

DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2026.166-186>
УДК: 616.37-006.6:616-097:577.27



Післяопераційна дренажна рідина хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози як пацієнт-специфічна *in vitro* модель післяопераційного запального та імунорегуляторного мікрооточення

Криворучко І.А.¹, <https://orcid.org/0000-0002-5525-701X>, e-mail: iryvoruchko60@gmail.com
Граматюк С.М.^{2,3}, <https://orcid.org/0000-0003-4238-7031>, e-mail: gramatyuk@ukrainebiobank.com
Іванова Ю.В.^{1,3}, <https://orcid.org/0000-0003-4464-3035>, e-mail: dr.ivanova23@gmail.com
Гончарова Н.М.¹, <https://orcid.org/0000-0001-5031-7311>, e-mail: drhoncharova@gmail.com
Мамонтов І.М.¹, <https://orcid.org/0000-0003-0059-2715>, e-mail: ivan.n.mamontov@gmail.com
Харченко К.В.⁴, <https://orcid.org/0000-0002-9170-9431>, e-mail: k.kharchenko@ukr.net

¹Харківський національний медичний університет
Міністерства охорони здоров'я України, Харків, Україна
²Міжнародний біобанкінг та освіта,
Медичний університет Граца, Грац, Австрія
³Українська асоціація біобанків,
Медичний університет Граца, Грац, Австрія
⁴Комунальне некомерційне підприємство
«Київський міський клінічний онкологічний центр», Київ, Україна

Postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma as a patient-specific *in vitro* model of the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment

Kryvoruchko I.A.¹, <https://orcid.org/0000-0002-5525-701X>, e-mail: iryvoruchko60@gmail.com
Gramatiuk S.M.^{2,3}, <https://orcid.org/0000-0003-4238-7031>, e-mail: gramatyuk@ukrainebiobank.com
Ivanova Yu.V.^{1,3}, <https://orcid.org/0000-0003-4464-3035>, e-mail: dr.ivanova23@gmail.com
Honcharova N.M.¹, <https://orcid.org/0000-0001-5031-7311>, e-mail: drhoncharova@gmail.com
Mamontov I.M.¹, <https://orcid.org/0000-0003-0059-2715>, e-mail: ivan.n.mamontov@gmail.com
Kharchenko K.V.⁴, <https://orcid.org/0000-0002-9170-9431>, e-mail: k.kharchenko@ukr.net

¹Kharkiv National Medical University
of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
²International Biobanking and Education,
Medical University of Graz, Graz, Austria
³The Ukrainian Association of Biobanks,
Medical University of Graz, Graz, Austria
⁴Communal non-commercial enterprise
«Kyiv City Clinical Oncology Center», Kyiv, Ukraine

Ключові слова:

протокова аденокарцинома підшлункової залози, післяопераційна дренажна рідина, макрофаги, імуносупресія, цитокіни, імунотерапія.

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Протокова аденокарцинома підшлункової залози характеризується агресивним клінічним перебігом, раннім метастазуванням, низькою п'ятирічною виживаністю та обмеженою ефективністю імунотерапії. Однією з ключових біологічних особливостей цього захворювання є формування вираженого імуносупресивного мікрооточення, в якому важливу роль відіграють макрофаги та інші клітини мієлоїдного ряду. Післяопераційна дренажна рідина, отримана з ложа пухлини після хірургічного втручання, може відображати локальні процеси запалення, репарації та імунної регуляції у ранньому післяопераційному періоді й становити інтерес як пацієнт-специфічне джерело біологічно активних медіаторів.
Мета роботи – охарактеризувати цитокіновий профіль післяопераційної дренажної рідини хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози та оцінити її вплив на фенотип макрофагів і функціональну активність CD8⁺ Т-лімфоцитів.
Матеріали та методи. Об'єктом дослідження була післяопераційна дренажна рідина, зібрана у пацієнтів із гістологічно верифікованою протоковою аденокарциномою підшлункової залози після радикального хірургічного лікування.

Для кореспонденції:

Гончарова Наталя Миколаївна
Харківський національний медичний
університет Міністерства охорони здо-
ров'я України, кафедра хірургії №2;
просп. Науки, буд. 4, м. Харків, Україна,
61022;
e-mail: drhoncharova@gmail.com

© Криворучко І.А., Граматюк С.М.,
Іванова Ю.В., Гончарова Н.М.,
Мамонтов І.М., Харченко К.В., 2026

Для оцінки імуномодулювальних властивостей дренажної рідини використовували модель диференціювання макрофагів із моноцитів периферичної крові здорових донорів у присутності зразків дренажної рідини. Імунофенотипування клітин проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням маркерів CD163, CD206, CD80 та HLA-DR. Функціональні наслідки поляризації макрофагів оцінювали у ко-культури з активованими CD8⁺ Т-клітинами. Концентрації цитокінів у дренажній рідині визначали методом мультиплексного імуноаналізу.

Результати. Інкубація макрофагів із післяопераційною дренажною рідиною асоціювалася зі зсувом їх фенотипу у бік імуносупресивного профілю: підвищувалася експресія CD163 та CD206 і знижувалася експресія CD80 та HLA-DR. Макрофаги, попередньо інкубовані з дренажною рідиною, пригнічували активацію CD8⁺ Т-клітин і зменшували цитотоксичне знищення пухлинних клітин приблизно на 60–65%. У дренажній рідині виявлено високі концентрації CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β та GM-CSF. Фармакологічне інгібування CSF1R і CCR2 частково послаблювало імуносупресивну поляризацію макрофагів, тоді як активація CD40 частково відновлювала протипухлинні імунні реакції.

Висновки. Післяопераційна дренажна рідина у хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози є інформативним джерелом локальних розчинних медіаторів, що характеризують післяопераційне запальне та імунорегуляторне мікрооточення ложа пухлини. Її використання в моделях дає змогу досліджувати механізми поляризації макрофагів, післяопераційної імуносупресії та також обґрунтовувати потенційні підходи до імуномодулювальної терапії у періопераційному вікні.

Для цитування:

Криворучко І.А., Граматюк С.М., Іванова Ю.В., Гончарова Н.М., Мамонтов І.М., Харченко К.В. Післяопераційна дренажна рідина хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози як пацієнт-специфічна *in vitro* модель післяопераційного запального та імунорегуляторного мікрооточення. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2026. Т. 34. № 2. С. 166–186. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2026.166-186>

Key words:

pancreatic ductal adenocarcinoma,
postoperative drainage fluid, macro-
phages, immunosuppression, cytokines,
immunotherapy.

For correspondence:

Honcharova Natalia Mykolaivna
Kharkiv National Medical University of the
Ministry of Health of Ukraine, Department
of Surgery No. 2;
4 Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;
e-mail: drhoncharova@gmail.com

© Kryvoruchko I.A., Gramatiuk S.M.,
Ivanova Yu.V., Honcharova N.M.,
Mamontov I.M., Kharchenko K.V., 2026

ABSTRACT

Background. Pancreatic ductal adenocarcinoma is characterized by an aggressive clinical course, early metastasis, low five-year survival rates, and limited efficacy of immunotherapy. A key biological feature of this disease is the formation of a pronounced immunosuppressive microenvironment, in which macrophages and other myeloid cells play a crucial role. Postoperative drainage fluid, collected from the tumor bed following surgical intervention, may reflect local processes of inflammation, repair, and immune regulation during the early postoperative period, serving as a patient-specific source of biologically active mediators.

Purpose – to characterize the cytokine profile of postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and to evaluate its impact on macrophage phenotype and the functional activity of CD8⁺ T lymphocytes.

Materials and Methods. The object of the study was postoperative drainage fluid collected from patients with histologically verified pancreatic ductal adenocarcinoma after radical surgical treatment. To evaluate the immunomodulatory properties of the drainage fluid, a model of macrophage differentiation from peripheral blood monocytes of healthy donors in the presence of drainage fluid samples was used. Immunophenotyping of the cells was performed by flow cytometry using CD163, CD206, CD80, and HLA-DR markers. The functional consequences of macrophage polarization were evaluated in a co-culture system with activated CD8⁺ T-cells. Cytokine concentrations in the drainage fluid were determined by multiplex immunoassay.

Results. Incubation of macrophages with postoperative drainage fluid was associated with a phenotypic shift toward an immunosuppressive profile: the expression of CD163 and CD206 increased, while the expression of CD80 and HLA-DR decreased. Macrophages pre-incubated with drainage fluid suppressed the activation of CD8⁺ T-cells and reduced the cytotoxic killing of tumor cells by approximately 60–65%. High concentrations of CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β , and GM-CSF were detected in the drainage fluid. Pharmacological inhibition of CSF1R and CCR2 partially attenuated immunosuppressive macrophage polarization, while CD40 activation partially restored antitumor immune responses.

Conclusions. Postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma is an informative source of local soluble mediators that characterize the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment of the tumor bed. Its use in experimental models allows for the investigation of the mechanisms underlying macrophage polarization and postoperative immunosuppression, while also providing a rationale for potential immunomodulatory therapy approaches within the perioperative window.

For citation:

Kryvoruchko IA, Gramatiuk SM, Ivanova YuV, Honcharova NM, Mamontov IM, Kharchenko KV. Postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma as a patient-specific *in vitro* model of the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2026;34(2):166–186. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.2.2026.166-186>

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

LIST OF ABBREVIATIONS

Скорочення Abbreviation	Українська Ukrainian	Англійська English
AJCC	Американський об'єднаний комітет з раку	American Joint Committee on Cancer
CA 19-9	вуглеводний антиген 19-9	carbohydrate antigen 19-9
CCL2	хемокиновий ліганд 2 із C-C мотивом	C-C motif chemokine ligand 2
CD40	кластер диференціювання 40	cluster of differentiation 40
CSF1	колонієстимулювальний фактор 1	colony-stimulating factor 1
CSF1R	рецептор колонієстимулювального фактора 1	colony-stimulating factor 1 receptor
ESMO	Європейське товариство медичної онкології	European Society for Medical Oncology
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA-DR	ізотип DR людського лейкоцитарного антигену	human leukocyte antigen DR isotype
IFN-γ	інтерферон-γ	interferon-γ
IL-10	інтерлейкін-10	interleukin-10
МКПК / PBMCs	мононуклеарні клітини периферичної крові	peripheral blood mononuclear cells
NCCN	Національна комплексна онкологічна мережа	National Comprehensive Cancer Network
NK-клітини / NK cells	природні кілери	natural killer cells
ПАПЗ / PDAC	протокова аденокарцинома підшлункової залози	pancreatic ductal adenocarcinoma
TGF-β	трансформувальний фактор росту β	transforming growth factor β
TNM	пухлина, лімфатичні вузли, метастази	tumor, node, metastasis

ВСТУП

INTRODUCTION

Протокова аденокарцинома підшлункової залози (ПАПЗ) залишається однією з найбільш летальних злоякісних пухлин у світі, що характеризується вкрай несприятливим прогнозом, раннім метастазуванням і низькою п'ятирічною виживаністю [1, 2, 3, 4, 5]. Агресивний перебіг ПАПЗ значною мірою зумовлений особливостями її мікрооточення, яке сприяє пухлинному росту, інвазії, метастазуванню, уникненню імунної відповіді та формуванню резистентності до лікування [5].

Однією з характерних рис ПАПЗ є значне накопичення клітин мієлоїдного ряду, насамперед макрофагів, які відіграють провідну роль у формуванні локальної та системної імуносупресії. Встановлено, що макрофаги можуть пригнічувати функцію цитотоксичних Т-лімфоцитів, стимулювати ангіогенез, ремоделювання стромы, інвазію та метастазування пухлини [6, 7, 8, 9]. Формування такого фенотипу макрофагів регулюється дією цитокінів і хемокинів, зокрема макрофагального колонієстимулювального фактора – CSF1 (Colony-Stimulating Factor 1), хемокинового ліганду 2 – CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2), інтерлейкіну IL-10 і трансформувального фактора росту-бета – TGF-β (Transforming Growth Factor-beta), які сприяють їх диференціюванню у бік імуносупресивного профілю [6, 7, 8, 9, 10].

Попри значний прогрес у вивченні біології макрофагів при ПАПЗ, експериментальні моделі, що

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the most lethal malignancies worldwide, characterized by an extremely poor prognosis, early metastasis, and low five-year survival rates [1, 2, 3, 4, 5]. The aggressive progression of PDAC is largely driven by the specific features of its microenvironment, which facilitates tumor growth, invasion, metastasis, immune evasion, and resistance to treatment [5].

A defining hallmark of PDAC is the significant accumulation of myeloid-derived cells, primarily macrophages, which play a leading role in the formation of local and systemic immunosuppression. It has been established that macrophages can suppress the function of cytotoxic T-lymphocytes and stimulate angiogenesis, stromal remodeling, invasion, and metastasis [6, 7, 8, 9]. The formation of such a macrophage phenotype is regulated by the action of cytokines and chemokines, including macrophage colony-stimulating factor 1 – CSF1, chemokine ligand 2 – CCL2 (C-C motif chemokine ligand 2), interleukin IL-10, and transforming growth factor-beta – TGF-β, which promote their differentiation toward an immunosuppressive profile [6, 7, 8, 9, 10].

Despite substantial progress in studying macrophage biology in PDAC, experimental models that adequately reflect the complexity of the local immune environment within the patient's body remain limited. Traditional *in vitro* systems, based on the use of tumor cell-condi-

адекватно відображають складність локального імунного середовища в організмі пацієнта, залишаються обмеженими. Традиційні *in vitro* системи, засновані на використанні кондиційованих середовищ пухлинних клітин, органоїдних платформ або окремих рекомбінантних цитокінів, не відтворюють повною мірою різноманіття розчинних медіаторів, які формуються *in vivo* [10, 11].

Післяопераційна дренажна рідина, отримана з ложа підшлункової залози після резекції, є потенційно цінним біологічним субстратом для дослідження локальних медіаторів запалення, репарації та імунної регуляції. Клінічні дослідження показали, що аналіз рідини, дренажної з панкреатичного ложа після радикальної резекції, може мати прогностичне значення, а виявлення в ній пухлинних клітин асоціюється з підвищеним ризиком локального рецидиву та гіршими показниками виживаності [12]. Крім того, перитонеальна рідина, отримана в ранньому післяопераційному періоді у хворих на ПАПЗ, використовувалася для цитокінового профілювання та функціональних досліджень, у яких було показано, що її склад відображає локальні біологічні процеси в ділянці операційного втручання і може впливати на проліферацію, міграцію та інвазивність пухлинних клітин [13]. Аналогічні підходи в експериментальних і клінічних дослідженнях інших солідних пухлин продемонстрували, що післяопераційна ранова або дренажна рідина містить комплекс медіаторів, здатних модулювати поведінку резидуальних пухлинних клітин та імунних клітин [14, 15].

Водночас післяопераційна дренажна рідина не може розглядатися як повний еквівалент інтактного доопераційного мікрооточення пухлини. Після радикального хірургічного втручання вона насамперед відображає післяопераційне запальне та імунорегуляторне мікрооточення ложа пухлини, у якому поєднуються сигнали тканинного ушкодження, загоєння рани, ангиогенезу та резидуальні пухлин-асоційовані впливи. Для ПАПЗ показано, що оперативне втручання супроводжується суттєвими імунними змінами, включно зі зниженням кількості лімфоцитів, дисфункцією НК-клітин, змінами співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів, а також підвищенням рівнів імуносупресивних і прозапальних медіаторів, що обґрунтовує розгляд раннього післяопераційного періоду як потенційного терапевтичного вікна для імуномодулювальних втручань [16, 17]. Саме тому дослідження післяопераційної дренажної рідини є доцільним для вивчення механізмів післяопераційної імуносупресії та ролі мієлоїдних клітин у цьому процесі.

Мета роботи – охарактеризувати цитокіновий профіль післяопераційної дренажної рідини хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози та оцінити її вплив на фенотип макрофагів і функціональну активність CD8⁺ Т-лімфоцитів.

tioned media, organoid platforms, or individual recombinant cytokines, do not fully replicate the diversity of soluble mediators formed *in vivo* [10, 11].

Postoperative drainage fluid obtained from the pancreatic bed after resection is a potentially valuable biological substrate for studying local mediators of inflammation, repair, and immune regulation. Clinical studies have shown that the analysis of fluid drained from the pancreatic bed after radical resection may have prognostic significance, and the detection of tumor cells within it is associated with an increased risk of local recurrence and poorer survival rates [12]. Furthermore, peritoneal fluid obtained in the early postoperative period from PDAC patients has been used for cytokine profiling and functional studies, which demonstrated that its composition reflects local biological processes at the surgical site and can influence the proliferation, migration, and invasiveness of tumor cells [13]. Similar approaches in experimental and clinical studies of other solid tumors have demonstrated that postoperative wound or drainage fluid contains a complex of mediators capable of modulating the behavior of residual tumor cells and immune cells [14, 15].

At the same time, postoperative drainage fluid cannot be considered a complete equivalent of the intact, preoperative tumor microenvironment. Following radical surgical intervention, it primarily reflects the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment of the tumor bed, where signals of tissue injury, wound healing, and angiogenesis converge with residual tumor-associated influences. For PDAC, it has been shown that surgery is accompanied by significant immune alterations, including a decrease in lymphocyte count, NK-cell dysfunction, changes in the neutrophil-to-lymphocyte ratio, and elevated levels of immunosuppressive and proinflammatory mediators. This justifies considering the early postoperative period as a potential therapeutic window for immunomodulatory interventions [16, 17]. Therefore, investigating postoperative drainage fluid is essential for understanding the mechanisms of postoperative immunosuppression and the role of myeloid cells in this process.

Objective – to characterize the cytokine profile of postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and to evaluate its impact on macrophage phenotype and the functional activity of CD8⁺ T-lymphocytes.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

MATERIALS AND METHODS

Дослідження було спрямоване на оцінку імуномодулювального впливу розчинних факторів післяопераційної дренажної рідини на фенотипову поляризацію макрофагів, їхню здатність пригнічувати активаційний статус CD8⁺ Т-клітин та знижувати їхній

The study was aimed at evaluating the immunomodulatory effects of soluble factors from postoperative drainage fluid on macrophage phenotypic polarization, their capacity to suppress the activation status of CD8⁺ T cells, and their ability to reduce the cytotoxic

цитотоксичний потенціал при протоковій аденокарциномі підшлункової залози.

Клінічний етап дослідження (забір операційного матеріалу та післяопераційного дренажного вмісту пацієнтів із протоковою аденокарциномою підшлункової залози) виконували на базі хірургічних клінік Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України та Комунального некомерційного підприємства «Київський міський клінічний онкологічний центр» (м. Київ, Україна). Експериментальна частина роботи, що включала створення пацієнт-специфічних *in vitro* моделей, довготривале зберігання біоматеріалів (заморожені тканини, парафінові блоки, сироватка та плазма крові), а також стандартизацію процесів, здійснювалася на базі Української асоціації біобанків (м. Харків та м. Київ) у методологічний та науково-технічний співпраці з Biobank Graz Медичного університету Граца (м. Грац, Австрія).

Клінічну групу склали 34 пацієнти з гістологічно верифікованим діагнозом ПАПЗ, яким було проведено радикальне хірургічне лікування. Обсяг оперативних втручань включав панкреатодуоденальну резекцію, дистальну або тотальну панкреатектомію. Дослідження проводили відповідно до основних біоетичних положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з біомедичних досліджень, конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, а також чинного законодавства України в галузі біобанкування клітин і тканин людини. Усі хворі, які увійшли до клінічної групи, були детально ознайомлені з метою, дизайном та обсягом дослідження, після чого добровільно підписали форму інформованої згоди на забір, довготривале кріозберігання та використання їхнього біологічного матеріалу (операційних тканин, зразків крові) та післяопераційної дренажної рідини (PDF) для наукових цілей.

Критеріями включення пацієнтів до клінічної групи були вік від 18 років, гістологічно та патоморфологічно підтверджений діагноз протокової аденокарциноми підшлункової залози, а також проведення радикального хірургічного лікування в обсязі панкреатодуоденальної резекції, дистальної або тотальної панкреатектомії. Обов'язковими умовами були можливість інтраопераційного встановлення абдомінальних дренажних систем із технічно успішним забором післяопераційної дренажної рідини (PDF) у часовому інтервалі 24–72 годин після операції, успішне отримання життєздатної первинної культури клітин ПАПЗ із фрагментів операційного матеріалу (з можливістю її культивування до 1–3 пасажів), а також наявність підписаної пацієнтом форми інформованої згоди на використання його біоматеріалу в наукових цілях.

Критеріями виключення для пацієнтів клінічної групи слугували інші, неаденокарциномні гістологічні типи пухлин підшлункової залози (нейроендокринні, ацинарноклітинні пухлини, солідно-псевдопапілярні новоутворення та кістозні неоплазії), проведення паліативних чи циторедуктивних втручань, а також отримання неoad'ювантної передопераційної хіміотерапії або променевої терапії. Із дослідження виключали пацієнтів у разі розвитку ранніх післяопераційних хірургічних ускладнень протягом перших 72 годин (масивна кровотеча, неспроможність анастомозу чи гостра панкреатична нориця), що могло викривити цитокіновий профіль PDF. **Додатковими критеріями виключення** були наявність супутніх

potential of these cells in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

The clinical phase of the study (collection of surgical specimens and postoperative drainage content from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma) was performed at the surgical clinics of Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine and the Kyiv City Clinical Oncology Center (Kyiv, Ukraine). The experimental part of the work, which included the establishment of patient-specific *in vitro* models, long-term biospecimen storage (frozen tissues, paraffin blocks, blood serum, and plasma), as well as process standardization, was carried out at the Ukrainian Association of Biobanks (Kharkiv/Kyiv) in methodological and scientific-technical cooperation with Biobank Graz of the Medical University of Graz (Graz, Austria).

The clinical group comprised 34 patients with a histologically verified diagnosis of PDAC who underwent radical surgical treatment. The scope of surgical interventions included pancreaticoduodenectomy, distal pancreatectomy, or total pancreatectomy. The study was conducted in accordance with the core bioethical provisions of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association on biomedical research, the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, and the current legislation of Ukraine in the field of human cell and tissue biobanking. All patients included in the clinical group were thoroughly informed about the aim, design, and scope of the study, after which they voluntarily signed an informed consent form for the collection, long-term cryopreservation, and use of their biological material (surgical tissues, blood samples) and postoperative drainage fluid (PDF) for scientific purposes.

Patient **inclusion criteria** for the clinical group were: age of 18 years or older; histologically and pathomorphologically confirmed diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma; and radical surgical treatment consisting of pancreaticoduodenectomy, distal pancreatectomy, or total pancreatectomy. Mandatory prerequisites included the feasibility of intraoperative abdominal drainage placement with technically successful postoperative drainage fluid (PDF) collection within a time interval of 24 to 72 hours post-surgery; successful isolation of a viable primary PDAC cell culture from surgical tissue fragments (with the capability of cultivation up to passages 1–3); and the presence of a signed informed consent form allowing the use of the patient's biospecimens for scientific purposes.

Exclusion criteria for the clinical group were: other, non-adenocarcinoma histological types of pancreatic tumors (neuroendocrine tumors, acinar cell carcinomas, solid-pseudopapillary neoplasms, and cystic neoplasms); palliative or cytoreductive interventions; and prior neoadjuvant preoperative chemotherapy or radiotherapy. Patients were excluded from the study in case of early postoperative surgical complications during the first 72 hours (massive hemorrhage, anastomotic leakage, or acute pancreatic fistula), which could distort the cytokine profile of the PDF. **Additional exclusion criteria** included the presence of concurrent active systemic infectious or decompensated autoimmune diseases; chronic somatic pathology in the decompen-

активних системних інфекційних або декомпенсованих аутоімунних захворювань, хронічної соматичної патології у стадії декомпенсації, а також недостатня життєздатність або контамінація виділених первинних пухлинних клітин *in vitro*.

Критеріями включення для групи здорових донорів крові були вік 18–60 років, відсутність гострих інфекційних захворювань протягом останніх 4 тижнів, відсутність хронічних запальних, аутоімунних, алергічних чи онкологічних захворювань в анамнезі, а також негативні результати тестів на гепатити В і С, ВІЛ-інфекцію та сифіліс.

Критеріями виключення для донорів та їхніх зразків були прийом будь-яких імуномодулювальних, протизапальних або антибактеріальних препаратів протягом двох тижнів до моменту забору крові, незадовільна чистота виділеної фракції CD14⁺ моноцитів (менше 95% за даними цитофлуориметрії), або недостатня життєздатність отриманих макрофагів (менше 90% за тестом із трипановим синім) перед початком інкубації з PDF.

Стадіювання онкологічного процесу здійснювали відповідно до критеріїв класифікації TNM (9-та редакція, AJCC) [18]. Діагноз встановлювали відповідно до сучасних клінічних та патоморфологічних настанов, включаючи рекомендації NCCN [19], ESMO [20] та класифікацію пухлин травної системи BOO3 [21] за допомогою комп'ютерної томографії з внутрішньовенним контрастуванням, яку виконували на сканері SOMATOM Definition AS (Siemens Healthineers, Німеччина), визначення сироваткового онкомаркера СА 19-9 та обов'язкового патогістологічного підтвердження операційного матеріалу [2, 3, 4]. Концентрацію сироваткового онкомаркера СА 19-9 вимірювали за допомогою набору для електрохемілюмінесцентного імуноаналізу Elecsys CA19-9 II (Roche Diagnostics, Cat. №. 11776176322).

Зразки післяопераційної дренажної рідини (PDF) отримували з абдомінальних дренажних систем, встановлених інтраопераційно, шляхом збору протягом 24–72 годин після хірургічного втручання. Отриману рідину розцінювали як інтегральний субстрат локального післяопераційного мікросередовища ранового ложа пухлини. Зразки PDF обробляли протягом двох годин після забору: клітинний детрит видаляли центрифугуванням при 3000×g протягом 10 хвилин на центрифугі Eppendorf 5810R (Eppendorf, Німеччина), після чого супернатант фільтрували через стерильні шприцеві фільтри з діаметром пор 0,22 мкм (Millex-GP, Merck Millipore, Cat. №. SLGP033RS). Очищену рідину аліквотували та зберігали при –80°C в Українській асоціації біобанків. Залежно від наявного об'єму матеріалу, отримані від 34 пацієнтів зразки розподіляли для різних етапів аналізу: 24 зразки використано для моделювання поляризації макрофагів, ко-культивування та функціональних імунних тестів; 20 зразків використано для мультиплексного профілювання цитокінів; 24 пацієнти увійшли до порівняльного аналізу концентрацій цитокінів залежно від стадії пухлини, де на основі патоморфологічного аналізу їх було розподілено на дві підгрупи: з ранніми стадіями (I–II стадії, n = 10) та поширеним процесом (III–IV стадії, n = 14).

Первинні клітини ПАПЗ виділяли з фрагментів операційного матеріалу пацієнтів клінічної групи. Тканину пухлини піддавали механічному подрібненню

sation stage; and insufficient viability or contamination of the isolated primary tumor cells *in vitro*.

Inclusion criteria for the healthy blood donor group were: age between 18 and 60 years; absence of acute infectious diseases within the past 4 weeks; absence of chronic inflammatory, autoimmune, allergic, or oncological diseases in the medical history; and negative test results for hepatitis B and C, HIV infection, and syphilis.

Exclusion criteria for donors and their samples were: intake of any immunomodulatory, anti-inflammatory, or antibacterial drugs within 2 weeks prior to blood collection; unsatisfactory purity of the isolated CD14⁺ monocyte fraction (less than 95% according to flow cytometry data); or insufficient viability of the derived macrophages (less than 90% by the trypan blue exclusion test) prior to the initiation of incubation with PDF.

Tumor staging was performed according to the TNM classification criteria (9th edition, AJCC) [18]. The diagnosis was established in accordance with current clinical and pathomorphological guidelines, including the NCCN [19] and ESMO [20] recommendations, as well as the WHO classification of digestive system tumors [21], utilizing intravenous contrast-enhanced computed tomography performed on a SOMATOM Definition AS scanner (Siemens Healthineers, Germany), determination of the serum tumor marker CA 19-9, and mandatory histopathological confirmation of the surgical specimen [2, 3, 4]. Serum CA 19-9 concentration was measured using the Elecsys CA19-9 II electrochemiluminescence immunoassay kit (Roche Diagnostics, Cat. No. 11776176322).

Postoperative drainage fluid (PDF) samples were obtained from intraoperatively placed abdominal drainage systems by collecting the fluid within 24 to 72 hours following the surgical procedure. The collected fluid was considered an integral substrate of the local postoperative microenvironment within the tumor wound bed. PDF samples were processed within two hours of collection: cellular debris was removed by centrifugation at 3,000×g for 10 minutes using an Eppendorf 5810R centrifuge (Eppendorf, Germany), after which the supernatant was filtered through sterile 0.22 µm pore-size syringe filters (Millex-GP, Merck Millipore, Cat. No. SLGP033RS). The clarified fluid was aliquoted and stored at –80°C at the Ukrainian Association of Biobanks. Depending on the available specimen volume, the samples obtained from 34 patients were allocated to different analytical phases: 24 samples were used for macrophage polarization modeling, co-culturing, and functional immune assays; 20 samples were utilized for multiplex cytokine profiling; and 24 patients were included in the comparative analysis of cytokine concentrations relative to tumor stage. Based on pathomorphological evaluation, the latter cohort was divided into two subgroups: early-stage disease (stages I–II, n = 10) and advanced disease (stages III–IV, n = 14).

Primary PDAC cells were isolated from surgical tissue fragments obtained from patients of the clinical group. Tumor tissue was subjected to mechanical mincing and enzymatic dissociation in a solution of collagenase type IV and DNase I for 1 hour at 37°C. The resulting suspension was filtered through 70 µm nylon mesh cell strainers, washed by centrifugation,

та ферментативному дисоціюванню в розчині колагенази IV типу та ДНКазі I протягом 1 години при 37°C. Отриману суспензію фільтрували через нейлонові фільтри (70 мкм), відмивали центрифугуванням та культивували на спеціалізованому культуральному середовищі для первинних епітеліальних культур. У функціональних тестах використовували клітини 1–3 пасажів.

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) отримували від 30 здорових донорів (без онкологічних або аутоімунних захворювань в анамнезі) шляхом центрифугування у градієнті щільності Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Cat. No. 17-1440-02). Цільну кров розводили фосфатно-сольовим буфером (PBS), нашаровували на розчин Ficoll та центрифугували при 400×g протягом 30 хвилин. Інтерфазне кільце PBMC збирали, двічі промивали буфером PBS, а клітини підраховували на автоматичному лічильнику клітин Countess II FL (Thermo Fisher Scientific).

Виділення CD14⁺ моноцитів здійснювали методом магнітної сепарації з використанням мікрочастинок CD14 MicroBeads Human та колонок MACS LS (Miltenyi Biotec, Німеччина, Cat. No. 130-050-201) та колонок MACS LS (Miltenyi Biotec, Німеччина, Cat. No. 130-042-401). Очищені CD14-позитивні моноцити культивували в середовищі RPMI-1640 (Gibco, Cat. No. 11875093) з додаванням 10% ембріональної сироватки телят (Gibco, Cat. No. 10270106) та суміші пеніциліну-стрептоміцину (Gibco, Cat. No. 15140122). Клітини інкубували при 37°C у 5% CO₂ в інкубаторі Binder CB160 (Binder GmbH, Німеччина) протягом 5–7 діб для диференціювання моноцитів у незрілі макрофаги.

Для оцінки імунотулювальних властивостей післяопераційного середовища незрілі макрофаги здорових донорів інкубували протягом 48 годин у культурному середовищі, що містило 20–30% об'єму PDF пацієнтів.

Дизайн дослідження включає п'ять експериментальних умов:

- 1) контроль – макрофаги у стандартному культуральному середовищі;
- 2) PDF – макрофаги, культивовані з додаванням післяопераційної дренажної рідини;
- 3) PDF + інгібітор CSF1R – культивування з PDF у присутності пексидартинібу (PLX3397; Selleck Chemicals, Cat. No. S7818);
- 4) PDF + інгібітор CCR2 – культивування з PDF у присутності селективного блокатора RS504393 (Tocris Bioscience, Cat. No. 2268);
- 5) PDF + агоніст CD40 – культивування з PDF у присутності агоністичних моноклональних антитіл до CD40 (BioLegend, Cat. No. 334302) [22, 23].

Кожна експериментальна умова включала клітини, отримані щонайменше від 5 незалежних донорів, у 3 незалежних біологічних повторях. Ефективність репрограмування оцінювали за зміною експресії поверхневих маркерів: M2-супресивних (CD163, CD206) та M1-прозапальних/антигенпрезентувальних (CD80, HLA-DR).

Для дослідження впливу поляризованих макрофагів на адаптивний імунітет, макрофаги після 48-годинної інкубації в зазначених вище 5 умовах відмивали та ко-культивували з активованими аутологічними CD8⁺ Т-лімфоцитами у присутності первинних пухлинних клітин ПАПЗ. Фракцію CD8⁺ Т-клітин виділяли з PBMC за допомогою набору CD8⁺ T Cell Iso-

and cultured in a specialized medium for primary epithelial cultures. Cells from passages 1–3 were used in functional assays.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 30 healthy donors (with no history of oncological or autoimmune diseases) by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Cat. No. 17-1440-02). Whole blood was diluted with phosphate-buffered saline (PBS), layered onto the Ficoll solution, and centrifuged at 400×g for 30 minutes. The PBMC interphase ring was collected, washed twice with PBS, and cells were counted using a Countess II FL automated cell counter (Thermo Fisher Scientific).

Isolation of CD14⁺ monocytes was performed via magnetic cell separation using human CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany, Cat. No. 130-050-201) and MACS LS columns (Miltenyi Biotec, Germany, Cat. No. 130-042-401). Purified CD14-positive monocytes were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Cat. No. 11875093) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Cat. No. 10270106) and a penicillin-streptomycin mixture (Gibco, Cat. No. 15140122). The cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in a Binder CB160 incubator (Binder GmbH, Germany) for 5–7 days to allow differentiation of monocytes into immature macrophages.

To evaluate the immunomodulatory properties of the postoperative environment, immature macrophages from healthy donors were incubated for 48 hours in culture medium containing 20–30% (v/v) patient PDF.

The experimental design comprised five conditions:

- 1) Control – macrophages in standard culture medium;
- 2) PDF – macrophages cultured with the addition of postoperative drainage fluid;
- 3) PDF + CSF1R inhibitor – cultivation with PDF in the presence of pexidartinib (PLX3397; Selleck Chemicals, Cat. No. S7818);
- 4) PDF + CCR2 inhibitor – cultivation with PDF in the presence of the selective blocker RS504393 (Tocris Bioscience, Cat. No. 2268);
- 5) PDF + CD40 agonist – cultivation with PDF in the presence of agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies (BioLegend, Cat. No. 334302) [22, 23].

Each experimental condition included cells obtained from at least 5 independent donors, performed in 3 independent biological replicates. Reprogramming efficiency was evaluated by changes in the expression of surface markers: M2-suppressive (CD163, CD206) and M1-proinflammatory/antigen-presenting (CD80, HLA-DR).

To investigate the effect of polarized macrophages on adaptive immunity, macrophages following the 48-hour incubation under the 5 conditions described above were washed and co-cultured with activated autologous CD8⁺ T lymphocytes in the presence of primary patient-derived PDAC cells. The CD8⁺ T cell fraction was isolated from PBMCs using the CD8⁺ T Cell Isolation Kit

lation Kit (Miltenyi Biotec, Cat. №. 130-096-495). Активцію Т-клітин проводили за допомогою часток Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Cat. №. 11131D).

Функціональний та ефекторний стан CD8⁺ Т-клітин у системі ко-культивування оцінювали за трьома ключовими параметрами:

1) експресія раннього активаційного маркера CD69 визначалася методом проточної цитофлуориметрії як відсоток CD69⁺ клітин серед загальної популяції CD8⁺ Т-лімфоцитів;

2) вміст гранзиму В оцінювався методом внутрішньоклітинного забарвлення та проточної цитофлуориметрії (відсоток позитивних CD8⁺ клітин);

3) концентрацію інтерферону-гамма IFN- γ у супернатанті ко-культур визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) та виражали у пг/мл.

Інтегральну ефекторну здатність Т-кілерів оцінювали у прямому цитотоксичному тесті проти первинних мішеневих клітин ПАПЗ. Ефективність знищення пухлинних клітин у системі ко-культивування визначали спектрофотометрично за рівнем вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культурне середовище внаслідок лізису клітин-мішеней за допомогою набору LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, Cat. №. 11644793001). Оптичну щільність вимірювали на мікропланшетному рідері BioTek Synergy HTX (Agilent Technologies, США). Розрахунок відсотка цитотоксичності проводили за стандартною формулою відносно максимального та спонтанного вивільнення ЛДГ.

Фенотип макрофагів та активаційні маркери Т-клітин аналізували на багатоколірному проточному цитофлуориметрі BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Для фарбування використовували флуорохром-кон'юговані моноклональні антитіла проти макрофагальних маркерів: CD163 (BioLegend, Cat. №. 333606), CD206 (BioLegend, Cat. №. 321110), CD80 (BioLegend, Cat. №. 305206) та HLA-DR (BD Biosciences, Cat. №. 347364). Реєстрацію даних виконували за допомогою програмного забезпечення FACSDiva, аналіз – у програмі FlowJo v10.8 (BD Biosciences, США). Для забезпечення надійності та відтворюваності результатів цитофлуориметричного аналізу щоденно проводили калібрування та верифікацію роботи приладу з використанням калібрувальних часток BD Cytometer Setup and Tracking (CS&T) Calibration Beads (BD Biosciences, США). Налаштування матриці компенсації перекриття спектрів флуоресценції здійснювали за допомогою автоматизованої системи одноколірних контрольних часток BD CompBeads Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particle Set (BD Biosciences, США, Cat. №. 552843).

Стратегія послідовного гейтування включала:

1) селекцію клітин за морфологічними параметрами у координатах FSC-A/SSC-A з виключенням детриту;

2) дуплет-дискримінацію (виділення синглетів) у координатах FSC-A/FSC-H та SSC-A/SSC-H;

3) гейтування живих клітин шляхом відсікання нежиттєздатних подій за допомогою флуоресцентного барвника життєздатності 7-AAD (7-Aminoactinomycin D; BD Biosciences, США, Cat. №. 559925); зразки з загальною життєздатністю менше 85% виключалися з подальшого аналізу;

4) реєстрацію щонайменше 10000 подій у фінальному гейті цільових клітин (CD8⁺ Т-лімфоцитів або макрофагів).

(Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-096-495). T-cell activation was performed using Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 11131D).

The functional and effector status of CD8⁺ T cells in the co-culture system was assessed by three key parameters:

1) expression of the early activation marker CD69 was determined by flow cytometry as the percentage of CD69⁺ cells within the total CD8⁺ T lymphocyte population;

2) granzyme B content was evaluated by intracellular staining and flow cytometry (percentage of positive CD8⁺ cells);

3) interferon-gamma (IFN- γ) concentration in the co-culture supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and expressed in pg/ml.

The integral effector capacity of T killers was evaluated in a direct cytotoxicity assay against target primary PDAC cells. The efficiency of tumor cell clearance within the co-culture system was determined spectrophotometrically by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium resulting from target cell lysis, using the LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics, Cat. No. 11644793001). Optical density was measured on a BioTek Synergy HTX microplate reader (Agilent Technologies, USA). The percentage of cytotoxicity was calculated using the standard formula relative to maximum and spontaneous LDH release.

Macrophage phenotype and T-cell activation markers were analyzed on a BD FACSCanto II multicolor flow cytometer (BD Biosciences, USA). Fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies against the following macrophage markers were used for staining: CD163 (BioLegend, Cat. No. 333606), CD206 (BioLegend, Cat. No. 321110), CD80 (BioLegend, Cat. No. 305206), and HLA-DR (BD Biosciences, Cat. No. 347364). Data acquisition was performed using FACSDiva software, and analysis was conducted using FlowJo v10.8 software (BD Biosciences, USA). To ensure the reliability and reproducibility of the flow cytometry results, daily instrument calibration and performance verification were conducted using BD Cytometer Setup and Tracking (CS&T) Calibration Beads (BD Biosciences, USA). Compensation matrix settings for fluorescence spectral overlap were configured using the automated BD CompBeads Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particle Set single-color control system (BD Biosciences, USA, Cat. No. 552843).

The sequential gating strategy included:

1) cell selection by morphological parameters in FSC-A/SSC-A coordinates with the exclusion of debris;

2) doublet discrimination (singlet isolation) in FSC-A/FSC-H and SSC-A/SSC-H coordinates;

3) gating of live cells by excluding non-viable events using 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) fluorescent viability dye (BD Biosciences, USA, Cat. No. 559925); samples with a total viability below 85% were excluded from further analysis;

4) acquisition of at least 10,000 events in the final gate of target cells (CD8⁺ T lymphocytes or macrophages).

Межу позитивності сигналу для CD69, гранзиму В та маркерів макрофагів встановлювали за допомогою FMO (Fluorescence Minus One) контролів.

Кількісне визначення розчинних факторів у нерозведеній дренажній рідині (PDF, $n = 20$) здійснювали методом мультиплексного імуноаналізу на основі магнітних часток із використанням панелі Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Milliplex MAP Kit, Millipore Sigma, Cat. No. HCYTMAG-60K). Вимірювання виконували на мультиплексному аналізаторі Luminex 200 (Luminex Corporation, США). У зразках одночасно вимірювали концентрації 5 медіаторів: колонієстимулювального фактора 1 (CSF1), C-C хемокинового ліганду 2 (CCL2), інтерлейкіну-10 (IL-10), трансформуючого фактора росту- β (TGF- β) та гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF). Розрахунок концентрацій проводили за калібрувальними кривими за допомогою рекомбінантних стандартів, результати виражали у пг/мл.

Статистичну обробку виконували в програмах Statistica 8.0, GraphPad Prism 10.0 та IBM SPSS Statistics 29.0. Нормальність розподілу перевіряли критерієм Шапіро–Уїлка. Оскільки розподіл ознак відхилявся від нормального, дані представляли у вигляді медіани та міжквартильного інтервалу – Me [Q1; Q3]. Для аналізу статистичних гіпотез використовували наступні критерії. При порівнянні двох незалежних груп (оцінка рівнів CCL2 залежно від стадії пухлини) застосовували непараметричний U-критерій Манна–Уїтні. При порівнянні кількох незалежних експериментальних груп (аналіз маркерів активації Т-клітин та цитотоксичності між 5 умовами: контроль, PDF та PDF з модуляторами) використовували критерій Краскела–Уолліса з подальшим попарним пост-хок аналізом за критерієм Данна для коригування ефекту множинних порівнянь. Усі тести були двосторонніми, критичний рівень значущості приймали при $p < 0,05$.

The threshold for positive signal detection for CD69, granzyme B, and macrophage markers was established using FMO (Fluorescence Minus One) controls.

Quantitative determination of soluble factors in undiluted postoperative drainage fluid (PDF, $n = 20$) was performed by magnetic bead-based multiplex immunoassay using the Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Milliplex MAP Kit, Millipore Sigma, Cat. No. HCYTMAG-60K). Measurements were conducted on a Luminex 200 multiplex analyzer (Luminex Corporation, USA). The concentrations of 5 mediators were simultaneously measured in the samples: colony-stimulating factor 1 (CSF1), C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor-beta (TGF- β), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Concentrations were calculated from standard curves generated using recombinant standards, and the results were expressed in pg/ml.

Statistical analysis was performed using Statistica 8.0, GraphPad Prism 10.0, and IBM SPSS Statistics 29.0 software. The normality of data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test. Since the distribution of variables deviated from normal, data were presented as median and interquartile range: Me [Q1; Q3]. The following statistical tests were used for hypothesis testing: when comparing two independent groups (evaluation of CCL2 levels relative to tumor stage), the non-parametric Mann–Whitney U test was applied; when comparing multiple independent experimental groups (analysis of T-cell activation markers and cytotoxicity across the 5 conditions: control, PDF, and PDF with modulators), the Kruskal–Wallis test was used, followed by pairwise post-hoc analysis using Dunn's test to adjust for multiple comparisons. All tests were two-tailed, and the critical level of statistical significance was set at p less than 0.05.

РЕЗУЛЬТАТИ

RESULTS

Для оцінки імуномодулювального впливу післяопераційної дренажної рідини у хворих на ПАПЗ використовували модель *in vitro* поляризації макрофагів із використанням макрофагів, отриманих із моноцитів периферичної крові здорових донорів. Зразки дренажної рідини були зібрані у 34 пацієнтів із гістологічно підтвердженою ПАПЗ після хірургічної резекції. Диференційовані макрофаги інкубували у присутності дренажної рідини для оцінки її впливу на фенотип клітин. При цьому дренажну рідину розглядали не як еквівалент інтактного мікрооточення пухлини, а як джерело факторів післяопераційного запального та імуnoreгуляторного мікрооточення ложа пухлини.

У культурах макрофагів, які піддавалися впливу післяопераційної дренажної рідини (PDF), зафіксовано виражене та статистично значуще зміщення диференціювання у супресивний бік. Спостерігалось різке збільшення частки клітин, що експресують альтернативні (M2-подібні) маркери поляризації – сміттевий рецептор CD163 (приріст медіани з 18% до 63%) та манозний рецептор CD206 (приріст з 21% до 67%, $p < 0,001$ для обох показників) (табл. 1).

To evaluate the immunomodulatory effects of postoperative drainage fluid in patients with PDAC, an *in vitro* macrophage polarization model was utilized, employing macrophages derived from the peripheral blood monocytes of healthy donors. Drainage fluid samples were collected from 34 patients with histologically confirmed PDAC following surgical resection. Differentiated macrophages were incubated in the presence of the drainage fluid to assess its impact on cell phenotype. In this context, the drainage fluid was considered not as an equivalent of the intact tumor microenvironment, but rather as a source of factors reflecting the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment of the tumor bed.

In macrophage cultures exposed to postoperative drainage fluid (PDF), a pronounced and statistically significant shift toward suppressive differentiation was observed. There was a sharp increase in the proportion of cells expressing alternative (M2-like) polarization markers: namely, the scavenger receptor CD163 (with the median increasing from 18% to 63%) and the mannose receptor CD206 (increasing from 21% to 67%, $p < 0.001$ for both parameters) (Table 1).

Таблиця 1. Маркери поляризації макрофагів за умов інкубації з післяопераційною дренажною рідиною
Table 1. Macrophage polarization markers under incubation with postoperative drainage fluid

Маркер, % позитивних клітин Marker, % positive cells	Контроль Control	Дренажна рідина Drainage fluid	p (контроль vs дренажна рідина) (control vs. drainage fluid)	Дренажна рідина + інгібітор CSF1R Drainage fluid + CSF1R inhibitor	Дренажна рідина + інгібітор CCR2 Drainage fluid + CCR2 inhibitor	Дренажна рідина + агоніст CD40 Drainage fluid + CD40 agonist
CD163	18 [12; 24]	63*** [55; 72]	<0,001	38*** [30; 45]	41*** [34; 49]	29** [22; 37]
CD206	21 [15; 27]	67*** [58; 74]	<0,001	40*** [33; 47]	44*** [36; 51]	31* [24; 38]
CD80	42 [35; 50]	19*** [14; 26]	<0,001	36* [29; 44]	34* [28; 41]	47 [40; 55]
HLA-DR	55 [48; 63]	32*** [26; 39]	<0,001	49 [42; 56]	46* [39; 53]	58 [51; 66]

Примітки:

значення подано як Ме [Q1; Q3].

Стовпчик «p» відображає пряме порівняння «Контроль» vs «Дренажна рідина» (за U-критерієм Манна–Уїтні).

Статистична значущість відмінностей інших експериментальних умов порівняно з групою «Контроль» (за результатами критерію Краскела–Уолліса з пост-хок корекцією Данна): * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

Notes:

data are presented as Median [Interquartile Range].

The «p» column indicates statistical significance for the direct «Control» vs. «Drainage fluid» comparison (by Mann–Whitney U-test).

Statistical significance of differences for other experimental conditions compared to the «Control» group (based on Kruskal–Wallis test with Dunn's post-hoc correction): * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Натомість експресія молекул, характерних для класичної прозапальної (M1-подібної) активації, під дією факторів PDF суттєво супресувалася, що проявилось дворазовим зниженням кількості CD80⁺-клітин (до 19%) та пригніченням експресії молекули головного комплексу гістосумісності класу II (HLA-DR) до 32% порівняно з інтактним контролем.

Для з'ясування ключових факторів PDF, відповідалних за індукцію імуносупресивного фенотипу, а також для оцінки можливостей функціонального ремоделювання мієлоїдного компартмента, було проаналізовано ефекти селективного блокування мембранних рецепторів та імуноактивації. Додавання інгібітора рецептора макрофагального колонієстимулювального фактора (CSF1R) призвело до вираженого пригнічення просупресивного впливу PDF: відзначено суттєве зниження експресії M2-маркерів CD163 та CD206 (приблизно до 38–40%) на тлі збереження прозапального потенціалу клітин, що виражалося у відновленні рівнів CD80 та HLA-DR майже до базових показників контролю.

Фармакологічне інгібування рецептора хемокінового ліганду 2 (CCR2) продемонструвало схожу, проте дещо менш виражену тенденцію до нормалізації фенотипового профілю макрофагів, утримуючи рівні M2-маркерів у межах 41–44% (табл. 1). Натомість найефективніша реверсія супресивного стану була досягнута за умов використання агоністичного антитіла до CD40. На тлі дії PDF активація CD40 супроводжувалася радикальним падінням частки імуносупресивних клітин (до 29% за CD163 та 31% за CD206) та індукцією потужної прозапальної активації. Рівні експресії ко-стимулювальних (CD80, 47%) та антигенпрезентуючих (HLA-DR, 58%) молекул у цій групі не просто відновилися, а перевищили значення інтактного контролю.

Таким чином, вплив післяопераційної дренажної рідини супроводжувався вираженим перепрограмуванням моноцитарно-макрофагальних клітин, що виражалося у синергічному підвищенні експресії імуносупресивних маркерів (CD163 та CD206) та пригніченні молекул, асоційованих із класичною прозапальною активацією (CD80 та HLA-DR). Це свідчить

Conversely, the expression of molecules characteristic of classical proinflammatory (M1-like) activation was substantially suppressed under the influence of PDF factors. This was manifested by a two-fold decrease in the number of CD80⁺ cells (down to 19%) and a reduction in the expression of the major histocompatibility complex class II molecule (HLA-DR) to 32% compared to the intact control.

To identify the key PDF factors responsible for inducing the immunosuppressive phenotype, and to evaluate the potential for functional remodeling of the myeloid compartment, the effects of selective membrane receptor blockade and immunoactivation were analyzed. The addition of a macrophage colony-stimulating factor receptor (CSF1R) inhibitor resulted in a pronounced attenuation of the pro-suppressive effects of PDF: a significant reduction in the expression of M2 markers CD163 and CD206 (down to approximately 38–40%) was noted, concurrently with the preservation of the proinflammatory potential of the cells, as evidenced by the restoration of CD80 and HLA-DR levels almost to the baseline control values.

Pharmacological inhibition of the C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) demonstrated a similar, though slightly less pronounced, trend toward the normalization of the macrophage phenotypic profile, maintaining M2 marker levels within 41–44% (Table 1). In contrast, the most effective reversion of the suppressive state was achieved under conditions using an agonistic anti-CD40 antibody. Against the background of PDF action, CD40 activation was accompanied by a radical drop in the proportion of immunosuppressive cells (down to 29% for CD163 and 31% for CD206) and the induction of robust proinflammatory activation. The expression levels of co-stimulatory (CD80, 47%) and antigen-presenting (HLA-DR, 58%) molecules in this group were not merely restored but exceeded the values of the intact control.

Thus, the influence of postoperative drainage fluid was accompanied by pronounced reprogramming of monocyte-macrophage cells, manifested by a synergistic increase in the expression of immunosuppressive markers (CD163 and CD206) and the suppression

про наявність у локальному післяопераційному мікрооточенні ложа пухлини комплексу розчинних медіаторів, здатних спрямовувати поляризацію макрофагів у бік пухлиноасоційованого M2-подібного фенотипу в ранньому післяопераційному періоді. Водночас часткова реверсія цього ефекту за умов селективного блокування рецепторів CSF1R та CCR2 підтверджує патогенетичну роль сигнальних осей макрофагального колонієстимулювального фактора та хемокінового ліганду 2 у формуванні локальної імуносупресії. Найбільш значуща зміна фенотипового профілю клітин, досягнута під дією агоніста CD40, демонструє збереження високої функціональної пластичності макрофагів та вказує на можливість їхнього ефективного терапевтичного репрограмування у прозапальний M1-напрямок навіть за умов супресивного впливу чинників хірургічного ранового ложа.

Щоб визначити, чи має індукована PDF зміна фенотипу макрофагів ефекторні наслідки для адаптивного імунітету, на наступному етапі було оцінено стан CD8⁺ Т-клітин у системі ко-культивування у присутності пухлинних клітин ПАПЗ. За умов взаємодії з макрофагами, що зазнали впливу PDF, ефекторні лімфоцити демонстрували глибоке пригнічення активаційного, цитотоксичного та секреторного потенціалу (табл. 2).

of molecules associated with classical proinflammatory activation (CD80 and HLA-DR). This indicates the presence of a complex of soluble mediators within the local postoperative microenvironment of the tumor bed, capable of driving macrophage polarization toward a pro-tumorigenic M2-like phenotype in the early postoperative period. Concurrently, the partial reversion of this effect under conditions of selective CSF1R and CCR2 receptor blockade confirms the pathogenic role of the macrophage colony-stimulating factor and chemokine ligand 2 signaling axes in the development of local immunosuppression. The most significant shift in the phenotypic profile of the cells, achieved under the action of the CD40 agonist, demonstrates the preservation of high functional plasticity in macrophages and points to the possibility of their effective therapeutic reprogramming toward a proinflammatory M1 direction, even under the suppressive influence of surgical wound bed factors.

To determine whether the PDF-induced macrophage phenotype shift has effector consequences for adaptive immunity, the status of CD8⁺ T cells within the co-culture system in the presence of primary PDAC cells was evaluated in the next phase. Upon interaction with macrophages exposed to PDF, the effector lymphocytes exhibited a profound suppression of their activation, cytotoxic, and secretory potential (Table 2).

Таблиця 2. Маркери активації Т-клітин
Table 2. T-cell activation markers

Параметр Parameter	Контроль Control	PDF	p (Control vs PDF)	PDF + інгібітор CSF1R PDF + CSF1R inhibitor	PDF + інгібітор CCR2 PDF + CCR2 inhibitor	PDF + агоніст CD40 PDF + CD40 agonist
CD69 (% Т-клітин) CD69 (% T cells)	46 [38; 55]	19*** [14; 25]	<0.001	34* [28; 41]	31** [26; 37]	42 [35; 49]
IFN-γ (пг/мл) IFN-γ (pg/ml)	812 [690; 930]	284*** [210; 360]	<0.001	563** [470; 640]	525*** [430; 605]	742 [640; 830]
Гранзим В (% позитивних) Granzyme B (% positive)	39 [32; 46]	16*** [12; 21]	<0.001	30* [25; 36]	28** [23; 33]	36 [30; 42]

Примітки:

значення наведено як медіана [Q1; Q3].

Стовпчик «р» відображає пряме порівняння «Контроль» vs «PDF» (за U-критерієм Манна–Уїтні).

Символами відзначено статистичну значущість відмінностей інших експериментальних умов порівняно з групою «Контроль» (за результатами критерію Краскала–Уолліса з пост-хок корекцією Данна): * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Notes:

values are presented as median [Interquartile Range].

The «р» column indicates statistical significance for the direct «Control» vs. «PDF» comparison (by Mann–Whitney U-test).

Symbols indicate statistical significance of differences for other experimental conditions compared to the «Control» group (based on Kruskal–Wallis test with Dunn's post-hoc correction): * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

Спостерігалось критичне зниження експресії раннього активаційного маркера CD69 більше ніж удвічі (з медіани 46% у контролі до 19% у досліді), значне пригнічення секреції головного протипухлинного цитокіну IFN-γ майже утричі (до 284 пг/мл), а також редукція ефекторного апарату лімфоцитів, що проявилось падінням частки гранзим В-позитивних клітин до 16%. Сумарно присутність PDF-модульованих макрофагів викликала депресію ключових показників активації Т-кілерів на 60–65%, що підтверджує набуття мієлоїдними клітинами виражених імуносупресивних властивостей.

A critical, more than two-fold decrease in the expression of the early activation marker CD69 was observed (from a median of 46% in the control to 19% in the experimental group), along with a significant, nearly three-fold suppression of the secretion of IFN-γ, the primary antitumor cytokine (down to 284 pg/ml), and a reduction in the lymphocytic effector machinery, manifested by a drop in the proportion of granzyme B-positive cells to 16%. In total, the presence of PDF-modulated macrophages induced a 60–65% depression in the key activation parameters of T killers, confirming that myeloid cells acquired pronounced immunosuppressive properties.

Застосування молекулярно-спрямованих модулаторів дозволило встановити терапевтичні вектори відновлення Т-клітинної відповіді. Блокада CSF1R або CCR2 у мікрооточенні макрофагів частково нівелювала їхній супресивний вплив на лімфоцити, що проявилось значущим відновленням експресії CD69 (до 34% та 31% відповідно), помірним підвищенням секреції IFN- γ (понад 500 пг/мл) та частково нормалізацією вмісту гранзиму В (до 28–30%). Максимальний захисний та репрограмувальний ефект зафіксовано у групі з використанням агоніста CD40 – показники функціональної активності (CD69 – 42%, гранзим В – 36%) та літичного потенціалу CD8⁺ Т-клітин практично повністю повернулися до вихідних контрольних значень (табл. 2), а рівень продукції IFN- γ продемонстрував максимальне зростання – до 742 пг/мл.

Зміни у фенотипі та експресії літичних ферментів Т-клітин безпосередньо зумовлювали їхню здатність виконувати пряму протипухлинну функцію. У контрольних умовах (за відсутності макрофагів) активовані лімфоцити ефективно лізували ракові клітини підшлункової залози з медіаною активності 52%. Проте присутність макрофагів, сформованих під впливом PDF, призвела до різкого падіння протипухлинного ефекту та пригнічення кліренсу пухлинних клітин до 18% ($p < 0,001$, рис. 1). Натомість попереднє репрограмування макрофагів за допомогою агоніста CD40 або інгібіторів CSF1R/CCR2 (які забезпечили збереження гранзиму В на рівні 28–36%) дозволило запобігти супресії ефektorної ланки, відновлюючи пряму цитотоксичність Т-кілерів пропорційно до оновлення їхнього активаційного профілю.

The use of molecularly targeted modulators allowed for the determination of therapeutic vectors to restore the T-cell response. Blockade of CSF1R or CCR2 within the macrophage microenvironment partially neutralized their suppressive effect on lymphocytes, which was manifested by a significant restoration of CD69 expression (up to 34% and 31%, respectively), a moderate increase in IFN- γ secretion (exceeding 500 pg/ml), and a partial normalization of granzyme B content (up to 28–30%). The maximum protective and reprogramming effect was recorded in the group utilizing the CD40 agonist: functional activity parameters (CD69 – 42%, granzyme B – 36%) and the lytic potential of CD8⁺ T cells returned almost completely to the baseline control values (Table 2), while the level of IFN- γ production demonstrated peak growth, reaching 742 pg/ml.

Changes in the phenotype and expression of lytic enzymes in T cells directly determined their ability to exert direct antitumor function. Under control conditions (in the absence of macrophages), activated lymphocytes effectively lysed pancreatic cancer cells with a median activity of 52%. However, the presence of macrophages shaped under the influence of PDF led to a sharp decline in the antitumor effect and suppressed tumor cell clearance to 18% ($p < 0.001$, Fig. 1). Conversely, prior macrophage reprogramming using the CD40 agonist or CSF1R/CCR2 inhibitors (which maintained granzyme B levels at 28–36%) prevented the suppression of the effector arm, restoring the direct cytotoxicity of T killers proportionally to the renewal of their activation profile.

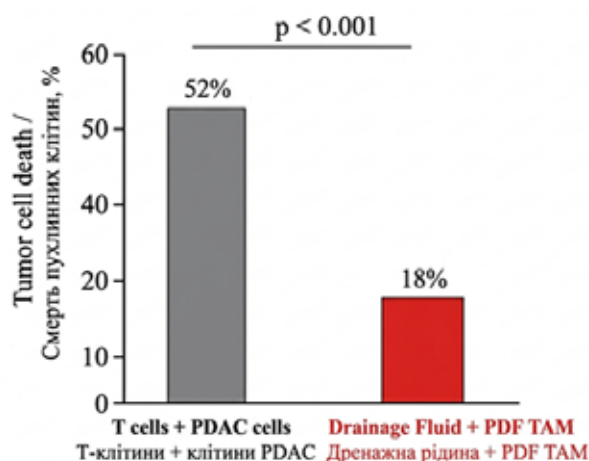


Рис. 1. Макрофаги, кондиційовані PDF, знижують клінг пухлинних клітин CD8⁺ Т-клітинами
Fig. 1. PDF-conditioned macrophages reduce tumor cell killing by CD8⁺ T cells

Для прямого молекулярного підтвердження факторів, що запускають імуносупресію, було проведено мультиплексний аналіз безклітинного супернатанту PDF (табл. 3). Дослідження виявило високі концентрації спектра медіаторів, що регулюють біологію міелоїдного ряду. Так, зафіксовано інтенсивне накопичення хемокіну CCL2 (медіана 1390 пг/мл), що створює потужний градієнт для рекрутування моноцитів із судинного русла в зону хірургічного втручання та узгоджується з терапевтичним ефектом блокади осі CCR2. Виявлено високі рівні макрофагального фактора CSF1 (824 пг/мл), який є

For direct molecular confirmation of the factors triggering immunosuppression, a multiplex analysis of the cell-free PDF supernatant was performed (Table 3). The study revealed high concentrations of a spectrum of mediators that regulate myeloid lineage biology. Specifically, intense accumulation of the chemokine CCL2 was recorded (median 1,390 pg/ml), which creates a potent gradient for recruiting monocytes from the vascular bed into the surgical site and aligns with the therapeutic effect of CCR2 axis blockade. High levels of the macrophage factor CSF1 were detected (824 pg/ml), which is essential for myeloid cell survival and their

есенціальним для виживання мієлоїдних клітин та їхнього диференціювання у просупресивному напрямку, що патогенетично обґрунтовує ефективність інгібітора CSF1R. Визначено значні концентрації класичних імуносупресивних цитокінів – трансформуючого фактора росту-бета (TGF- β – 970 пг/мл) та інтерлейкіну-10 (IL-10 – 186 пг/мл), синергічна дія яких блокує антигенпрезентуючу функцію та індукуює експресію смітєвих рецепторів. Накопичення гранулоцитарно-макрофагального фактора GM-CSF (94 пг/мл) на тлі різкого домінування супресивних молекул (CSF1 та IL-10) виступає додатковим чинником імунорегуляції в рановому ложі пухлини.

differentiation toward a pro-suppressive lineage, thus pathogenetically justifying the efficacy of the CSF1R inhibitor. Significant concentrations of classical immunosuppressive cytokines were determined– namely, transforming growth factor-beta (TGF- β – 970 pg/ml) and interleukin-10 (IL-10 – 186 pg/ml), whose synergistic action blocks antigen-presenting function and induces the expression of scavenger receptors. The accumulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF – 94 pg/ml) against the background of a sharp dominance of suppressive molecules (CSF1 and IL-10) acts as an additional immunoregulation factor within the tumor wound bed.

Таблиця 3. Рівні цитокінів у дренажній рідині
Table 3. Cytokine levels in drainage fluid

Цитокін / Cytokine	Медіана [Q1; Q3], пг/мл Median [Q1; Q3], pg/ml
CSF1	824 [610; 1050]
CCL2	1390 [1010; 1760]
IL-10	186 [120; 242]
TGF- β	970 [780; 1210]
GM-CSF	94 [61; 128]

Примітка:

значення наведено як медіана [Q1; Q3], пг/мл.

Note:

values are presented as median [Q1; Q3], pg/ml.

З метою з'ясування клінічного значення виявлених медіаторів проведено порівняльний аналіз їхнього вмісту залежно від поширеності неопластичного процесу. Встановлено, що концентрація хемокіну CCL2 у післяопераційному середовищі має прямий зв'язок з анатомічною стадією захворювання (табл. 4).

To elucidate the clinical significance of the identified mediators, a comparative analysis of their levels relative to the extent of the neoplastic process was performed. It was established that the concentration of the chemokine CCL2 in the postoperative environment is directly associated with the anatomical stage of the disease (Table 4).

Таблиця 4. Рівні CCL2 залежно від стадії пухлини
Table 4. CCL2 levels according to tumor stage

Стадія пухлини Tumor stage	CCL2, медіана [Q1; Q3], пг/мл CCL2, median [Q1; Q3], pg/ml	p
Стадія I–II / Stage I–II (n = 10)	1015 [820; 1220]	0.012*
Стадія III–IV / Stage III–IV (n = 14)	1620 [1310; 1980]	

Примітки:

значення наведено як медіана [Q1; Q3], пг/мл.

* Різниця статистично значуща при $p < 0.05$.

Notes:

values are presented as median [Q1; Q3], pg/ml.

* Statistically significant difference at $p < 0.05$.

У пацієнтів із поширеними та метастатичними формами ПАПЗ (III–IV стадії, n = 14) зафіксовано статистично значуще підвищення концентрації CCL2 до 1620 пг/мл порівняно з хворими на ранні (I–II) стадії процесу (n = 10), де медіана становила 1015 пг/мл ($p = 0,012$). Отримані дані свідчать про існування чіткого зв'язку між вираженістю макрофаг-рекрутуючих сигналів у післяопераційному середовищі ранового ложа та більш агресивними клініко-патологічними характеристиками первинного пухлинного процесу. Вищий рівень CCL2 при пізніх стадіях ПАПЗ може відображати біологічну агресивність пухлини, яка навіть після її радикального або паліативного видалення продовжує системно та локально індукувати інтенсивні імуносупресивні та хемотаксичні сигнали.

In patients with advanced and metastatic forms of PDAC (stages III–IV, n = 14), a statistically significant increase in CCL2 concentration up to 1,620 pg/ml was recorded, compared to patients with early stages of the disease (stages I–II, n = 10), where the median was 1,015 pg/ml ($p = 0.012$). These findings indicate a clear association between the intensity of macrophage-recruiting signals in the postoperative environment of the wound bed and more aggressive clinico-pathological characteristics of the primary tumor process. Higher CCL2 levels in late-stage PDAC may reflect the biological aggressiveness of the tumor, which, even after its radical or palliative resection, continues to systemically and locally induce intense immunosuppressive and chemotactic signals.

У сукупності наведені результати комплексного дослідження демонструють, що післяопераційна дренажна рідина у хворих на ПАПЗ є функціонально активним біологічним середовищем. Вона містить високі концентрації імунорегуляторних молекул (CSF1, CCL2, TGF- β , IL-10), які синергічно сприяють формуванню імуносупресивного, пропухлинного фенотипу макрофагів (CD163 та CD206) у ранньому післяопераційному періоді.

Набуваючи таких властивостей під дією факторів ранового ложа, макрофаги чинять вторинний негативний вплив на адаптивну ланку імунітету. Вони глибоко пригнічують активаційний потенціал (CD69), цитокинову продукцію (IFN- γ) та літичний апарат (гранзим В) ефektorних CD8⁺ Т-клітин, що призводить до зниження ефективності протипухлинної цитотоксичної відповіді. При цьому потужність хемотаксичного стимулу (CCL2) прогресує пропорційно до тяжкості та стадії пухлинного процесу. Водночас продемонстрована нами можливість репрограмування системи за допомогою фармакологічного таргетування осей CSF1R та CCR2, а також прямої імуноактивації через сигнальний шлях CD40, обґрунтовує високу пластичність міелоїдних клітин. Ці дані вказують на те, що ранній післяопераційний період може розглядатися як критично важливе «терапевтичне вікно» для проведення спрямованої імунomodулювальної терапії з метою нейтралізації супресивного впливу чинників хірургічного ложа та профілактики виникнення локальних рецидивів і метастазів ПАПЗ.

Collectively, the presented results of this comprehensive study demonstrate that postoperative drainage fluid in PDAC patients is a functionally active biological medium. It contains high concentrations of immunoregulatory molecules (CSF1, CCL2, TGF- β , and IL-10) that synergistically promote the formation of an immunosuppressive, pro-tumorigenic macrophage phenotype (CD163 and CD206) in the early postoperative period.

Acquiring these properties under the influence of wound bed factors, macrophages exert a secondary negative impact on the adaptive arm of immunity. They profoundly suppress the activation potential (CD69), cytokine production (IFN- γ), and lytic machinery (granzyme B) of effector CD8⁺ T cells, leading to diminished efficiency of the antitumor cytotoxic response. Concurrently, the potency of the chemotactic stimulus (CCL2) progresses proportionally to the severity and stage of the neoplastic process. At the same time, the demonstrated feasibility of system reprogramming through pharmacological targeting of the CSF1R and CCR2 axes, as well as direct immunoactivation via the CD40 signaling pathway, substantiates the high plasticity of myeloid cells. These data indicate that the early postoperative period can be considered a critically important «therapeutic window» for targeted immunomodulatory therapy aimed at neutralizing the suppressive influence of surgical bed factors and preventing the occurrence of local recurrence and metastasis in PDAC.

ОБГОВОРЕННЯ

Протокова аденокарцинома підшлункової залози належить до пухлин із вираженою імуносупресією, у формуванні якої важливу роль відіграють клітини міелоїдного ряду, передусім макрофаги. Численні дослідження показали, що макрофаги є однією з провідних імунних популяцій у стромі ПАПЗ та сприяють підтриманню пухлинного росту, пригніченню адаптивної імунної відповіді та зниженню ефективності імунотерапії [6, 7, 8, 9].

У цьому дослідженні показано, що післяопераційна дренажна рідина, зібрана у хворих на ПАПЗ після резекції, здатна модулювати фенотип макрофагів у бік імуносупресивного профілю. Це проявлялося підвищенням експресії CD163 та CD206 і зниженням експресії CD80 та HLA-DR. Такий фенотип узгоджується з відомими характеристиками макрофагів, асоційованих із пухлинною прогресією та супресією Т-клітинної відповіді [6, 7, 8, 10].

Принципово важливо, що отримані результати слід інтерпретувати не як доказ того, що післяопераційна дренажна рідина є повним еквівалентом інтактного мікрооточення пухлини підшлункової залози, а як свідчення того, що вона відображає пацієнт-специфічне післяопераційне запальне та імунорегуляторне мікрооточення ложа пухлини. Після радикального хірургічного втручання у такому середовищі закономірно поєднуються сигнали тканинного ушкодження, загоєння рани, ангіогенезу та залишкові пухлин-асоційовані медіатори. Саме ця обставина, на нашу думку, пояснює здатність дренажної рідини зміню-

DISCUSSION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is classified among tumors with pronounced immunosuppression, in which myeloid-derived cells, particularly macrophages, play a critical role. Numerous studies have shown that macrophages are one of the predominant immune populations within the PDAC stroma, contributing to the maintenance of tumor growth, suppression of the adaptive immune response, and reduced efficacy of immunotherapy [6, 7, 8, 9].

In this study, we demonstrated that postoperative drainage fluid collected from PDAC patients following resection is capable of modulating the macrophage phenotype toward an immunosuppressive profile. This was manifested by an increased expression of CD163 and CD206 and a decreased expression of CD80 and HLA-DR. Such a phenotype is consistent with the known characteristics of macrophages associated with tumor progression and the suppression of T-cell responses [6, 7, 8, 9, 10].

It is fundamentally important to note that these results should not be interpreted as evidence that postoperative drainage fluid is a complete equivalent of the intact pancreatic tumor microenvironment. Rather, they indicate that it reflects a patient-specific postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment of the tumor bed. Following radical surgical intervention, such an environment naturally integrates signals of tissue injury, wound healing, and angiogenesis with residual tumor-associated mediators. In our view, it is this specific composition that explains the ability

вати фенотип і функцію імунних клітин у ранньому післяопераційному періоді.

Наші результати також демонструють, що макрофаги, попередньо інкубовані з дренажною рідиною, пригнічують активацію CD8⁺ Т-клітин, знижують продукцію інтерферону- γ , експресію гранзиimu В та ефективність цитотоксичного знищення пухлинних клітин. Це свідчить про функціональну значущість виявлених фенотипових змін і вказує на потенційну участь післяопераційного локального середовища у формуванні тимчасового вікна імуносупресії після операції [16, 17].

Суттєвим результатом дослідження стало виявлення у дренажній рідині високих концентрацій CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β та GM-CSF – медіаторів, які відомі як регулятори рекрутування, виживання та поляризації макрофагів. Виявлення цих факторів у післяопераційній дренажній рідині узгоджується з припущенням, що локальне післяопераційне мікросередовище може підтримувати формування імуносупресивного фенотипу мієлоїдних клітин. Особливої уваги заслуговує CCL2, вищі концентрації якого асоціювалися у нашому дослідженні з більш пізніми стадіями захворювання, що узгоджується з даними про патогенетичну роль осі CCL2/CCR2 у пухлинній прогресії [24].

Фармакологічне інгібування CSF1R та CCR2 частково послаблювало зсув макрофагів у бік імуносупресивного фенотипу, що свідчить про залучення відповідних сигнальних осей до механізмів дії дренажної рідини. Активація CD40, у свою чергу, частково відновлювала функціональну активність Т-клітин, що вказує на перспективність підходів, спрямованих на ремоделювання мієлоїдного компартмента у періопераційному періоді [22, 23].

Окремо слід підкреслити методологічне значення запропонованої *ex vivo* моделі. На відміну від стандартних систем, що використовують кондиційовані середовища пухлинних клітин або окремі рекомбінантні цитокіни, післяопераційна дренажна рідина є комплексним пацієнт-специфічним біологічним матеріалом. Вона не відтворює повністю інтактне доопераційне мікросередовище пухлини, однак дозволяє досліджувати реальні локальні сигнали, присутні у післяопераційному ложі пухлини, та їхній вплив на клітини імунної системи.

Серед обмежень дослідження слід відзначити відносно невелику кількість зразків, використання експериментальної моделі, а також відсутність прямого зіставлення дренажної рідини з іншими компонентами мікросередовища, зокрема пухлинною тканиною або парними зразками периферичної крові. Крім того, частина виявлених ефектів може бути пов'язана не лише з пухлин-асоційованими сигналами, а й із неспецифічними механізмами хірургічної травми та ранньої ранової відповіді. Саме тому отримані результати доцільно розглядати в контексті післяопераційного запального та імунорегуляторного мікросередовища, а не як повну модель усіх компонентів мікросередовища ПАПЗ.

Попри зазначені обмеження, результати дослідження розширюють уявлення про механізми післяопераційної імуносупресії при ПАПЗ і свідчать про потенційну придатність дренажної рідини як пацієнт-специфічної платформи для вивчення мієлоїдно-опосередкованих механізмів імунної регуляції та попереднього тестування імунотулювальних підходів.

of drainage fluid to alter the phenotype and function of immune cells during the early postoperative period.

Our results also demonstrate that macrophages pre-incubated with drainage fluid suppress CD8⁺ T-cell activation, reduce interferon- γ production and granzyme B expression, and decrease the efficiency of cytotoxic tumor cell killing. This highlights the functional significance of the observed phenotypic shifts and points to the potential involvement of the postoperative local environment in creating a temporal window of immunosuppression following surgery [16, 17].

A significant finding of this study was the detection of high concentrations of CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β , and GM-CSF in the drainage fluid – mediators known to regulate macrophage recruitment, survival, and polarization. The presence of these factors in the postoperative drainage fluid aligns with the hypothesis that the local postoperative microenvironment can sustain the formation of an immunosuppressive myeloid cell phenotype. CCL2 warrants particular attention, as its higher concentrations in our study were associated with more advanced stages of the disease, consistent with reports on the pathogenetic role of the CCL2/CCR2 axis in tumor progression [24].

Pharmacological inhibition of CSF1R and CCR2 partially attenuated the macrophage shift toward an immunosuppressive phenotype, indicating the involvement of these signaling axes in the mechanisms of action of the drainage fluid. Furthermore, CD40 activation partially restored T-cell functional activity, suggesting the potential of approaches aimed at remodeling the myeloid compartment during the perioperative period [22, 23].

The methodological value of the proposed experimental model deserves special emphasis. Unlike standard systems that utilize tumor cell-conditioned media or individual recombinant cytokines, postoperative drainage fluid serves as a complex, patient-specific biological material. While it does not fully replicate the intact preoperative tumor microenvironment, it allows for the investigation of real local signals present in the postoperative tumor bed and their impact on immune cells.

Among the limitations of this study are the relatively small sample size, the use of an experimental model, and the lack of direct comparison between the drainage fluid and other microenvironmental components, such as tumor tissue or paired peripheral blood samples. Additionally, some of the observed effects may be attributed not only to tumor-associated signals but also to non-specific mechanisms of surgical trauma and the early wound response. Therefore, it is appropriate to view these results within the context of the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment, rather than as a complete model of all PDAC microenvironmental components.

Despite these limitations, the results of this study expand our understanding of the mechanisms underlying postoperative immunosuppression in PDAC. They suggest that drainage fluid may serve as a patient-specific platform for studying myeloid-mediated mechanisms of immune regulation and for the preliminary testing of immunomodulatory approaches.

ВИСНОВКИ

У дослідженні показано, що післяопераційна дренажна рідина у хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози містить розчинні медіатори, здатні модулювати фенотип макрофагів у бік імуносупресивного профілю. Інкубація макрофагів із дренажною рідиною супроводжувалася підвищенням експресії CD163 та CD206 і зниженням експресії CD80 та HLA-DR. Макрофаги, попередньо інкубовані з дренажною рідиною, пригнічували активацію CD8⁺ Т-клітин та зменшували цитотоксичне знищення пухлинних клітин.

У післяопераційній дренажній рідині виявлено високі концентрації CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β та GM-CSF, що може пояснювати її здатність впливати на рекрутування та поляризацію клітин мієлоїдного ряду. Інгібування сигнальних шляхів CSF1R і CCR2 частково послаблювало імуносупресивну поляризацію макрофагів, тоді як активація CD40 частково відновлювала протипухлинні Т-клітинні реакції.

Отримані дані свідчать, що післяопераційна дренажна рідина може розглядатися як інформативне джерело факторів післяопераційного запального та імунорегуляторного мікрооточення ложа пухлини. Її використання в *ex vivo* моделях є перспективним підходом для дослідження механізмів післяопераційної імуносупресії та попередньої оцінки потенційних імуномодуляторних стратегій при ПАПЗ.

CONCLUSIONS

The study demonstrates that postoperative drainage fluid in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma contains soluble mediators capable of modulating the macrophage phenotype toward an immunosuppressive profile. Incubation of macrophages with drainage fluid was associated with increased expression of CD163 and CD206 and decreased expression of CD80 and HLA-DR. Macrophages pre-incubated with drainage fluid suppressed the activation of CD8⁺ T-cells and reduced the cytotoxic killing of tumor cells.

High concentrations of CSF1, CCL2, IL-10, TGF- β , and GM-CSF were detected in the postoperative drainage fluid, which may explain its ability to influence the recruitment and polarization of myeloid cells. Inhibition of the CSF1R and CCR2 signaling pathways partially attenuated the immunosuppressive polarization of macrophages, while CD40 activation partially restored antitumor T-cell responses.

The findings suggest that postoperative drainage fluid can be considered an informative source of factors representing the postoperative inflammatory and immunoregulatory microenvironment of the tumor bed. Its use in *ex vivo* models represents a promising approach for investigating the mechanisms of postoperative immunosuppression and for the preliminary evaluation of potential immunomodulatory strategies in PDAC.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024. Vol. 74, № 1. P. 12–49. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
2. Криворучко І., Лурін І., Красносельський М., Гончарова Н., Тамер А.Х., Нессонова М., та ін. Значення передопераційних рівнів біомаркерів TGF- β 1 і CA 19-9 у диференціації доброякісних і злоякісних новоутворень підшлункової залози. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2024. Т. 32, № 4. С. 428–447. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2024.428-447>
3. Криворучко І., Гончаров А., Івахно І., Гончарова Н., Антонов А. Визначення диференційно-діагностичних критеріїв протокової аденокарциноми підшлункової залози та хронічного панкреатиту на основі морфологічних змін. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2025. Т. 33, № 3. С. 285–296. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2025.285-296>
4. Гончарова Н., Криворучко І., Гончаров А., Нессонова М. Визначення діагностичного потенціалу методів дослідження при диференціації раку підшлункової залози та хронічного панкреатиту на засадах доказової медицини. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2023. Т. 31, № 3. С. 271–284. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2023.271-284>
5. Hartupce C., Nagalo B.M., Chabu C.Y., Tesfay M.Z., Coleman-Barnett J., West J.T., et al. Pancreatic cancer tumor microenvironment is a major therapeutic barrier and target. *Frontiers in Immunology*. 2024. Vol. 15. P. 1287459. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1287459>
6. Tang W., Wang X., Han B., Jiang S.H., Cao H. Tumor-associated macrophages in cancer: from mechanisms to application. *Molecular Biomedicine*. 2025. Vol. 6, № 1. P. 145. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00396-y>
7. Kloosterman D.J., Akkari L. Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. *Cell*. 2023. Vol. 186, № 8. P. 1627–1651. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.020>
8. Coulton A., Murai J., Qian D., Thakkar K., Lewis C.E., Litchfield K. Using a pan-cancer atlas to investigate tumour associated macrophages as regulators of immunotherapy response. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15, № 1. P. 5665. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49885-8>
9. Zhang Q., Tsui Y.M., Zhang V.X., Lu A.J., Lee J.M., Lee E., et al. Reciprocal interactions between malignant cells and macrophages enhance cancer stemness and M2 polarization in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. 2024. Vol. 14, № 2. P. 892–910. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.87962>

REFERENCES

1. Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024;74(1):12–49. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
2. Kryvoruchko I., Lurin I., Krasnoselskyi M., Honcharova N., Tamer A.H., Nessonova M., et al. Significance of preoperative levels biomarkers TGF- β 1 and CA 19-9 in distinguishing benign and malignant pancreatic neoplasms. *Ukrainian Journal of Radiology and Oncology*. 2024;32(4):428–47. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2024.428-447>
3. Kryvoruchko I., Honcharov A., Ivakhno I., Honcharova N., Antonov A. Determination of differential diagnostic criteria for pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis based on morphological changes. *Ukrainian Journal of Radiology and Oncology*. 2025;33(3):285–96. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2025.285-296>
4. Honcharova N., Kryvoruchko I., Honcharov A., Nessonova M. Determination of the diagnostic potential of research methods in the differentiation of pancreatic cancer and chronic pancreatitis based on evidence-based medicine. *Ukrainian Journal of Radiology and Oncology*. 2023;31(3):271–84. (in Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2023.271-284>
5. Hartupce C., Nagalo B.M., Chabu C.Y., Tesfay M.Z., Coleman-Barnett J., West J.T., et al. Pancreatic cancer tumor microenvironment is a major therapeutic barrier and target. *Frontiers in Immunology*. 2024;15:1287459. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1287459>
6. Tang W., Wang X., Han B., Jiang S.H., Cao H. Tumor-associated macrophages in cancer: from mechanisms to application. *Molecular Biomedicine*. 2025;6(1):145. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00396-y>
7. Kloosterman D.J., Akkari L. Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. *Cell*. 2023;186(8):1627–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.020>
8. Coulton A., Murai J., Qian D., Thakkar K., Lewis C.E., Litchfield K. Using a pan-cancer atlas to investigate tumour associated macrophages as regulators of immunotherapy response. *Nature Communications*. 2024;15(1):5665. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49885-8>
9. Zhang Q., Tsui Y.M., Zhang V.X., Lu A.J., Lee J.M., Lee E., et al. Reciprocal interactions between malignant cells and macrophages enhance cancer stemness and M2 polarization in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Theranostics*. 2024;14(2):892–910. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.87962>

10. Cortesi M., Zanon M., Pirini F., Tumedei M.M., Ravaioli S., Rapposelli I.G., et al. Pancreatic cancer and cellular senescence: tumor microenvironment under the spotlight. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 23, № 1. P. 254. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23010254>
11. Chen D., Xu L., Xuan M., Chu Q., Xue C. Unveiling the functional roles of patient-derived tumour organoids in assessing the tumour micro-environment and immunotherapy. *Clinical and Translational Medicine*. 2024. Vol. 14, № 9. P. e1802. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctm2.1802>
12. Sumiyoshi T., Uemura K., Shintakuya R., Okada K., Baba K., Harada T., et al. Prognostic impact of peritoneal washing cytology in patients with biliary tract cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2024. Vol. 409, № 1. P. 45. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00423-024-03233-y>
13. Lee Y.S., Kim H.S., Cho Y., Lee I.J., Kim H.J., Lee D.E., et al. Intraoperative radiation therapy induces immune response activity after pancreatic surgery. *BMC Cancer*. 2021. Vol. 21, № 1. P. 1097. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08807-3>
14. Tarek A., El-Sayed S.K., Woodward W.A., El-Shinawi M., Hirshon J.M., Mohamed M.M. Inflammatory breast cancer: the cytokinome of post-mastectomy wound fluid augments proliferation, invasion, and stem cell markers. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022. Vol. 44, № 6. P. 2730–2744. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb44060187>
15. Kulcenty K., Piotrowski I., Wróblewska J.P., Wasiewicz J., Suchorska A.W.M. The composition of surgical wound fluids from breast cancer patients is affected by intraoperative radiotherapy treatment and depends on the molecular subtype of breast cancer. *Cancers*. 2019. Vol. 12, № 1. P. 11. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12010011>
16. Chick R.C., Pawlik T.M. Updates in immunotherapy for pancreatic cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2024. Vol. 13, № 21. P. 6419. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm13216419>
17. Mansouri S., Daniel L., Amhis N., Leveille M., Boudreau J.E., Alkayyal A.A., et al. Perioperative oncolytic virotherapy to counteract surgery-induced immunosuppression and improve outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2023. Vol. 13. P. 1071751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1071751>
18. Amin M.B., Edge S.B., Greene F.L., Brookland R.K., Washington M.K., Gershenwald J.E., et al. AJCC Cancer Staging System. 9th version. *American Joint Committee on Cancer*, 2023. URL: <https://www.facs.org/quality-programs/cancer-programs/american-joint-committee-on-cancer/version-9/>
19. Pancreatic Adenocarcinoma (Version 2.2024): NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / National Comprehensive Cancer Network. Plymouth Meeting: NCCN, 2024. (Date of access: 26.03.2026). URL: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1455>
20. Haanen J., Obeid M., Spain L., Carbonnel F., Wang Y., Robert C., et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2022. Vol. 33, № 12. P. 1217–1238. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.001>
21. Nagtegaal I.D., Odze R.D., Klimstra D., Paradis V., Rugge M., Schirmacher P., et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020. Vol. 76, № 2. P. 182–188. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.13975>
22. Wattenberg M.M., Coho H., Herrera V.M., Graham K., Stone M.L., Xue Y., et al. Cancer immunotherapy via synergistic coactivation of myeloid receptors CD40 and Dectin-1. *Science Immunology*. 2023. Vol. 8, № 89. P. ead5097. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ad5097>
23. O'Hara M.H., O'Reilly E.M., Varadhachary G., Wolff R.A., Wainberg Z.A., Ko A.H., et al. CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *The Lancet Oncology*. 2021. Vol. 22, № 1. P. 118–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30532-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30532-5)
24. Fei L., Ren X., Yu H., Zhan Y. Targeting the CCL2/CCR2 axis in cancer immunotherapy: one stone, three birds? *Frontiers in Immunology*. 2021. Vol. 12. P. 771210. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.771210>
10. Cortesi M., Zanon M., Pirini F., Tumedei M.M., Ravaioli S., Rapposelli I.G., et al. Pancreatic cancer and cellular senescence: tumor microenvironment under the spotlight. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;23(1):254. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23010254>
11. Chen D., Xu L., Xuan M., Chu Q., Xue C. Unveiling the functional roles of patient-derived tumour organoids in assessing the tumour micro-environment and immunotherapy. *Clinical and Translational Medicine*. 2024;14(9):e1802. DOI: <https://doi.org/10.1002/ctm2.1802>
12. Sumiyoshi T., Uemura K., Shintakuya R., Okada K., Baba K., Harada T., et al. Prognostic impact of peritoneal washing cytology in patients with biliary tract cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2024;409(1):45. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00423-024-03233-y>
13. Lee YS, Kim HS, Cho Y, Lee IJ, Kim HJ, Lee DE, et al. Intraoperative radiation therapy induces immune response activity after pancreatic surgery. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1097. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08807-3>
14. Tarek A, El-Sayed SK, Woodward WA, El-Shinawi M, Hirshon JM, Mohamed MM. Inflammatory breast cancer: the cytokinome of post-mastectomy wound fluid augments proliferation, invasion, and stem cell markers. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022;44(6):2730–44. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb44060187>
15. Kulcenty K, Piotrowski I, Wróblewska JP, Wasiewicz J, Suchorska AWM. The composition of surgical wound fluids from breast cancer patients is affected by intraoperative radiotherapy treatment and depends on the molecular subtype of breast cancer. *Cancers*. 2019;12(1):11. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12010011>
16. Chick RC, Pawlik TM. Updates in immunotherapy for pancreatic cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2024;13(21):6419. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm13216419>
17. Mansouri S, Daniel L, Amhis N, Leveille M, Boudreau JE, Alkayyal AA, et al. Perioperative oncolytic virotherapy to counteract surgery-induced immunosuppression and improve outcomes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1071751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1071751>
18. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, et al. AJCC Cancer Staging System. 9th version. *American Joint Committee on Cancer*, 2023. URL: <https://www.facs.org/quality-programs/cancer-programs/american-joint-committee-on-cancer/version-9/>
19. Pancreatic Adenocarcinoma (Version 2.2024): NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology / National Comprehensive Cancer Network. Plymouth Meeting: NCCN; 2024. (Date of access: 26.03.2026). URL: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1455>
20. Haanen J, Obeid M, Spain L, Carbonnel F, Wang Y, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2022;33(12):1217–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.001>
21. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.13975>
22. Wattenberg MM, Coho H, Herrera VM, Graham K, Stone ML, Xue Y, et al. Cancer immunotherapy via synergistic coactivation of myeloid receptors CD40 and Dectin-1. *Science Immunology*. 2023;8(89):ead5097. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ad5097>
23. O'Hara MH, O'Reilly EM, Varadhachary G, Wolff RA, Wainberg ZA, Ko AH, et al. CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M sotigalimab and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *The Lancet Oncology*. 2021;22(1):118–31. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30532-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30532-5)
24. Fei L, Ren X, Yu H, Zhan Y. Targeting the CCL2/CCR2 axis in cancer immunotherapy: one stone, three birds? *Frontiers in Immunology*. 2021;12:771210. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.771210>

Обмеження дослідження

Limitations of the study

Автори рукопису свідомо засвідчують, що представлене дослідження має кілька внутрішніх обмежень, зумовлених його дизайном, методологічним планом та практичним виконанням. Робота має обсерваційний ретроспективний характер і виконана на базі двох хірургічних центрів України (Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України та Комунального некомерційного підприємства «Київський міський клінічний онкологічний центр»). Хоча залучення двох клінічних баз дещо розширює географію, дослідження де-факто залишається обмеженим специфікою маршрутизації пацієнтів та поточними стандартами надання допомоги при ПАПЗ в Україні, що може впливати на переносимість результатів для інших європейських чи світових популяцій. Клінічна

The authors acknowledge that the presented study has several inherent limitations related to its design, methodological framework, and practical execution. This study is observational and retrospective, utilizing clinical materials collected from two surgical centers in Ukraine (Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine and the Communal non-commercial enterprise «Kyiv City Clinical Oncology Center»). Although involving two clinical sites broadens the geographical scope, the study is inherently constrained by specific regional patient pathways and current healthcare delivery practices for PDAC in Ukraine. This may limit the generalizability of the findings to other European or global populations. Furthermore, the clinical sample size is relatively modest (N=34 patients, with subsets of 20 and 24 samples

вибірка є відносно невеликою ($N = 34$ пацієнти, з яких лише підгрупи у 20 та 24 зразки були використані для фінальних етапів цитокинового профілювання та імунологічного ко-культивування відповідно), що обмежує статистичну точність оцінок. Незважаючи на застосування строгих критеріїв включення/виключення (наприклад, виключення пацієнтів із супутніми інфекціями чи ранніми хірургічними ускладненнями для запобігання спотворенню цитокинового профілю PDF), ретроспективний аналіз апіорі зберігає ризик селекційного зміщення. Застосування непараметричних критеріїв (Манна–Вітні, Краскела–Уолліса з пост-хок тестом Данна) дозволило адекватно оцінити гіпотези для розподілу, який відхилився від нормального, проте повністю нівелювати потенційний вплив прихованих змішувальних чинників без проведення проспективного рандомізованого дослідження не уявляється можливим. Експериментальна частина спирається на пацієнт-специфічні *in vitro* моделі ко-культивування моноцитарних макрофагів здорових донорів ($n = 30$) та первинних пухлинних клітин ПАПЗ (1–3 пасажі) під впливом 20–30% об'єму PDF. Попри високий ступінь стандартизації процесів (співпраця з Biobank Graz та Українською асоціацією біобанків, використання FMO-контролів та щоденне калібрування CS&T), двовимірне (2D) клітинне ко-культивування *in vitro* є спрощеним відображенням живого пухлинного мікрооточення і не може повністю відтворити складні тривимірні архітектонічні та системні імунологічні взаємодії, що відбуваються в організмі пацієнта в ранньому післяопераційному періоді. Для мінімізації зазначених впливів та забезпечення надійності даних нами було впроваджено жорсткий внутрішньолабораторний контроль: стандартизовано протоколи ферментативного дисоціювання та магнітної сепарації CD14⁺ моноцитів (із досягненням чистоти фракції понад 95% та життєздатності макрофагів понад 90%), а також автоматизовано компенсацію спектрів на цитометрі за допомогою чоток BD CompBeads. Узагальненість висновків наразі обмежена контекстом дослідження. Остаточне підтвердження виявленої патогенетичної ролі осей CSF1R та CCR2, а також терапевтичного потенціалу CD40-імуноактивації потребує подальших проспективних мультицентрових клінічних випробувань із чітким розрахунком статистичної потужності та суворим дотриманням стандартів Належної клінічної практики (GCP).

utilized for the final cytokine profiling and immunological co-culture assays, respectively), which inherently constrains the statistical precision of the estimates. Despite implementing stringent inclusion and exclusion criteria (e.g., excluding patients with concurrent systemic infections or early post-operative surgical complications to prevent confounding of the PDF cytokine profile), the retrospective nature of the analysis carries a baseline risk of selection bias. While non-parametric methods (Mann–Whitney U and Kruskal–Wallis tests followed by Dunn's post-hoc adjustment) were appropriately employed to handle data deviating from a normal distribution, completely eliminating the potential impact of latent confounding factors remains unfeasible without a prospective randomized trial design. The experimental phase relies on patient-specific *in vitro* co-culture models combining healthy donor-derived ($n=30$) monocyte-macrophages and primary PDAC cells (passages 1–3) exposed to a 20–30% volume fraction of PDF. Despite a high level of process standardization – facilitated by scientific cooperation with the Biobank Graz and the Ukrainian Association of Biobanks, the mandatory use of FMO controls, and daily instrument verification using CS&T beads – two-dimensional (2D) *in vitro* co-cultures represent a simplified surrogate of the live tumor microenvironment. Consequently, they cannot fully replicate the complex three-dimensional tissue architecture and systemic physiological immune interactions occurring within the surgical wound bed *in vivo* during the early postoperative window. To mitigate these limitations and ensure data robustness, rigorous quality control measures were integrated into the laboratory workflow. These included strict standardization of enzymatic dissociation and magnetic bead isolation protocols (achieving a CD14⁺ fraction purity greater than 95% and macrophage viability greater than 90%), alongside automated fluorescence compensation using BD CompBeads. In conclusion, the generalizability of the current findings is context-bound. Definitive validation of the identified pathogenic role of the CSF1R and CCR2 signaling axes, as well as the therapeutic potential of CD40-mediated immunoactivation, warrants future prospective, multicenter clinical trials incorporating rigorous power calculations and strict adherence to Good Clinical Practice (GCP) guidelines.

Перспективи подальших досліджень

Prospects for further research

Подальші дослідження будуть спрямовані на глибоке молекулярне профілювання розчинних медіаторів у складі післяопераційної дренажної рідини, зокрема за допомогою мультиплексного аналізу цитокинів та екзосомального секвенування. Це дозволить ідентифікувати ключові драйвери імуносупресії, що є критичним для розробки нових терапевтичних мішеней. Важливим напрямком є валідація прогностичної цінності складу дренажної рідини та її кореляція з клінічними наслідками, такими як швидкість рецидивування та загальна виживаність пацієнтів із протоковою аденокарциномою підшлункової залози. Крім того, інтеграція цієї моделі у складні 3D-системи органοїдів та «пухлин-на-чипі» відкриває перспективи для створення персоналізованих платформ *ex vivo*, що дозволять оцінювати індивідуальну відповідь пацієнтів на новітні стратегії імунотерапії.

Future research will focus on the comprehensive molecular profiling of soluble mediators within postoperative drainage fluid, utilizing multiplex cytokine assays and exosomal sequencing. This will enable the identification of key drivers of immunosuppression, which is critical for the development of novel therapeutic targets. A vital objective is the validation of the prognostic value of drainage fluid composition and its correlation with clinical outcomes, such as recurrence rates and overall survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. Furthermore, integrating this model into sophisticated 3D organoid systems and «tumor-on-a-chip» platforms offers the potential to create personalized *ex vivo* platforms for evaluating individual patient responses to next-generation immunotherapeutic strategies.

Конфлікт інтересів

Conflict of interest

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

The authors declare that they have no competing interests. All authors have contributed equally to this work. All authors read and approved the final manuscript.

Дотримання етичних норм

Ethics statement

Автори рукопису свідомо засвідчують, що дослідження проводилось з використанням даних первинної медичної документації та включало клінічні спостереження за пацієнтами. Дослідження проведено відповідно до етичних стандартів Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини, директиви Європейського товариства 86/609 про участь людей у медико-біологічних дослідженнях, а також наказу Міністерства охорони здоров'я України № 690 від 23.09.2009 р. Інформована згода на участь у дослідженні була отримана від усіх учасників після надання їм зрозумілої, повної та доступної інформації про мету, дизайн і методологію дослідження, його потенційні ризики, очікувані переваги та можливі альтернативи. Усі учасники підтвердили свою добровільну участь шляхом підписання документа про інформовану згоду. Дослідження виконувалося в рамках ліцензованої діяльності біобанку відповідно до законодавства України (ліцензія Міністерства охорони здоров'я України на діяльність із біобанкування пуповинної крові та інших клітин і тканин людини). Біологічні матеріали (заморожені тканини, парафінові блоки, сироватка та плазма крові) зберігалися в Українській асоціації біобанків. Кожен біологічний зразок був отриманий відповідно до підписаної інформованої згоди. Протокол дослідження був схвалений Комітетом з етики Української асоціації біобанків (Висновок № 1206-17/23).

The authors hereby certify that the study was conducted using primary medical documentation and included clinical observations of patients. The research was carried out in accordance with the ethical standards of the World Medical Association Declaration of Helsinki on ethical principles for medical research involving human subjects, EU Directive 86/609 on the protection of animals used for scientific purposes (as applicable to biomedical research contexts), and Order No. 690 of the Ministry of Health of Ukraine dated September 23, 2009. Informed consent was obtained from all participants after they were provided with clear, comprehensive, and accessible information regarding the study's aim, design, methodology, potential risks, expected benefits, and possible alternatives. All participants confirmed their voluntary participation by signing an informed consent form.

The study was performed within the framework of the biobank's licensed activities in accordance with Ukrainian legislation (License from the Ministry of Health of Ukraine for biobanking of umbilical cord blood and other human cells and tissues). Biological materials (frozen tissues, paraffin blocks, serum, and plasma) were stored at the Ukrainian Association of Biobanks. Each biological sample was obtained following the signing of an informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Ukrainian Association of Biobanks (Approval No. 1206-17/23).

Використання штучного інтелекту

Use of artificial intelligence

Автори рукопису свідомо засвідчують, що у процесі проведення дослідження та підготовки цього рукопису не використовували жодних інструментів або сервісів генеративного штучного інтелекту для виконання будь-яких завдань, перелічених у Таксономії делегування завдань генеративному штучному інтелекту (GAIDeT, 2025 р). Усі етапи роботи – від концептуалізації до фінального редагування – виконані без залучення генеративного штучного інтелекту, виключно авторами.

The authors of this manuscript hereby certify that no generative artificial intelligence (AI) tools or services were utilized during the research process or the preparation of this manuscript to perform any tasks listed in the Generative AI Task Delegation Taxonomy (GAIDeT, 2025). All stages of the work – from conceptualization to final editing – were conducted exclusively by the authors without the involvement of generative AI.

Первинні дані та матеріали

Data availability statement

Автори рукопису свідомо засвідчують, що у роботі використано результати власних клінічних досліджень, що були систематизовані та проаналізовані авторами. Первинні дані включають узагальнені показники пацієнтів, лабораторні результати, протоколи та отримані кількісні характеристики. Усі матеріали збережені в архіві дослідницької групи та можуть бути надані за обґрунтованим запитом до автора-кореспондента, з урахуванням вимог конфіденційності та етичних норм.

The authors hereby certify that this work utilizes original clinical research data, which was systematically collected and analyzed by the authors. The primary data include aggregated patient metrics, laboratory results, research protocols, and obtained quantitative characteristics. All materials are stored in the research group's archives and can be made available upon reasonable request to the corresponding author, subject to confidentiality requirements and ethical standards.

Інформація про фінансування

Funding information

Фінансування видатками Державного бюджету України. Стаття є фрагментом науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України «Розробка діагностичних методів і відкритих та мініінвазивних технологій лікування захворювань та травм органів грудної та черевної порожнини, судин кінцівок у хворих у військовий час», номер державної реєстрації № 0124U002908, шифр теми: НТІ: 76.29.39, прикладна, термін виконання: 2024–2028 рр. Дослідження проведено в межах ліцензованої діяльності біобанку відповідно до законодавства України – ліцензії Міністерства охорони здоров'я України на біобанкінг пуповинної крові та інших клітин і тканин людини.

This study was funded by the State Budget of Ukraine. The article is part of the research project of Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine titled: «Development of diagnostic methods and open and minimally invasive technologies for the treatment of diseases and injuries of the thoracic and abdominal organs, and limb vessels in patients during wartime» (State Registration No. 0124U002908; Project Code: НТІ: 76.29.39; Applied Research; project duration: 2024–2028). The study was conducted within the framework of the biobank's licensed activities in accordance with Ukrainian legislation (License of the Ministry of Health of Ukraine for biobanking of umbilical cord blood and other human cells and tissues).

Біологічні матеріали, зокрема заморожені тканини, парафінові блоки, зразки сироватки та плазми, зберігалися в Українській асоціації біобанків. Кожен біологічний зразок було отримано відповідно до підписаної форми інформованої згоди. Протокол дослідження схвалено Комітетом з етики Української асоціації біобанків (№ 1206-17/23).

Biological materials (frozen tissues, paraffin blocks, serum, and plasma samples) were stored at the Ukrainian Association of Biobanks. Each biological specimen was collected in accordance with a signed informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Ukrainian Association of Biobanks (Approval No. 1206-17/23).

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Криворучко Ігор Андрійович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри хірургії № 2 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

е-mail: iryvoruchko60@gmail.com
тел.: +38 (050) 301-90-90

Внесок автора: планування дослідження, його дизайну, узагальнення результатів отриманих даних та підготовка статті до друку.

Граматюк Світлана Миколаївна – кандидат медичних наук, Президент Української асоціації біобанків, завідувачка департаменту біотехнології; вул. Нойє Штіфтингталштрассе, буд. 2, м. Грац, Австрія, 8010;

е-mail: gramatyuk@ukrainebiobank.com
тел.: +38 (099) 154-91-44

Внесок автора: планування дослідження, розробка дизайну, узагальнення отриманих результатів та підготовка статті до публікації.

Іванова Юлія Вікторівна – доктор медичних наук, професор, професор кафедри хірургії № 1 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

е-mail: dr.ivanova23@gmail.com
тел.: +38 (067) 475-74-20

Внесок автора: аналіз, узагальнення результатів отриманих даних та підготовка рукопису до друку.

Гончарова Наталя Миколаївна – доктор медичних наук, професор кафедри хірургії № 2 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

е-mail: drhoncharova@gmail.com
моб.: +38 (063) 811-98-60

Внесок автора: узагальнення результатів отриманих даних, їх статистична обробка та підготовка статті до друку.

Kryvoruchko Igor Andriyovych – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Surgery No 2 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4 Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

е-mail: ikryvoruchko60@gmail.com
tel.: +38 (050) 301-90-90

Author's contribution: planning of the study, its design, summary of the results of the data obtained and preparation of the article for publication.

Gramatiuk Svetlana Mykolaivna – Candidate of Medical Sciences, President Ukraine Association of Biobank, Head of Biotechnology Department; 2 Neue Stiftingtalstraße, Graz, Austria, 8010;

е-mail: gramatyuk@ukrainebiobank.com
tel.: +38 (099) 154-91-44

Author's contribution: planning of the study, its design, summary of the results of the data obtained and preparation of the article for publication.

Ivanova Yulia Viktorivna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Surgery No. 1 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4 Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

е-mail: dr.ivanova23@gmail.com
tel.: +38 (067) 475-74-20

Author's contribution: analysing and summarising the data and preparing the manuscript for publication.

Honcharova Natalia Mykolayivna – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Surgery No 2 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4 Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

е-mail: drhoncharova@gmail.com
tel.: +38 (063) 811-98-60

Author's contribution: generalization of the results of the obtained data, their statistical processing and preparation of the article for publication.

Мамонтов Іван Миколайович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри хірургії № 5 Харківського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України; просп. Науки, буд. 4, м. Харків, Україна, 61022;

е-mail: ivan.n.mamontov@gmail.com
тел.: +38 (050) 939-53-21

Внесок автора: концепція та дизайн дослідження, аналіз даних, збір матеріалу.

Харченко Катерина Володимирівна – доктор медичних наук, завідувачка відділення малоінвазивної хірургії Комунального некомерційного підприємства «Київський міський клінічний онкологічний центр», доцент кафедри хірургії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського Національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України; Вознесенський узвіз, буд. 22, м. Київ, Україна, 40053;

е-mail: k.kharchenko@ukr.net
тел.: +38 (099) 300-70-53

Внесок автора: набір клінічного матеріалу, редагування статті.

Mamontov Ivan Mykolaiovych – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Department Surgery No. 5 of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine; 4 Nauky Ave., Kharkiv, Ukraine, 61022;

е-mail: ivan.n.mamontov@gmail.com
tel.: +38 (050) 939-53-21

Author's contribution: concept and design of the research, data analysis, collection of the material.

Kharchenko Kateryna Volodymyrivna – Doctor of Medical Sciences, Head of minimal invasive surgery in Communal non-commercial enterprise «Kyiv City Clinical Oncology Center», Associate Professor of the Department of Surgery in Biology and Medicine Institute Science Educational Center of Taras Shevchenko National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine; 22 Voznesenskyi Uzviz, Kyiv, Ukraine, 40053;

е-mail: k.kharchenko@ukr.net
tel.: +38 (099) 300-70-53

Author's contribution: collection of clinical material, editing of the manuscript.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
30.03.2026

Отримано після рецензування
Received after review
19.04.2026

Прийнято до друку
Accepted for printing
09.06.2026

Опубліковано
Published
30.06.2026