cenzorirano praćenje označava ono kod kojeg, u tom vremenu, kritični događaj nije nastupio odnosno bolesnici su živi. U skupini ispitanika bilo je 65 kritičnih događaja, a 12 cenzoriranih. Vidljiv je porast hazarda obrnuto proporcionalan preživljenju (Slika 6).

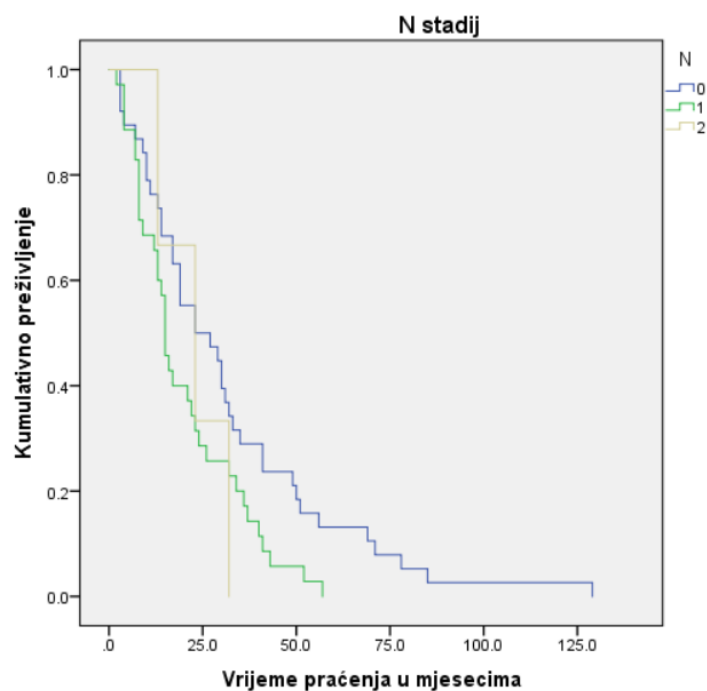


Slika 6. Krivulja porasta hazarda u odnosu na praćenje preživljenja

Vidljivo je slabije preživljenje pacijenata u višim T kategorijama i N stadiju bolesti, što je u skladu s poznatim podacima i validira ovaj statistički model na skupu podataka (Slika 7 i 8).



Slika 7. Kaplan Meierova krivulja preživljenja po T kategoriji bolesti

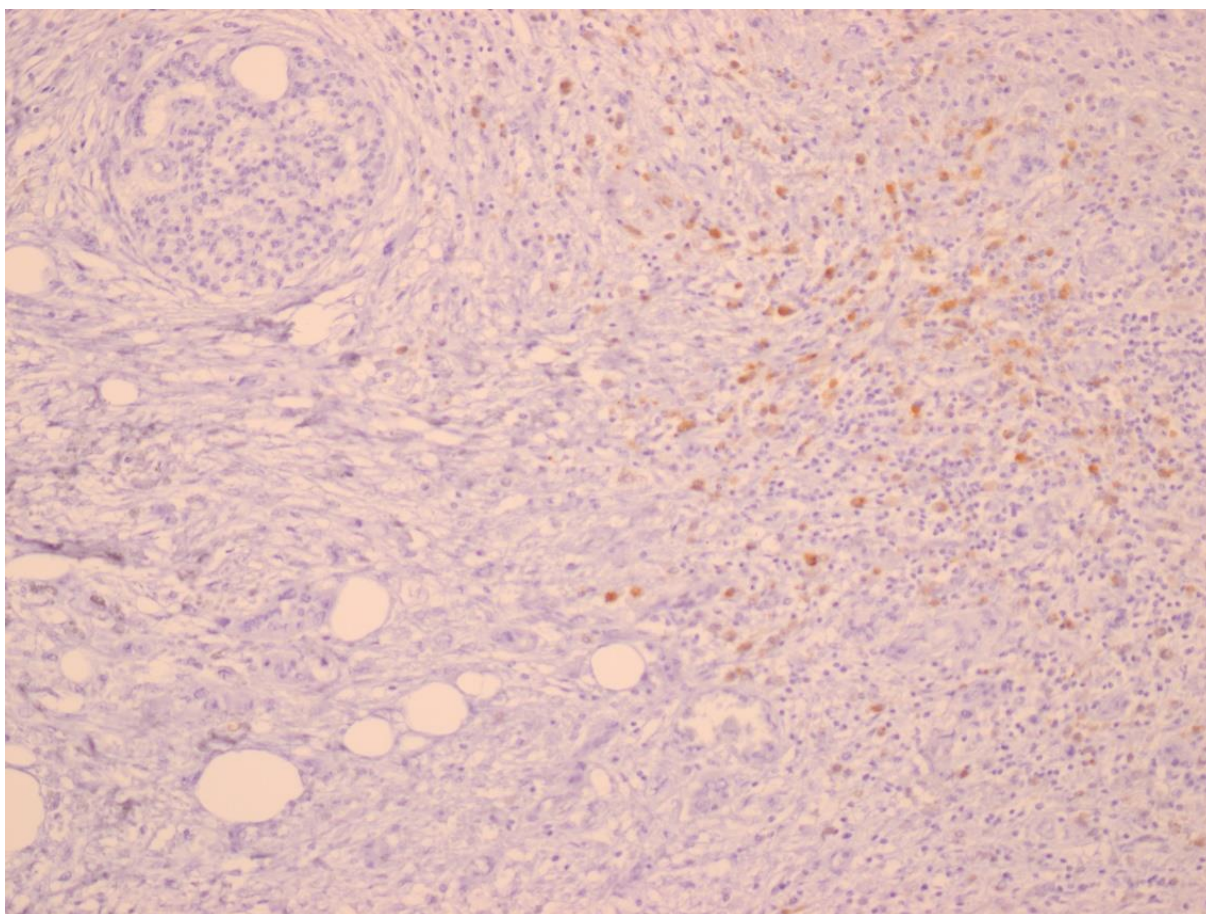


Slika 8. Kaplan Meierova krivulja preživljenja po N stadiju bolesti

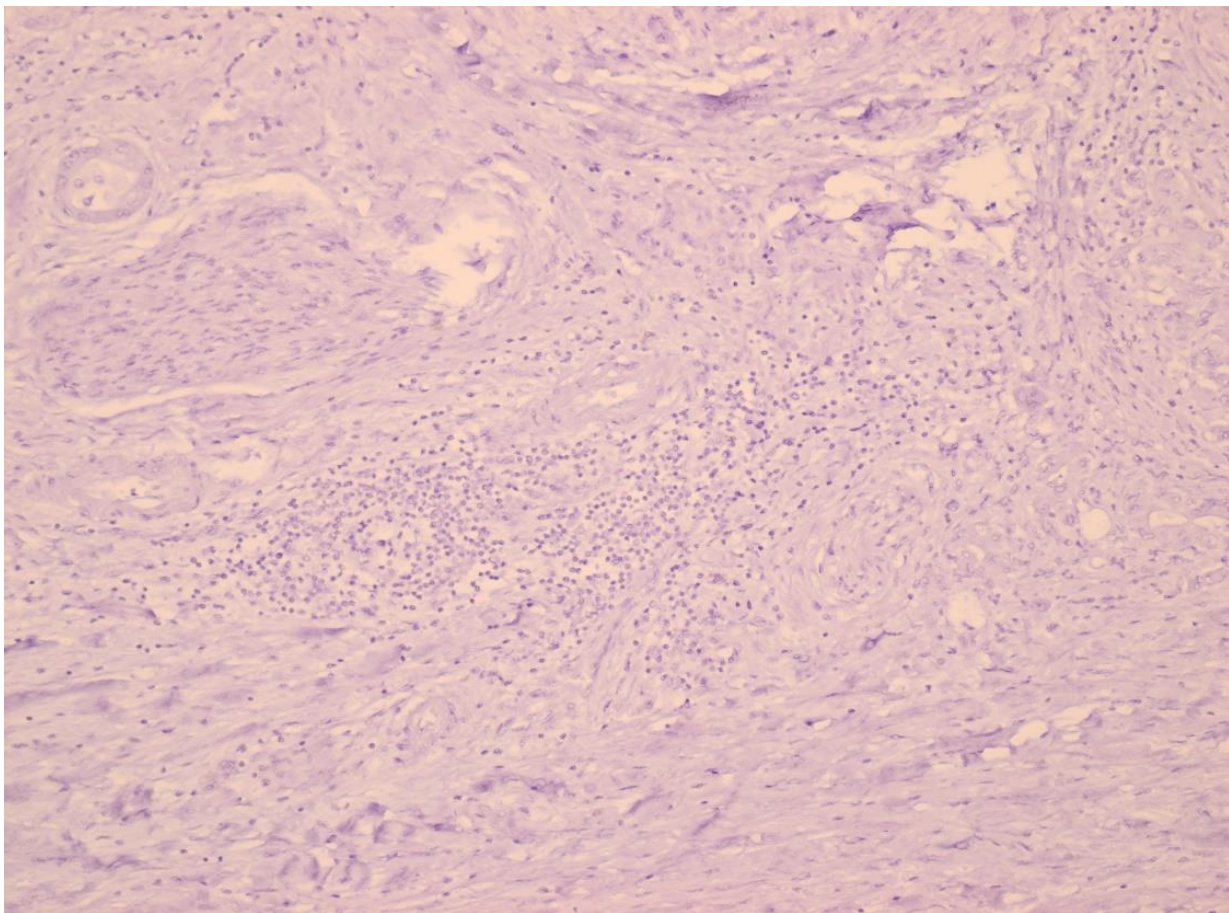
Učinjena je statistička analiza mogućih povezanosti varijabli s preživljenjem ispitanika s označenom kao vremenom do kritičnog događaja, multivarijatnom Coxovom regresijom ($\chi^2 = 61.433$, $df = 16$, $p < 0.001$), koja je pokazala da su sljedeće varijable statistički značajno povezane s ishodom;

- a) broj intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 ($p = 0.025$, omjer hazarda 5.018),
- b) tip operacije totalna pankreatektomija ($p = 0.025$, omjer hazarda 5.023),
- c) pojava komplikacija u postoperativnom tijeku ($p < 0.001$, omjer hazarda 18.691)
- d) potreba za reoperacijom ($p = 0.002$, omjer hazarda 9.165).

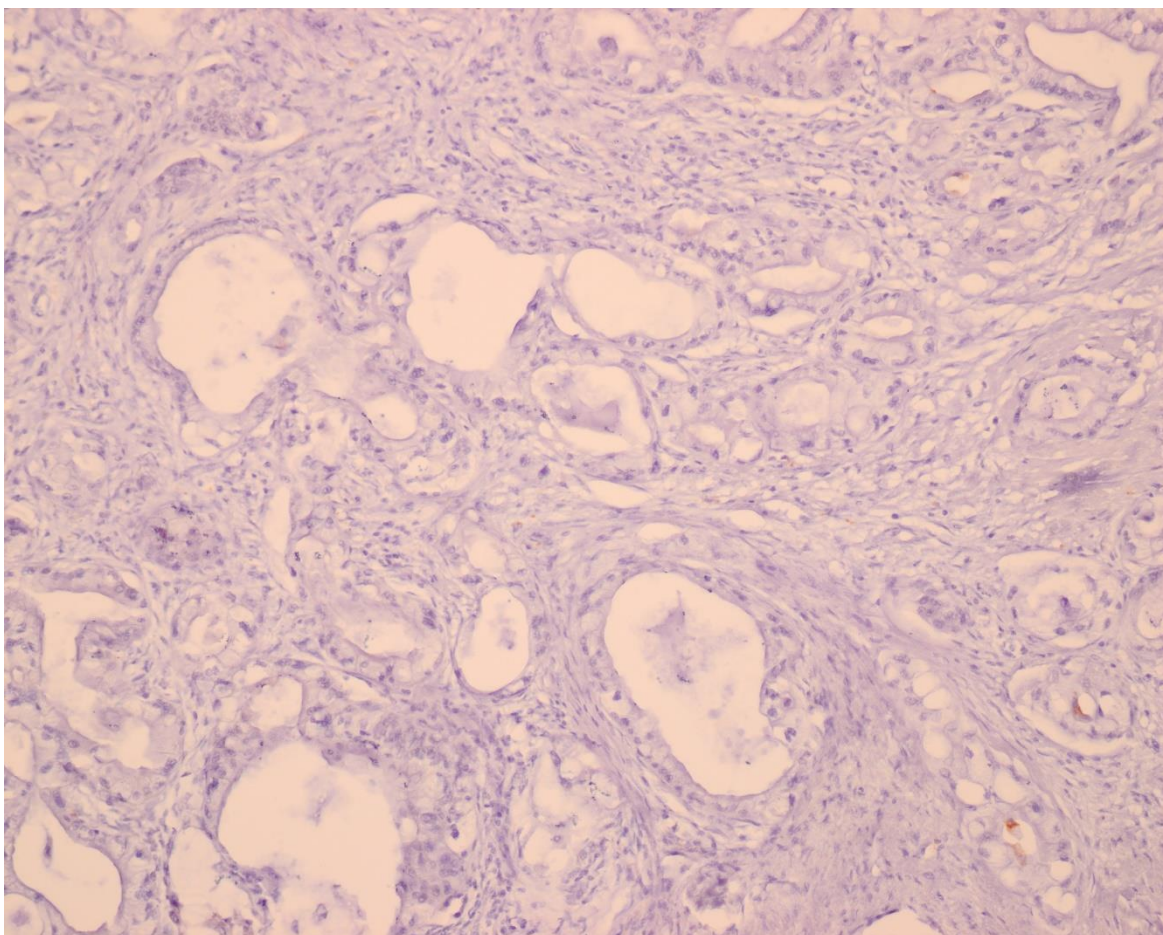
U sljedećem koraku je učinjena ROC analiza (engl. receiver operating characteristic) koja je pomoću Youdenovog indeksa pokazala *cut off* vrijednost područja najveće osjetljivosti i specifičnosti za prediktorsku varijablu broj intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86.



Slika 9. Pozitivna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD86, povećanje 200x

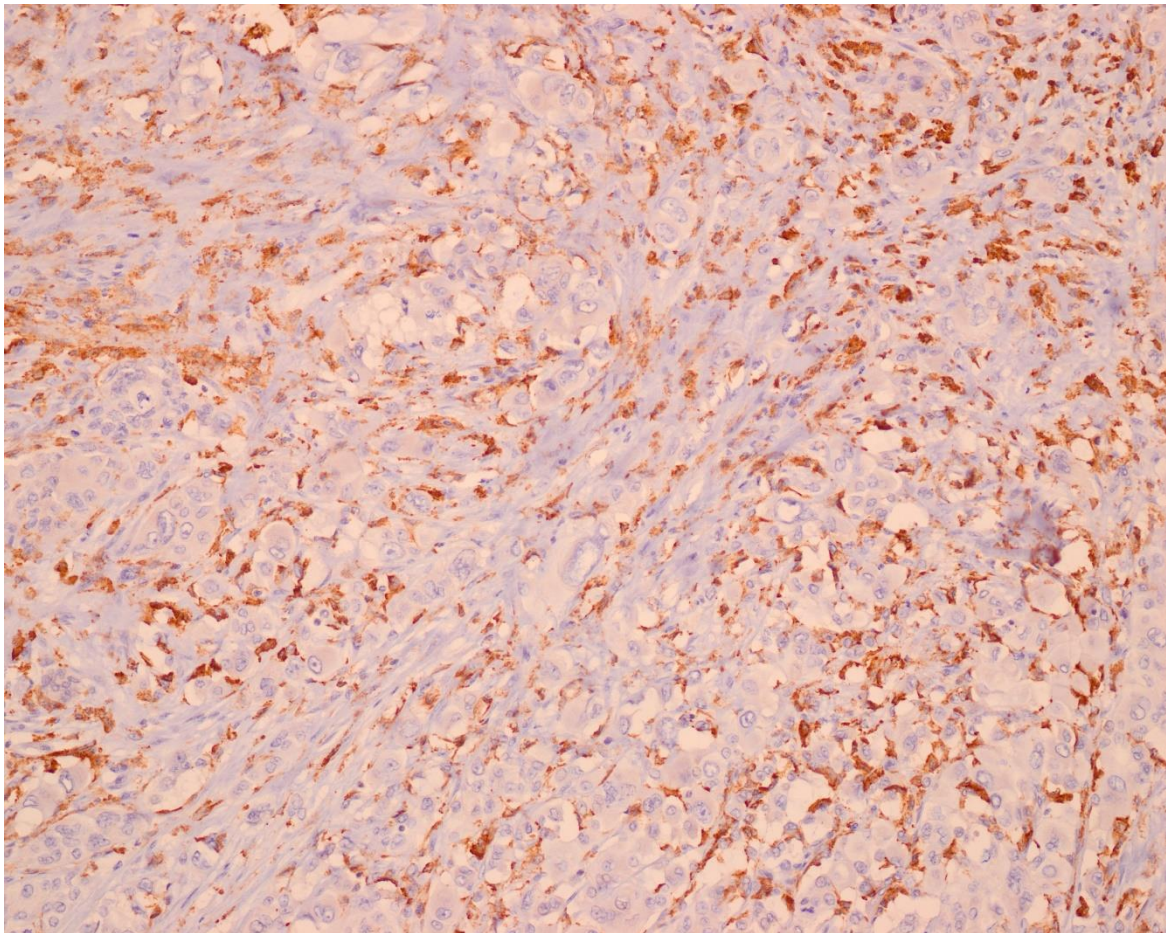


Slika 10. Negativna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD86, povećanje 200x

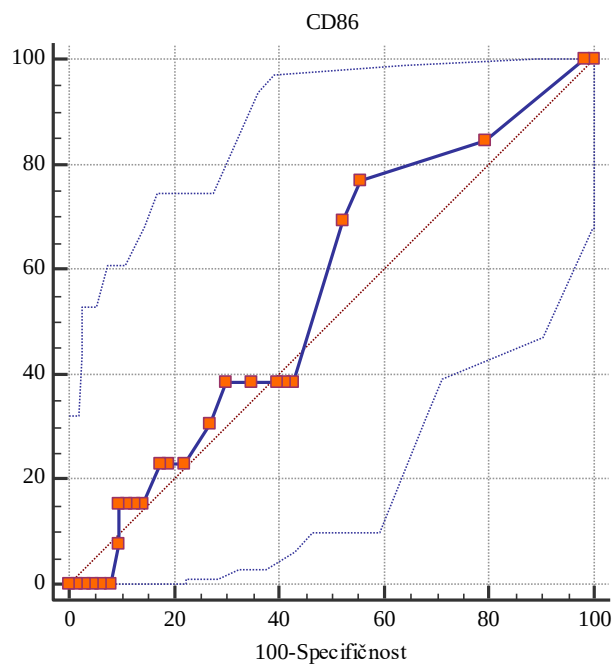


Slika 11. Negativna reakcija makrofaga u području tumora na CD163, povećanje 200x

ROC analiza broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i njegove povezanosti s preživljenjem ispitanika je pokazala da je *cut off* vrijednost izražena uz pomoć Youdenovog indeksa (0.2137) pri kojoj su specifičnost i osjetljivost najveće iznosi ≥ 3 makrofaga/mm² (osjetljivost 76.92%, specifičnost 44.44% s 95%-tnim intervalom pouzdanosti od 46.2 - 95.0% za osjetljivost i 31.9 - 57.5% za specifičnost) (Slika 13). Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost su prikazane posebno (Tablica 4).



Slika 12. Pozitivna imunohistokemijska reakcija makrofaga u području tumora na CD163, povećanje 200x



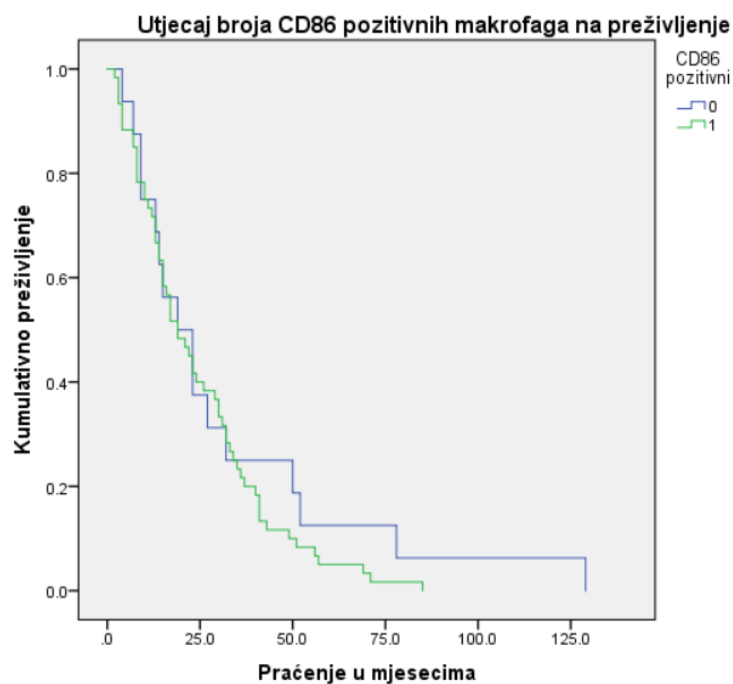
Slika 13. ROC analiza broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i njegove povezanosti s preživljenjem ispitanika

Tablica 4. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost povezanosti broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i preživljenja bolesnika s adenokarcinomom gušterače

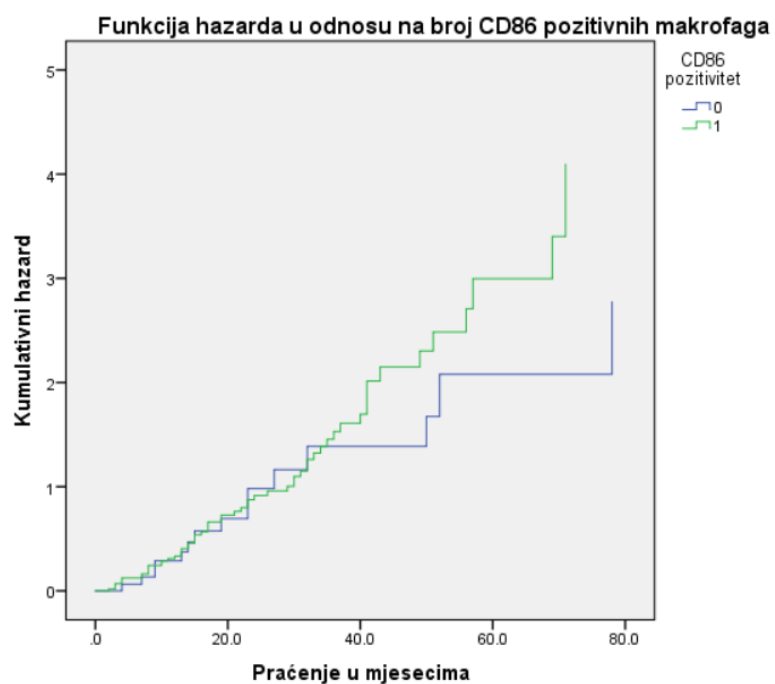
Pozitivna prediktivna vrijednost (%)	87.9
95% CI	76.4 – 95.1
Negativna prediktivna vrijednost (%)	26.8
95% CI	9.9 – 50.9

Potom su vrijednosti broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 pretvorene u kategoričke; ukoliko je vrijednost u uzorku ispitanika bila ≥ 3 makrofaga/mm², pretvorena je u kategoričku varijablu s vrijednošću 1, a ukoliko je vrijednost u uzorku ispitanika bila < 3 makrofaga/mm², pretvorena je u

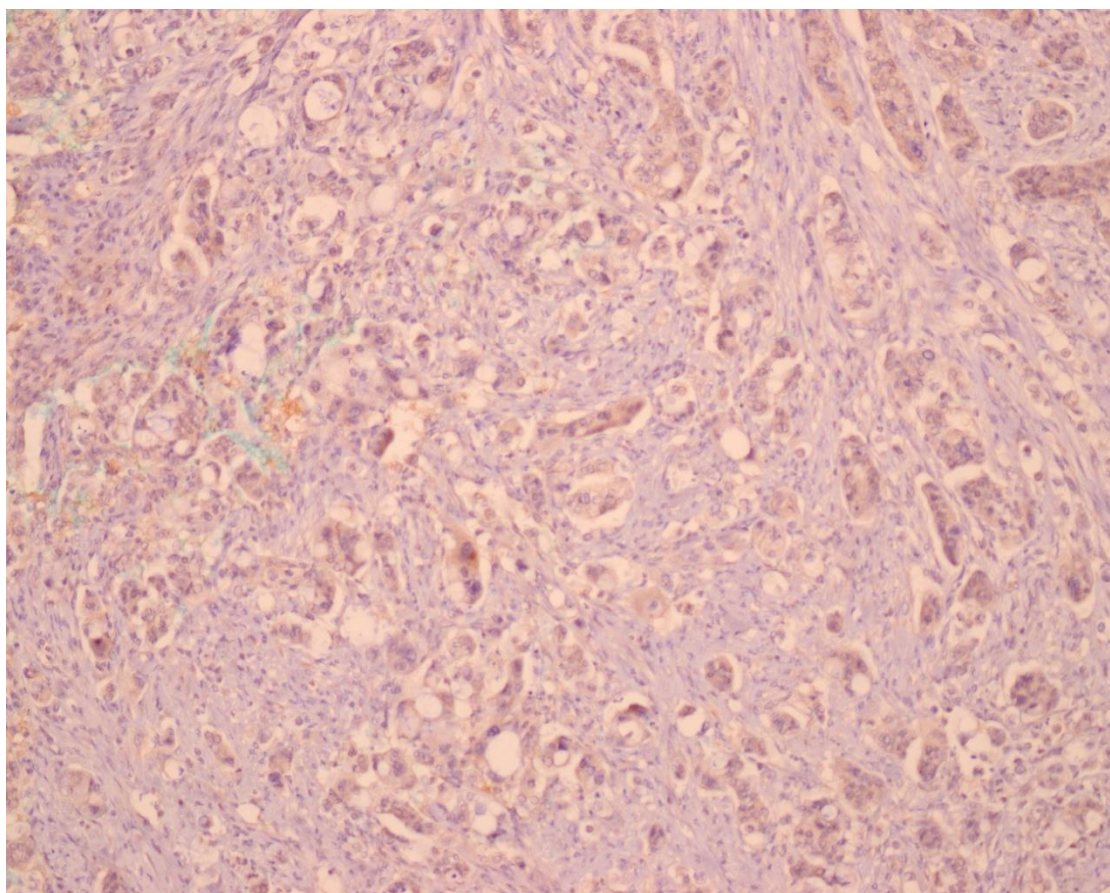
kategoričku varijablu s vrijednošću 0. Povezanost broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i preživljenja pacijenta je prikazana koristeći Kaplan Meier krivulju preživljenja (Slika 14) te grafikon funkcije hazarda (Slika 15).



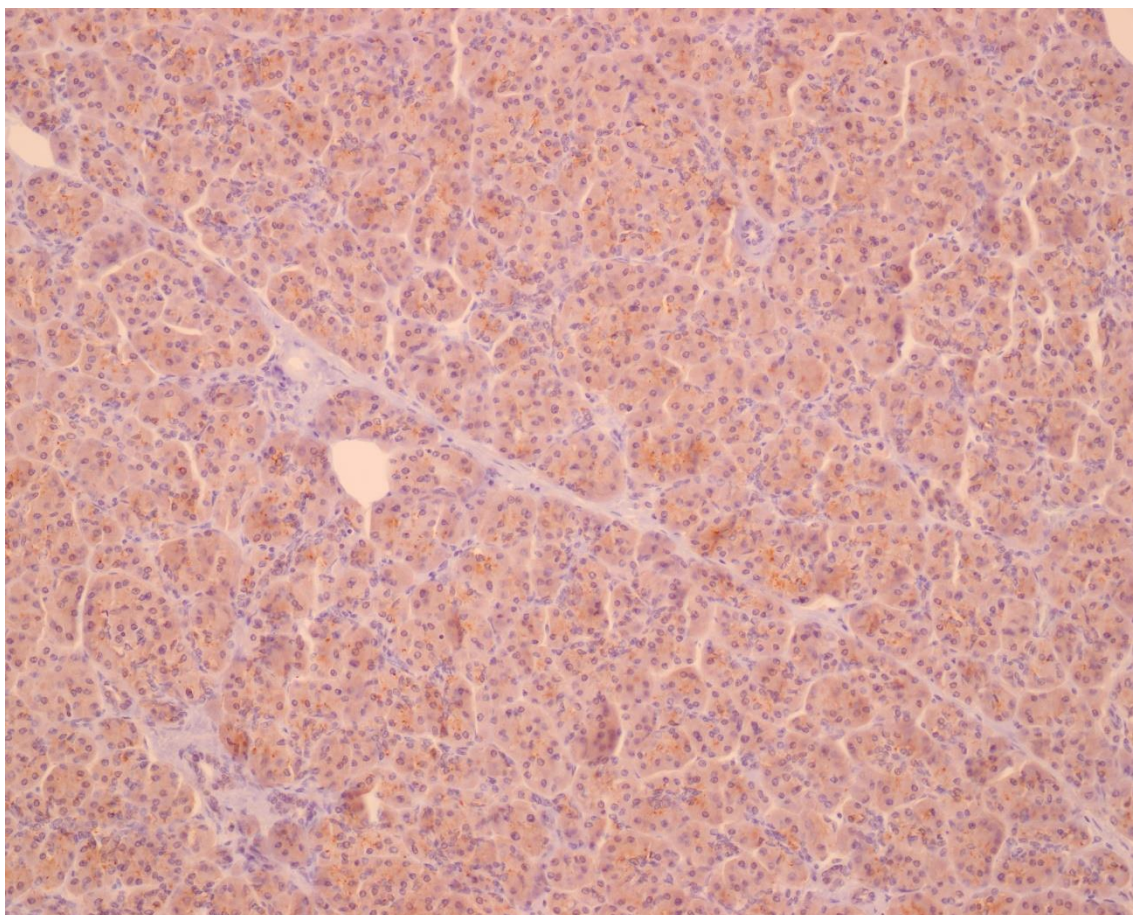
Slika 14. Povezanost broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i preživljenja pacijenta ($p = 0.025$)



Slika 15. Povezanost broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 i porasta hazarda u odnosu na preživljenje pacijenata



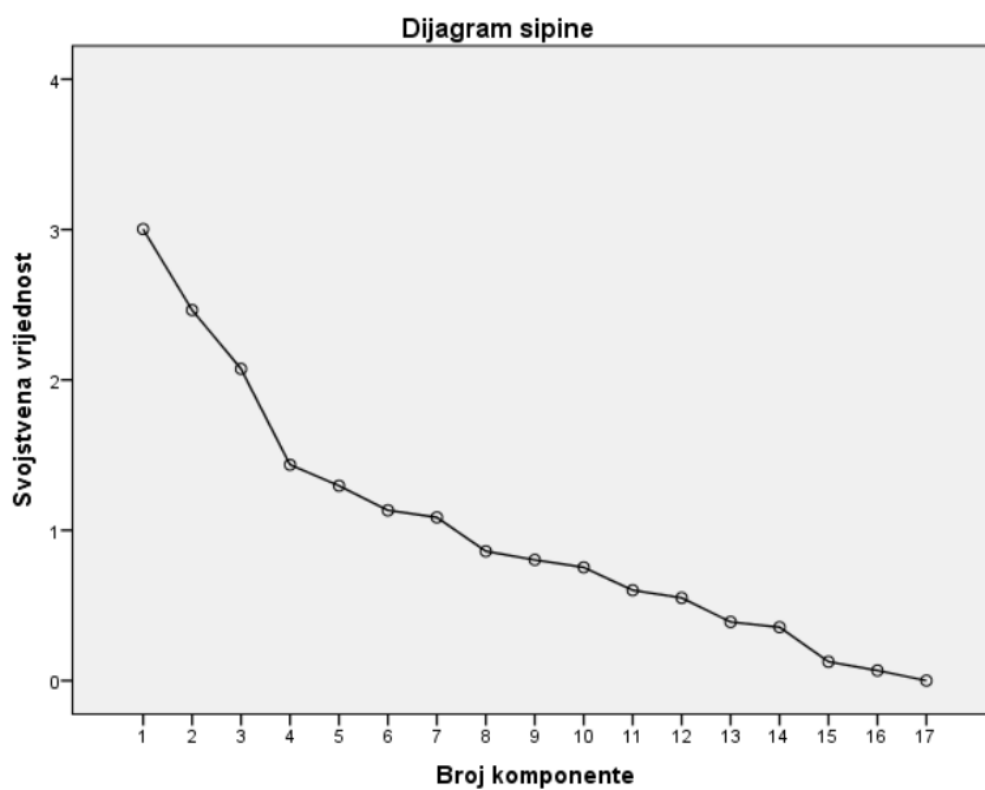
Slika 16. Izraženost MAGEA3 u tumorskim stanicama, povećanje 200x



Slika 17. Izraženost MAGEA3 u normalnim stanicama gušterače, povećanje 200x

5.3. Analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis) varijabli uzorka

Učinjena je konfirmatorna analiza glavnih komponenti koristeći sve ispitivane varijable. Analiza je identificirala sedam komponenti koje kumulativno opisuju 89,125% varijance, pri čemu prve tri komponente opisuju 44,358% varijance (Tablica 5). Dijagram sipine pokazuje da prve tri komponente imaju svojstvene vrijednosti > 5 te se mogu smatrati značajnim glavnim komponentama (Slika 18) (Tablica 6).



Slika 18. Prikaz svojstvenih vrijednosti u analizi glavnih komponenti koji označava prve tri glavne komponente kao značajne deskriptore varijance

Tablica 5. Prikaz ukupnih varijanci analize glavnih komponenti izražaja antigena kod adenokarcinoma gušterače

Prikaz ukupnih varijanci

Komponenta	Inicijalna svojstvena vrijednost			Ekstrakcijske Sume		
	Ukupno	% Varijance	Kumulativno %	Ukupno	% Varijance	Kumulativno %
1	3.003	17.667	17.667	3.003	17.667	17.667
2	2.464	14.497	32.163	2.464	14.497	32.163
3	2.073	12.195	44.358	2.073	12.195	44.358
4	1.436	8.448	52.807	1.436	8.448	52.807
5	1.296	7.625	60.431	1.296	7.625	60.431
6	1.132	6.662	67.093	1.132	6.662	67.093
7	1.086	6.388	73.481	1.086	6.388	73.481
8	.861	5.064	78.544	3.003	17.667	17.667
9	.803	4.725	83.269	2.464	14.497	32.163
10	.754	4.433	87.702	2.073	12.195	44.358
11	.601	3.537	91.239			
12	.551	3.239	94.477			
13	.390	2.296	96.774			
14	.355	2.091	98.865			
15	.126	.739	99.604			

Ekstrakcijska metoda: Analiza glavnih komponenti

Tablica 6. Prikaz koeficijenata korelacije u matriksu prve tri glavne komponente izražaja antigena kod adenokarcinoma gušterače

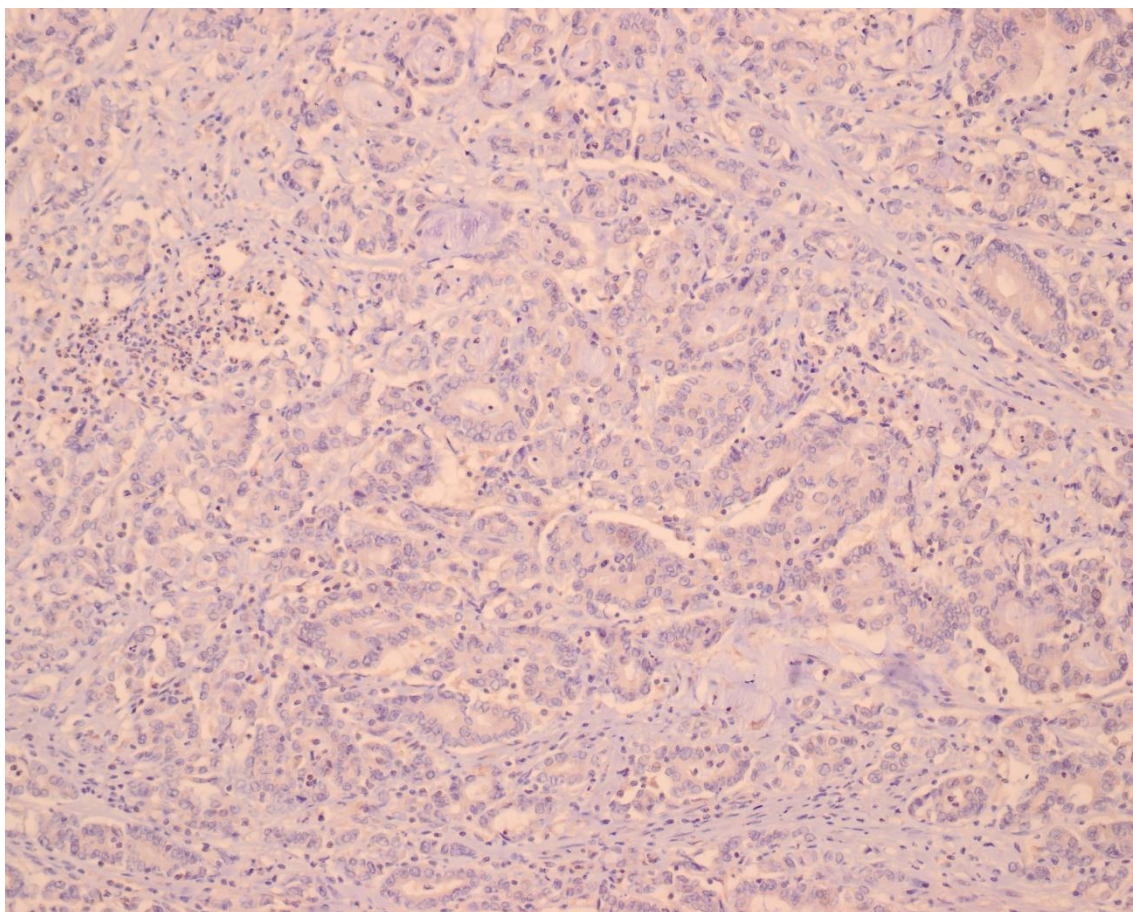
Matriks komponenti			
Varijable	Komponenta		
	1	2	3
CD86	.140	.175	.414
CD86 binarno	.240	.383	.232
CD163	-.022	-.107	-.181
CD86CD163 indeks	.004	.205	.513
MAGEA3	.968	.024	-.159
MAGE3 binarno	.922	.022	-.183
MAGE3	.968	.024	-.159
T	.213	.193	.462
N	.129	.176	.473
RR	.200	-.159	.298
Spol	.021	.385	-.121
Dob	-.035	-.302	-.123
Operacija	.069	.273	.225
Komplikacija	.075	-.913	.044
Reoperacija	.015	-.891	.027
Census	-0.240	.369	-.553

Koeficijenti korelacije prve komponente pokazuju da više vrijednosti varijabli broja intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 (0.140), koja je ranijom statističkom obradom povezana s preživljenjem ispitanika ima značajnu negativnu korelaciju s preživljenjem ispitanika (-0.240).

5.4. Analiza povezanosti demografskih, kliničkih i patohistoloških varijabli ispitanika

Statistička analiza učinjena Spearmanovim rho koeficijentom korelacije usporedila je demografske, kliničke i patohistološke varijable ispitanika (Tablica 7).

Statistička analiza Spearmanovim rho koeficijentom korelacije je pokazala da dob nije povezana s ostalim varijablama, niti s CD86, CD163 vrijednostima, CD86/CD163 omjerom ili izraženošću MAGEA3.



Slika 19. Negativna reakcija na MAGEA3 u tumorskim stanicama, povećanje 200x

Broj intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 je značajno pozitivno korelirao s omjerom CD86/CD163 (Spearman rho koeficijent 0.813, $p < 0.001$), s rastućom T kategorijom (Spearman rho koeficijent 0.223, $p = 0.05$) i N stadijem ispitanika (Spearman rho koeficijent 0.229, $p = 0.046$), dok broj intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD163 nije pokazao značajnih korelacija s ostalim varijablama. Omjer CD86/CD163 je značajno korelirao s brojem CD86 (Spearman rho koeficijent 0.813, $p < 0.001$) i s rastućom T kategorijom (Spearman rho koeficijent 0.230, $p = 0.046$). Status MAGEA3 ekspresije nije pokazao značajnih korelacija s ostalim varijablama.

T kategorija je pozitivno korelirala s omjerom CD86/CD163 (Spearman rho koeficijent 0.230, $p = 0.046$), dok je N stadij pozitivno korelirao s brojem CD86

pozitivnih makrofaga (Spearman rho koeficijent 0.229, $p = 0.046$). Resekcijski rubovi nisu pokazali značajne korelacije s ostalim varijablama. Veći opseg inicijalne operacije je značajno korelirao s manjom vjerojatnošću reoperacije (Spearman rho koeficijent -0.243, $p = 0.034$), a pojava komplikacija je značajno korelirala s vjerojatnošću reoperacije (Spearman rho koeficijent 0.906, $p < 0.001$) i s muškim spolom (Spearman rho koeficijent -0.255, $p = 0.026$).

Tablica 7. Prikaz rezultata statističke obrade povezanosti poznatih varijabli testirane Spearmanovim rho koeficijentom korelacije

		CD86	CD163	CD86CD163	MAGEA3	MAGE3	T	N	RR	Spol	Dob	Operacija	Komplikacija	Reoperacija
CD86	Koeficijent korelacije	1.000	.098	.813**	.004	.004	0.223*	.229*	-.012	.109	-.056	.043	-.182	-.159
	P		.399	.000	.975	.975	.050	.046	.917	.351	.632	.710	.116	.170
CD163	Koeficijent korelacije	.098	1.000	-.175	-.008	-.008	-.027	.041	.086	-.072	.068	-.047	.134	.034
	P	.399		.132	.944	.944	.815	.722	.460	.538	.559	.690	.249	.770
CD86/CD163	Koeficijent korelacije	.813**	-.175	1.000	.017	.017	.230*	.164	-.002	.078	-.037	.080	-.193	-.130
	P	.000	.132		.887	.887	.046	.158	.985	.500	.754	.490	.094	.264
MAGEA3	Koeficijent korelacije	.004	-.008	.017	1.000	1.000**	.153	-.051	.104	-.015	-.051	-.086	.048	-.018
	P	.975	.944	.887			.186	.664	.373	.898	.659	.458	.679	.881
Reoperacija	Koeficijent korelacije	-.159	.034	-.130	-.018	-.018	-.115	-.192	.123	-.255*	.119	-.243*	.906**	1.000
	P	.170	.770	.264	.881	.881	.321	.096	.291	.026	.308	.034	.000	
T	Koeficijent korelacije	.223	-.027	.230*	.153	.153	1.000	.094	.058	-.027	-.201	.192	-.088	-.115
	P	.053	.815	.046	.186	.186		.417	.621	.816	.082	.096	.451	.321
N	Koeficijent korelacije	.229*	.041	.164	-.051	-.051	.094	1.000	.039	.031	.084	-.012	-.117	-.192
	P	.046	.722	.158	.664	.664	.417		.737	.790	.470	.921	.316	.096
RR	Koeficijent korelacije	-.012	.086	-.002	.104	.104	.058	.039	1.000	.162	.071	.018	.158	.123
	P	.917	.460	.985	.373	.373	.621	.737		.163	.544	.875	.173	.291
Spol	Koeficijent korelacije	.109	-.072	.078	-.015	-.015	-.027	.031	.162	1.000	.057	.013	-.250*	-.255*
	P	.351	.538	.500	.898	.898	.816	.790	.163		.628	.914	.030	.026
Dob	Koeficijent korelacije	-.056	.068	-.037	-.051	-.051	-.201	.084	.071	.057	1.000	-.170	.201	.119
	P	.632	.559	.754	.659	.659	.082	.470	.544	.628		.143	.082	.308

		CD86	CD163	CD86CD163	MAGEA3	MAGE3	T	N	RR	Spol	Dob	Operacija	Komplikacija	Reoperacija
Operacija	Koeficijent korelacije	.043	-.047	.080	-.086	-.086	.192	-.012	.018	.013	-.170	1.000	-.198	-.243*
	P	.710	.690	.490	.458	.458	.096	.921	.875	.914	.143		.086	.034
KomplikacijaBIN	Koeficijent korelacije	-.182	.134	-.193	.048	.048	-.088	-.117	.158	-.250*	.201	-.198	1.000	.906**
	P	.116	.249	.094	.679	.679	.451	.316	.173	.030	.082	.086		.000

*nastavak tablice s prethodne stranice

6. RASPRAVA

U naše istraživanje je bilo uključeno 76 ispitanika koji su kirurški liječeni od histopatološki potvrđenog adenokarcinoma gušterače. Dodatnih 44 pacijenta je isključeno iz studije zbog nepotpunih podataka u arhivi te lošeg patohistološkog materijala na kojem nije bilo moguće provesti adekvatnu imunohistokemijsku analizu.

Omjer od 32 muška i 44 ženska ispitanika odnosi se samo na pacijente s resektabilnom bolesti i bez ranog postoperativnog mortaliteta, što objašnjava diskrepanciju s inače većom incidencijom kod muškog spola (147). Prosječna dob ispitanika prilikom dijagnoze i operacije bila je nešto veća od 65 godina, što ukazuje na nešto raniju pojavnost u našoj populaciji u odnosu na svjetski prosjek koji je oko 70 godina (2). Zadnje statistike pokazuju kako je incidencija karcinoma gušterače u porastu, kako u EU tako i u Republici Hrvatskoj (23,24).

Medijan praćenja koje kod većine pacijenata označava postoperativno preživljenje iznosio je 19.33 godine, što je u skladu sa svjetskim rezultatima u toj kategoriji – u istraživanje su uključeni samo pacijenti s resektabilnom bolešću (46). Kod manjeg dijela pacijenata tumor je odstranjen u T1 stadiju (11 pacijenata), dok su pacijenti s većim tumorima bili raspoređeni ravnomjerno (T2 - 33 pacijenta, T3- 32 pacijenta). Kod limfogene diseminacije rezultati su nešto bolji, pa je N0 stadij bio prisutan kod 38 pacijenata, N1 kod 35 a N2 stadij kod samo 3 pacijenta uključenih u studiju.

Statističkom analizom prikazano je kako je slabije preživljenje pacijenata u višim T kategorijama i N stadiju bolesti, što je također u skladu s poznatim podacima (Kaplan Meierove krivulje prikazane u slikama 5 i 6). Koristeći podatke iz SAD-a i nekoliko europskih država (preko 125000 pacijenata) dobno stratificirano trogodišnje preživljenje bilo je 20–34% (< 60 godina), 14–25% (60–69 godina) i 9–13% (≥ 70 godina) u stadijima I–II; te 2–5% (< 60 godina), 1–2% (60–69 godina) i < 1–1% (≥ 70 godina) u stadijima III–IV raka gušterače (148). Vidljiva je značajna razlika u

preživljenju ovisno o stadiju bolesti, ali rezultati također variraju ovisno o dobnoj skupini.

Među 76 ispitanika 56 ih je podvrgnuto cefaličnoj duodenopankreatektomiji (Whippleova operacija), 12 totalnoj pankreatektomiji a 8 distalnoj pankreatektomiji. Među grupom bolesnika operiranih Whippleovom metodom kod 53 pacijenta učinjena je pankreatikojejunalna anastomoza dok je kod 3 pacijenta formirana pankreatikogastrična. Ova kirurška tehnika je dominantna u našoj ustanovi zbog većeg tehničkog iskustva i nešto boljih rezultata prikazanih u prethodno provedenoj studiji naših operatera (149).

Statistička analiza rezultata kliničkih parametara (operacijski rezultati) bili su očekivani, jer opsežniji kirurški zahvat u našoj ustanovi ukazuje na veći ili multicentrični tumor. To je naznačeno omjerom rizika (5,023) za totalnu pankreatektomiju za razliku od Whippleovog postupka ili distalne pankreatektomije. U nekim svjetskim centrima koristi se primarna totalna pankreatektomija i kod nižih stadija tumora glave gušterače. U tim slučajevima po studijama nema značajnije razlike u dugoročnom preživljenju, no uz ipak nešto viši rani postoperativni morbiditet i mortalitet (150). Također, kod totalne pankreatektomije prisutna je veća stopa komplikacija, duže vrijeme operiranja i veći gubici krvi (151). Viša rata postoperativnih komplikacija prikazana je u našem istraživanju kod te metode te je povezana s lošijim ishodom liječenja ($p < 0.001$, omjer hazarda 18.691). Kako su operacije gušterače jedne od najzahtjevnijih po operatera i pacijenta u kirurgiji uopće, iz naše studije je isključeno dodatnih 9 bolesnika koji su umrli unutar mjesec dana od operacije zbog postoperativnih komplikacija. Učestalost komplikacija kod ostalih pacijenata je 17.1%, dok je reoperacija bila potrebna kod 11 pacijenata (14.5%), što također odgovara uobičajenom rasponu u svjetskim statistikama. Pojava komplikacija je očekivano značajno korelirala s vjerojatnošću reoperacije (Spearman rho koeficijent 0.906, $p < 0.001$). Komplikacije zabilježene u studiji su dehiscencija anastomoze, postoperativne kolekcije, krvarenje i pankreatična fistula – također u skladu s literaturom (50).

Unatoč naporima znanstvenika diljem svijeta prognoza preživljenja pacijenata oboljelih od adenokarcinoma gušterače ostaje iznimno loša, petogodišnje preživljenje je oko 6 % (152). Kirurško liječenje je i dalje jedina kurativna mogućnost unatoč napretku u razumijevanju patofiziologije i molekularnog mehanizma razvoja tumora. Zbog navedene loše prognoze liječenja kod oboljelih od karcinoma gušterače pokušava se naći odgovarajuće antigene koji bi postali meta za ciljanu onkološku i imunološku terapiju.

Kao što je ranije opisano, antigeni eksprimirani u germinativnim tkivima predstavljaju dobre mete za imunoterapiju jer se eksprimiraju u tumorskim stanicama i testisu, imunološki privilegiranom mjestu, ali imaju ograničenu ekspresiju u normalnom tkivu. Dodatna prednost u ciljanju ovih antigena za imunoterapiju je da se njihova ekspresija može selektivno pojačati u tumorskim stanicama putem epigenetske regulacije s agensima za remodeliranje kromatina. Trenutačno zanimanje za ciljanje ovih molekula kod raka gušterače je utemeljeno na rezultatima studija kod raznih vrsta malignih bolesti (153). Cilj je bio postići uspjeh imunoterapije kakav je postignut kod primjerice malignih melanoma (154). Rezultati prvih pretkliničkih studija kod karcinoma gušterače bili su obećavajući, no zasad nisu uspješno prevedeni u kliničku uporabu (155). Također kako je ranije navedeno cilj istraživanja je i proučiti postoji li kakav odnos TAM-ova s izraženosti MAGEA3 antigena.

MAGEA3 je pogodan za istraživanje jer je dokazano detektiran kod tumorskih stanica raznih neoplazmi, uključujući karcinom dojke i melanom (156,157). Jedna od rijetkih studija na temu povezanosti s rakom gušterače pokazala je da se primjenom demetilirajućih sredstava povećava ekspresija MAGEA3 u linijama tumorskih stanica. Također je povezana povećana ekspresija MAGEA3 s povećanim prepoznavanjem od strane MAGEA3 specifičnih T- limfocita (153). Ograničenja ovakvih studija sastoje se od toga da su poglavito obavljana u in vitro uvjetima, te kao takva ne mogu uključiti složene mehanizme koji su prisutni in vivo (a posebice u kliničkim uvjetima). Rijetke studije koje su provedene s pacijentima odnose se također na razne neoplazme (tj. nisu specifične za tumor gušterače) te su limitirane malim brojem ispitanika (158). Klinička randomizirana studija MAGRIT ambiciozno je pokušala

dokazati učinkovitost MAGEA3 imunoterapije na 2312 pacijenata oboljelih od nemikrocelularnog raka pluća, no nije bilo razlike u preživljenju između ljudi koji su dobivali terapiju u odnosu na kontrolnu (placebo) grupu (159).

Osim nemogućnosti kontroliranja uvjeta, problem u kliničkim uvjetima čini i toksičnost potencijalne imunoterapije. Imunogenost toksina, nuspojave, ograničeni poluživot i naknadno razvijena rezistencija neki su od problema koji čine prepreku za buduću kliničku primjenu (160).

Kao što je ranije prikazano, u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost izraženosti MAGEA3 antigena s ostalim parametrima uključenima u studiju kao što su stadij bolesti, preživljenje pacijenata i broj tumorski povezanih makrofaga u tkivu tumora. Nije nađena značajna povezanost ni s T i N stadijem tumora ($p=0.186$ i $p=0.664$). Kao cilj ovog rada postavljeno je pitanje odnosa izraženosti MAGEA3 s brojem CD86 i CD163 označenih makrofaga, kao i s njihovim omjerom (CD86/CD163) – rezultati ne ukazuju na statistički značajnu korelaciju (p vrijednosti su redom 0.975, 0.944 i 0.887).

Studija na 57 operiranih pacijenata provedena u SAD-u pokazala je duže preživljenje pacijenata bez izraženosti MAGEA3 antigena u tkivima karcinoma gušterače. Medijan praćenja bio je 15 mjeseci, a 61% ispitanika je u tom vremenskom razdoblju preminulo. Ipak, kada su se u statističkoj analizi studije pridodali klinički i patološki kriteriji izraženost MAGEA3 više nije bila značajna za preživljenje, te je glavni kriterij bio stadij tumora (104). Ovo istraživanje je također pokazalo veću izraženost MAGEA3 antigena kod slabije diferenciranih tumora gušterače.

U usporedbi s pretkliničkim studijama koje su optimistično predviđale kako će MAGE antigeni biti pogodan kandidat za imunoterapiju kod više vrsta malignih bolesti, mali broj istraživanja koji uključuju i kliničke parametre zasad ne pokazuje tako konkluzivne rezultate. Jedan od razloga klinički lošijih antitumorski imunoloških odgovora u ispitivanjima bila je dijelom suboptimalna intracelularne bioraspoloživost tumor specifičnih antigena HLA molekulama klase I (161).

Novije studije fokusirane su upravo na bolje razumijevanje i modulaciju imunološkog odgovora koja bi bila zaslužna za učinkovitije uništavanje tumorskih stanica. Primjerice, eksperimentom provedenim u Detroitu (SAD) modulacija imunog odgovora je pokušana određenim peptidima koji bi pospješili otkrivanje i reakciju na unutarstanični antigen, te je kao rezultat primijećeno pojačano lučenje interferona zaslužnih za stanično razlaganje (162). Predloženo je također koristi saprofitne mikroorganizme kao vektor protutumorskog cjepiva. Istraživači iz Kine su za tu svrhu koristili *Mycobacterium smegmatis*, brzorastuću saprofitnu bakteriju, te su u in vitro pokazali mogućnost modulacije imunološkog odgovora (163).

Kliničke studije ograničene su najčešće relativno kratkim periodom praćenja uzrokovanih niskim preživljenjem te malim brojem pacijenata koji zadovoljavaju uvjete istraživanja. Također provođenje opsežne prospektivne studije na velikom broju pacijenata ograničeno je financijskim uvjetima i dužim potrebnim periodom praćenja. Autori se generalno slažu kako su potrebne dalje studije su kako bi se razjasnili mehanizmi u efekta promjena metilacije na ekspresiju antigena, kao i detaljnije razumijevanje imunološkog odgovora povezanog s tumorom (103).

Još od otkrića makrofaga povezanih s tumorom (TAM) njihova je uloga evaluirana i postali su zanimljivi za ciljano liječenje raka (164). Dok su rana in vitro istraživanja polarizirala TAM-ove i proglasila M2 makrofage izrazito pro-tumorskim (165), druge su studije pokazale složeniji odnos između tipova M1 i M2, pokazujući da se oni mogu modulirati u spektru (121). Budući da je većina studija rađena s različitim malignim bolestima, kako in vitro tako i in vivo (prvenstveno na pokusnim životinjama) (166), u ovom segmentu istraživanja odlučili smo se također fokusirati na kliničko istraživanje kod pacijenata operiranih zbog adenokarcinoma gušterače. Postoje brojne studije koje istražuju vezu između TAM-a i raka gušterače, no većina je bila provedena u pretkliničkim uvjetima (167–169) i odlučeno je pokušati uključiti klinički aspekt istraživanja.

Broj CD86 intratumorskih makrofaga i omjer CD86/CD163 pokazali su statistički značajnu korelaciju s porastom T i N stadija bolesti. Broj intratumorskih makrofaga imunohistokemijski obilježenih s CD86 je značajno pozitivno korelirao s omjerom CD86/CD163 (Spearman rho koeficijent 0.813, $p < 0.001$), s rastućom T kategorijom (Spearman rho koeficijent 0.223, $p = 0.05$) i N stadijem ispitanika (Spearman rho koeficijent 0.229, $p = 0.046$). Omjer CD86/CD163 je značajno korelirao s rastućom T kategorijom (Spearman rho koeficijent 0.230, $p = 0.046$). Broj CD163 makrofaga nije pokazao statistički značajnu korelaciju s navedenim varijablama.

Ovi rezultati pokazuju da su u našim kliničkim uvjetima proupalni (ili M1) makrofagi bili izraženiji u lokalno uznapredovalim stadijima tumora s lošijom dugoročnom prognozom. Razlozi za to mogu biti brojni, a čini se da ukazuju na to da se u određenim stanjima M1 makrofagi također mogu smatrati čimbenikom lošijih ishoda liječenja. Pokušano je analizirati i usporediti naše nalaze s drugim autorima, budući da neke novije studije nisu mogle postići konsenzus o prognostičkoj vrijednosti aktivacije M1 i M2 makrofaga.

Ova nekonvencionalna povezanost prikazana je u sličnim kliničkim studijama koje se tiču glioma, meduloblastoma i karcinoma pluća nemalih stanica (170–172). U studiji o meduloblastomima, istraživači su pretpostavili da ova korelacija može biti uzrokovana višestrukim čimbenicima; visoko regrutiranje M1 makrofaga može pomoći rastu tumora i napredovanju suprotno od njegove uloge u drugim vrstama raka. Oni također teoretiziraju da su M1 makrofagi iznimno regrutirani kako bi pojačali tumoricidni učinak u agresivnoj skupini meduloblastoma (ali ovaj mehanizam sam po sebi nije bio dovoljan u borbi protiv određene malignosti); pojačano regrutiranje M1 je epifenomen, a te stanice jednostavno regrutiraju drugi inicijatori meduloblastoma i ne utječu izravno na prognozu (170). Još jedan primjer različitih rezultata prikazan je u istraživanju koje se tiče karcinoma pluća nemalih stanica; broj makrofaga M1 bio je veći u stromi pacijenata s lošom prognozom u usporedbi s pacijentima s dobrom prognozom. Makrofagi M1 mogu biti u “pogrešnom” tkivnom odjeljku za modulaciju aktivnosti tumora jer se čini da se ključni imunološki odgovori koji utječu na

preživljavanje kod karcinoma pluća nemalih stanica odvijaju u tumorskim otočićima, a ne u stromi (171). U studiji koja prikazuje gliome, pretpostavljeno je da makrofagi M1 negativno utječu na liječenje antitijelima i posljedično smanjuju stope preživljavanja (172).

Kao što je ranije spomenuto, postoje novi pogledi na odnos M1/M2 makrofaga koje treba uzeti u obzir - proces aktivacije makrofaga je složen i uključuje monocite (173) i dendritične stanice porijeklom iz mijeloidnog tkiva (174). U tkivima to stvara određeni fenotip makrofaga koji se ne može uvijek svrstati u određenu skupinu – potrebna su dodatna istraživanja o makrofagima in vivo i na razini populacije kao i staničnoj razini (121).

Ipak, određene studije su dobile rezultate koji ukazuju na M2 makrofage kao dominantniji fenotip u tumorskim stanicama u pacijenata s kraćim rasponom preživljenja i agresivnijim sojevima bolesti (175–177). U studiji o uvealnom melanomu utvrđeno je da je pozitivno bojenje na CD163 (M2) povezano sa zahvaćenošću cilijarnog tijela i monosomijom kromosoma 3, a odsutnost takvog bojenja povezana je s povećanim preživljavanjem (176). Druga je studija otkrila pozitivnu korelaciju između M2 makrofaga i regulatornih T limfocita koji bi mogli, zajedno s drugim supresorskim stanicama kao što su supresorske stanice izvedene iz mijeloidnog tkiva, promicati imunosupresivno okruženje kod agresivnog raka prostate (177). Razlike u rezultatima studija pokazuju da je u kliničkim studijama s različitim vrstama tumora uključeno više čimbenika od jednostavne M1/M2 polarizacije. Većina studija općenito ima relativno mali broj sudionika i moraju se usredotočiti na specifične tumorske stanice, što ograničava njihovu uvjerljivost. Ovi rezultati također sugeriraju da imunološki odgovor kod različitih tipova zloćudnih bolesti još uvijek nije posve jasan u kliničkim, in vivo uvjetima.

Što se tiče raka gušterače, MAGEA3 i TAM-ovi bi i dalje mogli biti valjani prognostički marker ili čak meta za terapijske agense međutim bit će potrebno učiniti dodatne studije kako bi se u potpunosti shvatio utjecaj diferencijacije M1/M2 te uloge

MAGEA3 u imunološkom odgovoru. Usprkos tome, kirurško liječenje će vjerojatno ostati zlatni standard u bliskoj budućnosti.

7. ZAKLJUČCI

1. Broj CD86 intratumorskih makrofaga i omjer CD86/CD163 pokazali su statistički značajnu korelaciju s porastom T i N stadija bolesti. To ukazuje da su u našim kliničkim uvjetima proupalni (ili M1) makrofagi bili izraženiji u lokalno uznapredovalim stadijima tumora s lošijom dugoročnom prognozom.
2. Nije dokazana povezanost MAGEA3 antigena s ostalim parametrima uključenima u studiju kao što su stadij bolesti, preživljenje pacijenata i broj tumorski povezanih makrofaga u tkivu tumora. Nije nađena značajna povezanost ni s T i N stadijem tumora.
3. Klinički (TNM) stadij je glavni indikator postoperativnog preživljenja, dok je stopa komplikacija usporediva sa svjetskim prosjekom.
4. Prosječno razdoblje preživljenja pacijenata operiranih zbog adenokarcinoma gušterače u skladu je s prosječnim preživljenjem zabilježenim u svjetskoj literaturi.
5. MAGEA3 i TAM-ovi imaju potencijal biti valjani prognostički marker ili čak meta za terapijske agense, no potrebne su također dodatne studije u kliničkim uvjetima.
6. Rezultati ukazuju na potrebu daljnjih istraživanja kako bi se dodatno objasnio imunološki odgovor na različite faze razvoja karcinoma gušterače.
7. Kirurško liječenje zasad ostaje zlatni standard i jedini potencijalno kurativni oblik liječenja adenokarcinoma gušterače.

8. SAŽETAK

U ovom istraživanju analiziran je međusobni odnos izraženosti MAGEA3 i broja CD86 te CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u karcinomima gušterače, povezanost s kliničko-patološkim karakteristikama tumora i doživljenjem pacijenata što bi moglo ukazati na nove dijagnostičke i prognostičke pokazatelje ili potencijalne mete za ciljanu onkološku terapiju.

Cilj istraživanja bio je analizirati imunohistokemijsku izraženost MAGEA3 te broj CD86 i CD163 pozitivnih intratumorskih makrofaga u duktalnim adenokarcinomima gušterače. Specifični ciljevi uključivali su usporedbu tih rezultata s patohistološkim karakteristikama tumora: veličinom tumora, dubinom invazije (pT stadij) tumora te statusom regionalnih limfnih čvorova (pN stadij).

U istraživanje je bilo uključeno 76 ispitanika koji su kirurški liječeni od histopatološki potvrđenog adenokarcinoma gušterače u Klinici za kirurgiju, KBC Sestre milosrdnice u vremenu od 1.1.2003. do 31.12.2019. godine. Bolesnici su postoperativno praćeni minimalno 24 mjeseca (ukoliko ranije nije došlo do smrtnog ishoda) te im je evidentiran onkološki status. Analizirani su klinički podaci, postoperativni tijek te je učinjena imunohistokemijska analiza tumorskog tkiva za svakog pacijenta.

Nije dokazana povezanost MAGEA3 antigena s ostalim parametrima uključenima u studiju kao što su stadij bolesti, preživljenje pacijenata i broj tumorski povezanih makrofaga u tkivu tumora. Nije nađena značajna povezanost ni s T i N stadijem tumora. S druge strane broj CD86 intratumorskih makrofaga i omjer CD86/CD163 pokazali su statistički značajnu korelaciju s porastom T i N stadija bolesti.

MAGEA3 i TAM-ovi mogu poslužiti kao prognostički marker ili cilj onkološke terapije, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi se iskoristio njihov potencijal. Kirurško liječenje zasad ostaje zlatni standard i jedini potencijalno kurativni oblik liječenja adenokarcinoma gušterače.

Ključne riječi: adenokarcinom gušterače (pankreas), MAGEA3, CD86, CD163, M1
M2 makrofagi, TAM intratumorski makrofagi

9. SUMMARY

Relationship of immunohistochemical expression of MAGEA3 and CD86/CD163 positive intratumoral macrophages with prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma

Goran Glavčić, 2024.

In this research, we analyzed the mutual relationship between the expression of MAGEA3 and the number of CD86 and CD163 positive intratumoral macrophages in pancreatic carcinomas. We also sought the connection between the clinical-pathological characteristics of the tumor and the patient's survival, which could lead to new diagnostic and prognostic indicators or potential targets for oncological therapy.

The study aimed to analyze the immunohistochemical expression of MAGEA3 and the number of CD86 and CD163 positive intratumoral macrophages in pancreatic ductal adenocarcinomas. Specific objectives included comparing these results with the pathohistological characteristics of the tumor: tumor size, depth of invasion (pT stage), and the status of regional lymph nodes (pN stage).

The research involved 76 subjects who were surgically treated for histopathologically confirmed adenocarcinoma of the pancreas at the Department of Surgery, UHC Sestre milosrdnice, from January 1st, 2003. until December 31st 2019. The patients were monitored postoperatively for at least 24 months (if there was no fatal outcome earlier), and their oncological status was recorded. Clinical data, postoperative course, and immunohistochemical analysis of tumor tissue were performed for each patient.

The association of MAGEA3 antigen with other parameters included in the study, such as disease stage, patient survival, and the number of tumor-associated macrophages in the tumor tissue, was not proven. No significant correlation was

found either with the T or N stage of the tumor. On the other hand, the number of CD86 intratumor macrophages and the CD86/CD163 ratio showed a statistically significant correlation with the increase in the T and N stages of the disease.

MAGEA3 and TAMs may serve as prognostic markers or targets for oncology therapy, but further research is needed to exploit their potential. Surgical treatment remains the gold standard and the only potentially curative form of pancreatic adenocarcinoma treatment.

Key words: pancreatic adenocarcinoma, MAGEA3, CD86, CD163, M1 M2 macrophages, TAM intratumor macrophages

10. POPIS LITERATURE

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020;70(1):7–30.
2. Pourshams A, Sepanlou SG, Ikuta KS, Bisignano C, Safiri S, Roshandel G, i sur. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2019;4(12):934–47.
3. Cancer Statistics Review, 1975-2017 - SEER Statistics [Internet]. [ažurirano 12.02.2018.; pristupljeno 09.10.2020.] Dostupno na: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/
4. Rebours V, Lévy P, Ruszniewski P. An overview of hereditary pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2012;44(1):8–15.
5. Michaud DS, Skinner HG, Wu K, Hu F, Giovannucci E, Willett WC, i sur. Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(7):518–24.
6. Weiss FU. Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis. *Front Physiol* 2014; 5
7. Sadr-Azodi O, Oskarsson V, Discacciati A, Videhult P, Askling J, Ekblom A. Pancreatic Cancer Following Acute Pancreatitis: A Population-based Matched Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 2018;113(11):1711–9.
8. Ghiorzo P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(31).
9. Li Q, Jin M, Liu Y, Jin L. Gut Microbiota: Its Potential Roles in Pancreatic Cancer. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10.
10. Li P, Shu Y, Gu Y. The potential role of bacteria in pancreatic cancer: a systematic review. *Carcinogenesis* 2020;41(4):397–404.
11. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, i sur. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* 2012;61(4):582.
12. Del Castillo E, Meier R, Chung M, Koestler DC, Chen T, Paster BJ, i sur. The

- Microbiomes of Pancreatic and Duodenum Tissue Overlap and are Highly Subject Specific but Differ between Pancreatic Cancer and Non-Cancer Subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2019;28(2):370.
13. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF Del, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, i sur. Multi-institutional validation study of the American joint commission on cancer (8th edition) changes for T and N staging in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* 2017;265(1):185–91.
 14. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, De Miguel A, i sur. Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 2005;7(5):189–97.
 15. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol* 1999;10.
 16. Niederau C, Grendell JH. Diagnosis of pancreatic carcinoma: Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas* 1992;7(1):66–86.
 17. Freeny PC, Marks WM, Ryan JA, Traverso LW. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Diagnosis and staging with dynamic CT. *Radiology* 1988;125–33.
 18. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 2012;3(2):105–19.
 19. Bengtsson A, Andersson R, Ansari D. The actual 5-year survivors of pancreatic ductal adenocarcinoma based on real-world data. *Sci Rep* 2020;10(1).
 20. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 2018;24(43):4846.
 21. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021;71(1):7–33.
 22. Maisonneuve P. Epidemiology and burden of pancreatic cancer. *Press. Med* 2019;48(3P2):e113–23.
 23. Cho J, Petrov MS. Pancreatitis, Pancreatic Cancer, and Their Metabolic Sequelae: Projected Burden to 2050. *Clin Transl Gastroenterol* 2020;11(11):e00251.

24. Bilten Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. godine | Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. [ažurirano 10.04.2021.; pristupljeno 15.06.2023.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/periodicne-publikacije/bilten-incidencija-raka-u-hrvatskoj-2020-godine/>
25. Chun YS, Pawlik TM, Vauthey JN. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. *Ann Surg Oncol* 2018;25(4):845–7.
26. Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, Fishman EK, Hough DM, Lu DS, i sur. Pancreatic ductal adenocarcinoma radiology reporting template: Consensus statement of the society of abdominal radiology and the American pancreatic association. *Gastroenterology* 2014;146(1).
27. Xi T, Zhang G. Integrated analysis of tumor differentiation genes in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 2018;13(3).
28. Benassai G, Quarto G, Perrotta S, Furino E, Benassai GL, Amato B, i sur. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma - Surgical treatment. *Int J Surg* 2015;21(S1):1–3.
29. Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Jiang W, Yeap BY, Drapek LC, i sur. Total neoadjuvant therapy with FOLFIRINOX followed by individualized chemoradiotherapy for borderline resectable pancreatic adenocarcinoma: A phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol* 2018;4(7):963–9.
30. Versteijne E, Suker M, Groothuis K, Akkermans-Vogelaar JM, Besselink MG, Bonsing BA, i sur. Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *J Clin Oncol* 2020;38(16):1763–73.
31. Khorana AA, Shapiro M, Mangu PB, Berlin J, Engebretson A, Hong TS, i sur. Potentially curable pancreatic cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2017;35(20):2324–8.
32. Bachmann J, Michalski CW, Martignoni ME, Büchler MW, Friess H. Pancreatic resection for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 2006;8(5):346.
33. Coco D, Leanza S, Guerra F. Total Pancreatectomy: Indications, Advantages and Disadvantages - A Review. *Maedica (Buchar)* 2019;14(4):391–6.

34. Are C, Dhir M, Ravipati L. History of pancreaticoduodenectomy: early misconceptions, initial milestones and the pioneers. *HPB (Oxford)* 2011;13(6):377.
35. Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surg Endosc* 1994;8(5):408–10.
36. Asbun HJ, Stauffer JA. Laparoscopic vs open pancreaticoduodenectomy: overall outcomes and severity of complications using the Accordion Severity Grading System. *J Am Coll Surg* 2012;215(6):810–9.
37. Conrad C, Basso V, Passot G, Zorzi D, Li L, Chen HC, i sur. Comparable long-term oncologic outcomes of laparoscopic versus open pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma: a propensity score weighting analysis. *Surg Endosc* 2017;31(10):3970–8.
38. Perivoliotis K, Sioka E, Tatsioni A, Stefanidis I, Zintzaras E, Zacharoulis D. Pancreatogastrostomy versus Pancreatojejunostomy: An Up-to-Date Meta-Analysis of RCTs. *Int J Surg Oncol* 2017; 45.
39. Andrén-Sandberg Å, Wagner M, Tihanyi T, Löfgren P, Friess H. Technical aspects of left-sided pancreatic resection for cancer. *Dig Surg* 1999;16(4):305–12.
40. Fernández-Cruz L, Orduña D, Cesar-Borges G, López-Boado MA. Distal pancreatectomy: en-bloc splenectomy vs spleen-preserving pancreatectomy. *HPB (Oxford)* 2005;7(2):93.
41. Nathan H, Wolfgang CL, Edil BH, Choti MA, Herman JM, Schulick RD, i sur. Peri-operative mortality and long-term survival after total pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma: a population-based perspective. *J Surg Oncol* 2009;99(2):87–92.
42. Yousaf MN, Ehsan H, Wahab A, Muneeb A, Chaudhary FS, Williams R, i sur. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography guided interventions in the management of pancreatic cancer. *World J Gastrointest Endosc* 2020;12(10):323.
43. Bliss LA, Eskander MF, Kent TS, Watkins AA, de Geus SWL, Storino A, i sur. Early surgical bypass versus endoscopic stent placement in pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 2016;18(8):671.

44. Adham M, Perinel J. Palliative therapy in pancreatic cancer—palliative surgery. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2019;4.
45. Minata MK, Bernardo WM, Rocha RS de P, Morita FHA, Aquino JCM, Cheng S, i sur. Stents and surgical interventions in the palliation of gastric outlet obstruction: a systematic review. *Endosc Int Open* 2016;4(11):1158.
46. Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 1996;223(3):273–9.
47. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004;91(5):586–94.
48. Changazi SH, Ahmed QA, Bhatti S, Siddique S, Abdul Raffay E, Farooka MW, i sur. Whipple Procedure: A Five-Year Clinical Experience in Tertiary Care Center. *Cureus* 2020;12(11).
49. Suzuki Y, Fujino Y, Ajiki T, Ueda T, Sakai T, Tanioka Y, i sur. No mortality among 100 consecutive pancreaticoduodenectomies in a middle-volume center. *World J Surg* 2005;29(11):1409–14.
50. Ho CK, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Complications of pancreatic surgery. *HPB (Oxford)* 2005;7(2):99.
51. Lin PW, Shan YS, Lin YJ, Hung CJ. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD versus Whipple procedure. *Hepatogastroenterology* 2005;52(65):1601–4.
52. Mirrieles JA, Weber SM, Abbott DE, Greenberg CC, Minter RM, Scarborough JE. Pancreatic Fistula and Delayed Gastric Emptying Are the Highest-Impact Complications After Whipple. *J Surg Res* 2020; 80–7.
53. Büchler MW, Wagner M, Schmied BM, Uhl W, Friess H, Z'graggen K, i sur. Changes in morbidity after pancreatic resection: toward the end of completion pancreatectomy. *Arch Surg* 2003;138(12):1310–5.
54. Schwarz RE, Harrison LE, Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. The impact of splenectomy on outcomes after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1999;188(5):516–21.
55. Bakkevold KE, Arnesjø B, Dahl O, Kambestad B. Adjuvant combination

- chemotherapy (AMF) following radical resection of carcinoma of the pancreas and papilla of Vater--results of a controlled, prospective, randomised multicentre study. *Eur J Cancer* 1993;29A(5):698–703.
56. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, i sur. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;297(3):267–77.
 57. Khorana AA, Mangu PB, Katz MHG. Potentially Curable Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract* 2017;13(6):388–91.
 58. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, i sur. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2018;379(25):2395–406.
 59. He J, Blair AB, Groot VP, Javed AA, Burkhart RA, Gemenetzis G, i sur. Is a Pathological Complete Response Following Neoadjuvant Chemoradiation Associated With Prolonged Survival in Patients With Pancreatic Cancer? *Ann Surg* 2018;268(1):1–8.
 60. Ferrone CR, Marchegiani G, Hong TS, Ryan DP, Deshpande V, McDonnell EI, i sur. Radiological and surgical implications of neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer. *Ann Surg* 2015;261(1):12–7.
 61. Golcher H, Brunner TB, Witzigmann H, Marti L, Bechstein WO, Bruns C, i sur. Neoadjuvant chemoradiation therapy with gemcitabine/cisplatin and surgery versus immediate surgery in resectable pancreatic cancer: results of the first prospective randomized phase II trial. *Strahlenther Onkol* 2015;191(1):7–16.
 62. Oba A, Ho F, Bao QR, Al-Musawi MH, Schulick RD, Chiaro M Del. Neoadjuvant Treatment in Pancreatic Cancer. *Front Oncol* 2020;10:245.
 63. Burkoň P, Trna J, Slávik M, Němeček R, Kazda T, Pospíšil P, i sur. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) of Pancreatic Cancer—A Critical Review and Practical Consideration. *Biomedicines* 2022;10.
 64. Chang DT, Schellenberg D, Shen J, Kim J, Goodman KA, Fisher GA, i sur. Stereotactic radiotherapy for unresectable adenocarcinoma of the pancreas.

- Cancer 2009;115(3):665–72.
65. Ghaly M, Gogineni E, Herman J, Saif MW. New Potential Options for SBRT in Pancreatic Cancer. *Cancer Med J* 2021;41.
 66. Bailey RE, Surapaneni PK, Core J, Cortizo Vidal LL, LeGout J, Ritchie C, i sur. Safety and efficacy of locoregional therapy for metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma to the liver: a single-center experience. *J Gastrointest Oncol* 2019;10(4):688–94.
 67. Schizas D, Charalampakis N, Kole C, Economopoulou P, Koustas E, Gkotsis E, i sur. Immunotherapy for pancreatic cancer: A 2020 update. *Cancer Treat Rev* 2020;86.
 68. Van Der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van Den Eynde B, i sur. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* (80-) 1991;254(5038):1643–7.
 69. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2015;37.
 70. Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Löning T, Jänicke F, i sur. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 2001;61(18):6682–7.
 71. Karpf A, Bai S, James SR, Mohler JL, Wilson EM. Increased Expression of Androgen Receptor Coregulator MAGE-11 in Prostate Cancer by DNA Hypomethylation and Cyclic AMP. *Mol Cancer Res* 2009;7(4):523.
 72. Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, i sur. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* 2003;42(1):23–33.
 73. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, Lethé B, Carrel S, Arienti F, i sur. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J cancer* 1995;63(3):375–80.
 74. Mori M, Inoue H, Mimori K, Shibuta K, Baba K, Nakashima H, i sur. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1996;224(2):183.
 75. Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: Emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 2002;67(6):705–12.

76. Jeon CH, Kim IH, Chae HD. Prognostic Value of Genetic Detection Using CEA and MAGE in Peritoneal Washes With Gastric Carcinoma After Curative Resection: Result of a 3-Year Follow-Up. *Medicine (Baltimore)* 2014;93(11):83.
77. Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, i sur. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8055–62.
78. Ayyoub M, Scarlata CM, Hamaï A, Pignon P, Valmori D. Expression of MAGE-A3/6 in primary breast cancer is associated with hormone receptor negative status, high histologic grade, and poor survival. *J Immunother* 2014;37(2):73–6.
79. Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, i sur. Expression and Immune Responses to MAGE Antigens Predict Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS One* 2014;9(8).
80. Pineda CT, Ramanathan S, Fon Tacer K, Weon JL, Potts MB, Ou YH, i sur. Degradation of AMPK by a Cancer-Specific Ubiquitin Ligase. *Cell* 2015;160(4):715.
81. Bhatia N, Xiao TZ, Rosenthal KA, Siddiqui IA, Thiyagarajan S, Smart B, i sur. MAGE-C2 Promotes Growth and Tumorigenicity of Melanoma Cells, Phosphorylation of KAP1, and DNA Damage Repair. *J Invest Dermatol* 2013;133(3):759.
82. Yang F, Zhou X, Miao X, Zhang T, Hang X, Tie R, i sur. MAGEC2, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145(1):23.
83. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Jadczyk A, Cao Y, Luetkens T, Meyer S, i sur. Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica* 2010;95(5):785.
84. Yin B, Zeng Y, Liu G, Wang X, Wang P, Song Y. MAGE-A3 is highly expressed in a cancer stem cell-like side population of bladder cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(6):2934.
85. Bujas T, Marušić Z, Perić Balja M, Mijić A, Krušlin B, Tomas D. MAGE-A 3/4 and NY-ESO-1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Histochem* 2011;55(1):39–43.
86. Hudolin T, Kastelan Z, Ilic I, Levarda-Hudolin K, Basic-Jukic N, Rieken M, i sur.

- Immunohistochemical analysis of the expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in diffuse large B-cell testicular lymphoma. *J Transl Med* 2013;11.
87. Escudier B, Dorval T, Chaput N, André F, Caby MP, Novault S, i sur. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of the first phase 1 clinical trial. *J Transl Med* 2005;3(1).
 88. Tyagi P, Mirakhur B. MAGRIT: The largest-ever phase iii lung cancer trial aims to establish a novel tumor-specific approach to therapy. *Clin Lung Cancer* 2009;10(5):371–4.
 89. Ruiz R, Hunis B, Raez LE. Immunotherapeutic agents in non-small-cell lung cancer finally coming to the front lines. *Curr Oncol Rep* 2014;16(9).
 90. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001;61(14):5544–51.
 91. De Plaen E, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, i sur. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994;40(5):360–9.
 92. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, i sur. Cancer regression and neurologic toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 2013;36(2):133.
 93. Kocher T, Schultz-Thater E, Gudat F, Schaefer C, Casorati G, Juretic A, i sur. Identification and Intracellular Location of MAGE-3 Gene Product. *Cancer Res* 1995;55(11):2236–9.
 94. Landry C, Brasseur F, Spagnoli GC, Marbaix E, Boon T, Coulie P, i sur. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer* 2000;86(6):835–41.
 95. Schultz-Thater E, Piscuoglio S, Iezzi G, Le Magnen C, Zajac P, Carafa V, i sur. MAGE-A10 is a nuclear protein frequently expressed in high percentages of tumor cells in lung, skin and urothelial malignancies. *Int J Cancer* 2011;129(5):1137–48.
 96. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The

- activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(14):7149.
97. Brichard VG, Lejeune D. GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: Pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine* 2007;25.
 98. Brichard VG, Godechal Q. MAGE-A3-specific anticancer immunotherapy in the clinical practice. *Oncoimmunology* 2013;2(10).
 99. Vansteenkiste J, Zielinski M, Linder A, Dahabreh J, Gonzalez EE, Malinowski W, i sur. Adjuvant MAGE-A3 immunotherapy in resected non-small-cell lung cancer: phase II randomized study results. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2396–403.
 100. Romero P, Banchereau J, Bhardwaj N, Cockett M, Disis ML, Dranoff G, i sur. The Human Vaccines Project: A roadmap for cancer vaccine development. *Sci Transl Med* 2016;8(334).
 101. Furness AJS, Vargas FA, Peggs KS, Quezada SA. Impact of tumour microenvironment and Fc receptors on the activity of immunomodulatory antibodies. *Trends Immunol* 2014;35(7):290–8.
 102. Das B, Senapati S. Functional and mechanistic studies reveal MAGEA3 as a pro-survival factor in pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):1–18.
 103. Cogdill AP, Frederick DT, Cooper ZA, Garber HR, Ferrone CR, Fiedler A, i sur. Targeting the MAGE A3 antigen in pancreatic cancer. *Surgery* 2012;152.
 104. Kim J, Reber HA, Hines OJ, Kazanjian KK, Tran A, Ye X, i sur. The clinical significance of MAGEA3 expression in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;118(9):2269–75.
 105. Dasgupta P, Keegan AD. Contribution of alternatively activated macrophages to allergic lung inflammation: a tale of mice and men. *J Innate Immun* 2012;4(5–6):478–88.
 106. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972;46(6):845.
 107. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res* 2018;191:1–14.

108. Saeki N, Imai Y. Reprogramming of synovial macrophage metabolism by synovial fibroblasts under inflammatory conditions. *Cell Commun Signal* 2020;18(1).
109. Herzog C, Garcia LP, Keatinge M, Greenald D, Moritz C, Peri F, i sur. Rapid clearance of cellular debris by microglia limits secondary neuronal cell death after brain injury in vivo. *Development* 2019;146(9).
110. Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrero M, Tucci A, Hughes LD, Kong Y, i sur. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 2017;356(6342):1072–6.
111. Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *Chemtexts* 2022;8(2):12.
112. Greenhalgh AD, Zarruk JG, Healy LM, Baskar Jesudasan SJ, Jhelum P, Salmon CK, i sur. Peripherally derived macrophages modulate microglial function to reduce inflammation after CNS injury. *PLoS Biol* 2018;16(10).
113. Sárvári AK, Van Hauwaert EL, Markussen LK, Gammelmark E, Marcher AB, Ebbesen MF, i sur. Plasticity of Epididymal Adipose Tissue in Response to Diet-Induced Obesity at Single-Nucleus Resolution. *Cell Metab* 2021;33(2):437-453.
114. Liu D, Guo M, Zhou P, Xiao J, Ji X. TSLP promote M2 macrophages polarization and cardiac healing after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;516(2):437–44.
115. Nathan CF, Murray HW, Wlebe IE, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158(3):670–89.
116. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176(1):287–92.
117. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;164(12):6166–73.
118. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25(12):677–86.

119. Mills CD. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32(6):463–88.
120. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.* 2013;35(5):585–600.
121. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014;6.
122. Klar AS, Michalak-Mińska K, Biedermann T, Simmen-Meuli C, Reichmann E, Meuli M. Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. *Pediatr Surg Int* 2018;34(2):129–35.
123. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015: 56-8.
124. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, i sur. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 2014;41(1):14–20.
125. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(12):953–64.
126. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 2015;15(2):73–86.
127. Komohara Y, Niino D, Ohnishi K, Ohshima K, Takeya M. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies. *Pathol Int* 2015;65(4):170–6.
128. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42(6):717–27.
129. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, i sur. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 2010;24(3):241–55.
130. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, i sur. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte

- activation. *Immunity* 2011;35(6):871–82.
131. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol* 2014;5.
 132. Yeo EJ, Cassetta L, Qian BZ, Lewkowich I, Li JF, Stefater JA, i sur. Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer. *Cancer Res* 2014;74(11).
 133. Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SBC. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci* 2013;92(2):101.
 134. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, i sur. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 2006;107(5):2112–22.
 135. Ojalvo LS, King W, Cox D, Pollard JW. High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors. *Am J Pathol* 2009;174(3):1048.
 136. Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, i sur. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 2009;206(6):1327.
 137. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, i sur. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006;203(4):871.
 138. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41(1):49.
 139. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* 2015;36(4):229–39.
 140. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66(1):1–9.
 141. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer.

- Cancer Cell 2015;27(4):462–72.
142. Shen X, Zhou S, Yang Y, Hong T, Xiang Z, Zhao J, i sur. TAM-targeted reeducation for enhanced cancer immunotherapy: Mechanism and recent progress. *Front Oncol* 2022;12.
 143. Binnemars-Postma K, Storm G, Prakash J. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int J Mol Sci* 2017;18(5).
 144. Chen SJ, Zhang QB, Zeng LJ, Lian GD, Li JJ, Qian CC, i sur. Distribution and clinical significance of tumour-associated macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma: A retrospective analysis in China. *Curr Oncol* 2015;22(1):e11–9.
 145. Pantano F, Berti P, Guida FM, Perrone G, Vincenzi B, Amato MMC, i sur. The role of macrophages polarization in predicting prognosis of radically resected gastric cancer patients. *J Cell Mol Med* 2013;17(11):1415–21.
 146. Macciò A, Gramignano G, Cherchi MC, Tanca L, Melis L, Madeddu C. Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients. *Sci Rep* 2020;10(1):1–8.
 147. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* 2019;10(1):10.
 148. Huang L, Jansen L, Balavarca Y, Babaei M, van der Geest L, Lemmens V, i sur. Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: A large, international population-based study. *BMC Med* 2018;16(1):1–15.
 149. Zovak M, Mužina Mišić D, Glavčić G. Pancreatic surgery: evolution and current tailored approach. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3(5):247–58.
 150. Hempel S, Oehme F, Tahirukaj E, Kolbinger FR, Müssle B, Welsch T, i sur. More is More? Total Pancreatectomy for Periapillary Cancer as an Alternative in Patients with High-Risk Pancreatic Anastomosis: A Propensity Score-Matched Analysis. *Ann Surg Oncol* 2021;28(13):8309–17.
 151. Yang DJ, Xiong JJ, Liu XT, Li J, Siriwardena KMDL, Hu WM. Total pancreatectomy compared with pancreaticoduodenectomy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res* 2019;11:3899.
 152. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*

- 2016;22(44):9694.
153. Cogdill AP, Frederick DT, Cooper ZA, Garber HR, Ferrone CR, Fiedler A, i sur. Targeting the MAGE A3 antigen in pancreatic cancer. *Surg (United States)* 2012;152
 154. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, i sur. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711–23.
 155. Huang ZQ, Buchsbaum DJ. Monoclonal antibodies in the treatment of pancreatic cancer. *Immunotherapy* 2009;1(2):223.
 156. Wascher RA, Bostick PJ, Huynh KT, Turner R, Qi K, Giuliano AE, i sur. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients' sentinel lymph nodes. *Br J Cancer* 2001;85(9):1340.
 157. Bostick PJ, Morton DL, Turner RR, Huynh KT, Wang HJ, Elashoff R, i sur. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patients. *J Clin Oncol* 1999;17(10):3238–44.
 158. Lu YC, Parker LL, Lu T, Zheng Z, Toomey MA, White DE, i sur. Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3. *J Clin Oncol* 2017;35(29):3322–9.
 159. Vansteenkiste JF, Cho BC, Vanakesa T, De Pas T, Zielinski M, Kim MS, i sur. Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):822–35.
 160. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J* 2006;8(3):E532.
 161. Johnson RM, Harrison SD, Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods Mol Biol* 2011;683:535–51.
 162. Batchu RB, Gruzdyn O V., Qazi AM, Mahmud EM, Mostafa G, Weaver DW, i sur. Pancreatic cancer cell lysis by cell-penetrating peptide-MAGE-A3-induced cytotoxic T lymphocytes. *JAMA Surg* 2016;151(11):1086–8.

163. Jian W, Li X, Kang J, Lei Y, Bai Y, Xue Y. Antitumor effect of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing MAGEA3 and SSX2 fusion proteins. *Exp Ther Med* 2018;16(3):2160–6.
164. Li M, He L, Zhu J, Zhang P, Liang S. Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. *Cell Biosci* 2022 121 2022;12(1):1–13.
165. Li C, Xu X, Wei S, Jiang P, Xue L, Wang J. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J. Immunother. Cancer* 2021;9(1):e001341.
166. Mielgo A, Schmid MC. Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep.*2013;46(3):131–8.
167. Zhang M, Pan X, Fujiwara K, Jurcak N, Muth S, Zhou J, i sur. Pancreatic cancer cells render tumor-associated macrophages metabolically reprogrammed by a GARP and DNA methylation-mediated mechanism. *Signal Transduct Target Ther* 2021 61 2021;6(1):1–18.
168. Yang S, Liu Q, Liao Q. Tumor-Associated Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Origin, Polarization, Function, and Reprogramming. *Front Cell Dev Biol* 2020;8.
169. Lankadasari MB, Mukhopadhyay P, Mohammed S, Harikumar KB. TAMing pancreatic cancer: combat with a double edged sword. *Mol Cancer* 2019 181 2019;18(1):1–13.
170. Lee C, Lee J, Choi SA, Kim SK, Wang KC, Park SH, i sur. M1 macrophage recruitment correlates with worse outcome in SHH Medulloblastomas. *BMC Cancer* 2018;18(1).
171. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J* 2009;33(1):118–26.
172. Zhou Z, Wen L, Lai M, Shan C, Wang J, Wang R, i sur. Increased M1 Macrophages Infiltration Correlated With Poor Survival Outcomes and Radiation Response in Gliomas. *Dose-Response* 2020;18(4).
173. Scotton CJ, Martinez FO, Smelt MJ, Sironi M, Locati M, Mantovani A, i sur. Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13. *J Immunol* 2005;174(2):834–45.

174. Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 2004;75(5):721–30.
175. Lv C, Li S, Zhao J, Yang P, Yang C. M1 Macrophages Enhance Survival and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Inducing GDF15-Mediated ErbB2 Phosphorylation. *ACS Omega* 2022;7(13):11405–14.
176. Bronkhorst IHG, Ly L V., Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GPM, i sur. Detection of M2-Macrophages in Uveal Melanoma and Relation with Survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):643–50.
177. Erlandsson A, Carlsson J, Lundholm M, Fält A, Andersson SO, Andrén O, i sur. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *Prostate* 2019;79(4):363–9.

11. ŽIVOTOPIS

Goran Glavčić rođen je 13. kolovoza 1986. godine u Splitu. Osnovnu i srednju školu završio je u Splitu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisao je 2005. a završio 2011. godine.

Pripravnički staž u KBC Zagreb završio je 2012. godine kada je i položio državni stručni ispit. U ožujku 2013. godine započinje specijalizaciju iz abdominalne kirurgije u KBC Sestre milosrdnice. U lipnju 2018. položio specijalistički ispit te je i dalje zaposlen na Klinici za kirurgiju KBC Sestre milosrdnice.

Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ pohađao je u razdoblju od 2019.- 2022. godine.

Aktivno sudjeluje na stručnim i znanstvenim domaćim i međunarodnim kongresima i izradi znanstvenih radova. Autor je i koautor nekoliko znanstvenih članaka koji su objavljeni u indeksiranim časopisima.

Otac je troje djece.