

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σήμερα παγκοσμίως τη συχνότερη κακοήγη νόσο και την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες. Η κλινική του πορεία και η πρόγνωση δεν εμφανίζουν ομοιογενείς χαρακτήρες αλλά απεναντίας παρουσιάζουν μια αξιοσημείωτη ετερογένεια. Αυτή η ετερογένεια είναι πλέον αποδεκτό ότι δεν εξηγείται πλήρως από τους καθιερωμένους παθολογοανατομικούς και μοριακούς δείκτες που για πολλά χρόνια χρησιμοποιούνται από τους παθολογοανατόμους και τους κλινικούς γιατρούς, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός κακοήθειας (grade) και η κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων και του HER2. Η σύγχρονη ογκολογική έρευνα αναγνωρίζει πλέον ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor Microenvironment - TME), δηλαδή αυτό το ιδιαίτερα σύνθετο οικοσύστημα που αποτελείται από μη-κακοήγη κύτταρα και το εξωκυττάριο δίκτυο, διαδραματίζει έναν ισάξια και πλέον καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση της βιολογικής πορείας της καρκινικής εξέλιξης. Έχουν πλέον αναγνωριστεί από πολυάριθμες σύγχρονες μελέτες πολλαπλές συνιστώσες του TME. Δύο από τις πλέον δυναμικές και κλινικά σημαντικές αυτές συνιστώσες αποτελούν η φλεγμονώδης αντίδραση, με σημαντικό εκπρόσωπο τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor-Associated Neutrophils - TANs), και η ινωτική αντίδραση, γνωστή ως δεσμοπλαστική αντίδραση του στρώματος (Desmoplastic Reaction - DR).

Η πλέον σύγχρονη βιβλιογραφία των τελευταίων ετών έχει επισημάνει τον διττό ρόλο των TANs, τα οποία, ανάλογα με τα μηνύματα-σήματα που δέχονται από το TME, μπορούν να πολωθούν σε δύο ξεχωριστούς και με αντικρουόμενους ρόλους φαινότυπους: είτε σε έναν αντι-ογκογόνο (N1) είτε σε έναν προ-ογκογόνο (N2) φαινότυπο. Στους περισσότερους από τους συμπαγείς όγκους που έχουν μελετηθεί έως σήμερα, προκύπτει ότι οι υψηλές πυκνότητες των TANs συσχετίζονται συχνότερα με δυσμενή πρόγνωση, μέσω εξειδικευμένων και σύνθετων μηχανισμών που προάγουν την αγγειογένεση, τη διήθηση, τη μετάσταση και την ανοσοκαταστολή. Από την άλλη πλευρά, η δεύτερη συνιστώσα του TME που αναφέραμε προηγουμένως, δηλαδή η ινωτική ή δεσμοπλαστική αντίδραση δεν είναι, επίσης, ένα φαινόμενο με ομοιογενείς χαρακτήρες στην πληθώρα των συμπαγών κακοήθων όγκων. Ο τύπος της δεσμοπλαστικής αντίδρασης, όπως αυτός περιγράφεται ιστολογικά από τον παθολογοανατόμο και συγκεκριμένα ένα χαρακτηριστικό αυτής, συγκεκριμένα η ωριμότητά της, έχει περιγραφεί ως ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για την καρκινική εξέλιξη. Αναλυτικότερα, το λεγόμενο "ανώριμο" ή "μυξοειδές" στρώμα, το οποίο είναι πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ και εμφανίζει χαλαρή υφή ή σύσταση, παρατηρείται συνηθέστερα σε πιο επιθετικούς όγκους. Αντίθετα, το περισσότερο "ώριμο" στρώμα, χαρακτηριζόμενο από πυκνή ινώδη σύσταση, αναπτύσσεται συχνότερα σε λιγότερο επιθετικούς καρκίνους. Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο των δύο αυτών συνιστωσών του TME στη βιολογική πορεία των συμπαγών όγκων. Ωστόσο, αυτό που παρατηρούμε είναι πως έως τώρα, ο μεγάλος όγκος της γνώσης των τελευταίων ετών αφορά τον ξεχωριστό και μεμονωμένο ρόλο αυτών των δύο παραμέτρων. Η σχέση μεταξύ των δύο αυτών παραμέτρων και η πιθανή λειτουργική τους συσχέτιση στο μικροπεριβάλλον του όγκου στον καρκίνο του μαστού παραμένει τελικά ένα σημαντικό αλλά σε μεγάλο βαθμό ανεξερευνήτο

επιστημονικό πεδίο, με σαφείς προεκτάσεις στην θεραπευτική αντιμετώπιση αυτού του τόσο συχνού καρκίνου.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι λοιπόν η διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας της πυκνότητας των TANs και της δεσμοπλαστικής αντίδρασης με το βαθμό κακοήθειας του όγκου στο διηθητικό καρκίνο του μαστού, επικεντρώνοντας ως επί το πλείστον στην ανάλυση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δύο αυτών παραμέτρων. Ξεκινάμε από μία κεντρική υπόθεση, η οποία είναι ότι υπάρχει μια αμφίδρομη-συνεργική σχέση μεταξύ της αυξημένης διήθησης του όγκου από TANs και της παρουσίας ενός ανώριμου ή μυξοειδούς στρώματος στο μικροπεριβάλλον του διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Αυτή η διερευνώμενη πιθανή συσχέτιση, εφόσον αποδειχθεί, θα μπορούσε, λοιπόν, να οριστεί ως μια υπογραφή επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής, μελετήθηκαν αναδρομικά 65 περιστατικά διηθητικού καρκινώματος του μαστού από το αρχειακό υλικό του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Γ.Ν.Θ. “Γεώργιος Παπανικολάου”. Ανασύρθηκαν από το αρχείο του εργαστηρίου οι ιστολογικές τομές των 65 περιστατικών που είχαν χρωσθεί με την κλασική χρώση της Παθολογικής Ανατομικής, την χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E). Στις εν λόγω τομές προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι που αφορούν τον όγκο: η πυκνότητα των TANs (καταμέτρηση των πολυμορφοπύρηνων σε 10 συνεχόμενα οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης, στα πλέον διηθημένα από φλεγμονώδη κύτταρα (TANs) σημεία-”Θερμά σημεία”-Hot spots), ο ιστολογικός τύπος του όγκου σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας του όγκου. Για τον τελευταίο, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nottingham. Πρόσθετες παράμετροι που μελετήθηκαν και καταγράφηκαν για τον κάθε όγκο είναι η παρουσία ή απουσία νέκρωσης και περινευριδικής διήθησης. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η ταξινόμηση της δεσμοπλαστικής αντίδρασης του κάθε μελετώμενου όγκου. Για το σκοπό αυτό, ορίστηκαν τρεις κατηγορίες οι οποίες βασίστηκαν στην αξιολόγηση της μορφολογίας του κολλαγόνου. Οι κατηγορίες αυτές είναι: 1) η ώριμη δεσμοπλαστική αντίδραση, 2) η χηλοειδούς τύπου (keloid-like) και 3) η μυξοειδής δεσμοπλαστική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για κάθε όγκο καταγράφηκαν, επίσης, πρόσθετες πληροφορίες που αφορούσαν την παρουσία ή απουσία έκφρασης των οιστρογονικών (ER) υποδοχέων, των προγεστερονικών (PR) υποδοχέων και του υποδοχέα HER2 (c-erbB2), οι οποίες προήλθαν από τις αντίστοιχες ιστολογικές εκθέσεις του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου. Οι μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση των υπό μελέτη συσχετίσεων είναι η χρήση μη παραμετρικών ελέγχων (Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis) και του ελέγχου Pearson χ^2 , με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας να ορίζεται στο $p < 0.05$.

Η πραγματοποίηση των στατιστικών ελέγχων οδήγησε στην ανάδειξη ορισμένων ισχυρών και στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων. Αναλυτικότερα, αναδείχθηκε μια σαφώς θετική συσχέτιση μεταξύ της υψηλής διήθησης του όγκου από TANs και του υψηλού βαθμού κακοήθειας, δηλαδή οι τιμές των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που σχετίζονται με τον όγκο βρήκαμε πως αυξάνονται κλιμακωτά από τους Grade 1 έως τους Grade 3 όγκους ($p < 0.001$). Επιπλέον, η εντονότερη διήθηση από TANs εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία περινευριδικής διήθησης ($p < 0.001$), την απουσία έκφρασης οιστρογονικών ($p = 0.016$)

υποδοχέων και προγεστερονικών ($p=0.044$) υποδοχέων, αλλά και τη θετική έκφραση του c-erbB2 ($p=0.038$). Σε ό,τι αφορά τη διερεύνηση της δεσμοπλαστικής αντίδρασης στο TME, παρατηρήσαμε μια οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτής με τον βαθμό κακοήθειας (Grade) του όγκου ($p=0.051$), δηλαδή τα Grade 3 καρκινώματα παρατηρήσαμε πως εμφανίζουν συχνότερα μυξοειδές στρώμα, ενώ τα Grade 1 καρκινώματα εμφανίζουν συχνότερα ώριμο δεσμοπλαστικό στρώμα. Το πλέον σημαντικό και συνάμα πρωτότυπο εύρημα της διατριβής ήταν η ισχυρή και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του βαθμού διήθησης των όγκων από τα TANs και του τύπου της δεσμοπλαστικής αντίδρασης, όπως αυτή καθορίστηκε ιστολογικά με βάση τις περιγραφόμενες ανωτέρω τρεις κατηγορίες. Αναλυτικότερα, παρατηρήσαμε ότι οι όγκοι με μυξοειδούς τύπου δεσμοπλαστική αντίδραση εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες πυκνότητες ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που σχετίζονται με τον όγκο συγκριτικά με τους όγκους που χαρακτηρίζονταν από ώριμο δεσμοπλαστικό στρώμα ($p=0.006$).

Εν κατακλείδι, η παρούσα διατριβή οδήγησε στο λίαν σημαντικό συμπέρασμα ότι η αυξημένη διήθηση ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που σχετίζονται με τον όγκο (TANs) και η ύπαρξη ενός ανώριμου, μυξοειδούς τύπου στρώματος αποτελούν τελικά δείκτες επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού, δεδομένου ότι παρατηρούμε πως συνδέονται με υψηλότερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας του καρκινώματος αλλά και επιπλέον δυσμενείς προγνωστικές παραμέτρους του όγκου, όπως είναι η παρουσία περινευρικής διήθησης. Το πλέον πρωτότυπο εύρημα της παρούσας διατριβής είναι η τεκμηρίωση μιας αλληλεπίδρασης και συσχέτισης μεταξύ αυτών των δύο παραμέτρων του μικροπεριβάλλοντος. Παρατηρούμε ότι η εντονότερη διήθηση από ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνια που σχετίζονται με τον όγκο (TANs) εμφανίζεται συχνότερα σε ένα μυξοειδές ανώριμο και όχι σε ένα πυκνό ινώδες, στρώμα, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή λειτουργική σχέση. Το μυξοειδές ανώριμο στρώμα ενδέχεται να προάγει και να συνθέτει ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον για την προσέλκυση και τη λειτουργία των προ-ογκογόνων ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που σχετίζονται με τον όγκο ενώ από την άλλη πλευρά, η αυξημένη συγκέντρωση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων που σχετίζονται με τον όγκο (TANs) και οι ουσίες που αυτά παράγουν, μπορεί τελικά να αναστέλλουν την ωρίμανση του στρώματος και να το κρατούν σε μια πιο "ρευστή" και τελικά περισσότερο επιθετική κατάσταση. Αυτή η αμφίδρομη σχέση φλεγμονής και δεσμοπλασίας στο TME φαίνεται πως καθίσταται ένας σημαντικότερος λειτουργικός μηχανισμός ο οποίος ενισχύει και προάγει την διαδικασία της καρκινικής εξέλιξης. Συμπερασματικά, μπορούμε να μιλάμε για έναν εν δυνάμει συνδυαστικό προγνωστικό δείκτη και ένας ελπιδοφόρο στόχο για πιθανές νέες μελλοντικές θεραπευτικές πρακτικές στον καρκίνο του μαστού.

ABSTRACT

Introduction and Background: Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy and the leading cause of cancer-related mortality among women worldwide, representing a major public health challenge. Its clinical course and

prognosis are characterized by significant heterogeneity, which cannot be fully explained by established clinicopathological and molecular markers alone, such as histological type, grade, and the status of hormone receptors (ER, PR) and HER2. Modern oncological research increasingly recognizes the tumor microenvironment (TME), the complex ecosystem comprising non-malignant cells and the extracellular matrix, as a pivotal determinant of tumor behavior. Two of the most dynamic and clinically relevant components of the TME are the inflammatory response, particularly the innate immune infiltrate represented by **Tumor-Associated Neutrophils (TANs)**, and the stromal fibrotic response, known as the **Desmoplastic Reaction (DR)**.

The existing literature has highlighted the dual role of TANs, which, depending on signals from the TME, can polarize into either an anti-tumoral (N1) or a pro-tumoral (N2) phenotype. In most established solid tumors, a high density of TANs has been associated with a poor prognosis, as these cells are known to promote angiogenesis, invasion, metastasis, and immunosuppression. Similarly, the desmoplastic reaction is not a uniform phenomenon. Its histological texture, specifically its maturation state, has emerged as a powerful prognostic factor. An "immature" or "myxoid" stroma, rich in hyaluronan with a loose structure, is linked to more aggressive tumors, in contrast to a mature, dense fibrous stroma. Despite the growing body of evidence for the individual prognostic significance of these two parameters, their interplay and potential functional relationship within the breast cancer microenvironment remain a significant and largely unexplored area of research.

Aim of the Study: The purpose of this doctoral thesis was to investigate the prognostic significance of TAN density and the histological type of the desmoplastic reaction in invasive breast cancer and, most importantly, to examine the correlation between them. The central hypothesis of this work is that a synergistic relationship exists between increased TAN infiltration and the presence of an immature stroma, and that this combination constitutes a powerful signature of aggressive biological behavior.

Materials and Methods: A retrospective cohort study was conducted on 65 cases of invasive breast carcinoma from the archival material of the pathology laboratory. Using standard Hematoxylin and Eosin (H&E) stained slides, the following parameters were evaluated: TAN density (by counting polymorphonuclear cells in ten high-power fields in inflammatory "hotspots"), histological type and Nottingham grade, the presence of necrosis, and perineural invasion. The desmoplastic reaction was classified into three categories based on collagen morphology: mature, keloid-like, and myxoid. Data regarding the expression of Estrogen Receptors (ER), Progesterone Receptors (PR), and HER2 were retrieved from the corresponding pathology reports. Statistical analysis to investigate correlations was performed using non-parametric tests (Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis) and the Pearson χ^2 test, with the level of statistical significance set at $p < 0.05$.

Results: The study revealed strong and statistically significant correlations. A clear positive correlation was observed between high TAN density and high histological grade, with neutrophil counts increasing progressively from Grade 1 to Grade 3 tumors ($p < 0.001$). High TAN infiltration was also significantly associated with the presence of perineural invasion ($p < 0.001$), negativity for estrogen ($p = 0.016$) and progesterone ($p = 0.044$) receptors, and positivity for c-erbB2 (HER2) ($p = 0.038$).

Regarding the desmoplastic reaction, a borderline significant association with histological grade was observed ($p=0.051$), with Grade 3 tumors more frequently exhibiting a myxoid stroma, while Grade 1 tumors predominantly showed a mature stroma. The most significant and novel finding of this thesis was the **strong and statistically significant correlation between TAN density and the type of desmoplastic reaction**. Specifically, tumors with a myxoid desmoplastic reaction showed significantly higher neutrophil infiltration compared to tumors with a mature stroma ($p=0.006$).

Conclusion: This thesis confirms that increased neutrophil infiltration (high TANs) and the presence of an immature, myxoid desmoplastic reaction are indicators of aggressive biological behavior in breast cancer, as they are associated with high histological grade and other adverse features. The most original finding is the evidence of a strong link between these two microenvironmental parameters. The observation that the densest neutrophil infiltration is found within a myxoid, rather than a dense fibrous, stroma suggests a potential synergistic pathogenetic relationship. An immature, hyaluronan-rich stroma may create a "permissive niche" that facilitates the recruitment and pro-tumoral function of TANs. Conversely, an intense neutrophil presence and the factors they secrete (e.g., proteases) may inhibit stromal maturation, maintaining it in a more "fluid" and invasion-conducive state. This interplay between inflammation and fibrosis within the TME appears to be a powerful mechanism promoting malignancy and emerges as a potentially important combined prognostic indicator and a promising target for future therapeutic interventions.