



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Χ. Σπηλιοπούλου

**«Στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος
στον καρκίνο του μαστού ως
προγνωστικός δείκτης»**

**Σοφόπουλος Μιχαήλ
Παθολογοανατόμος**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή γνώμων του συγγραφέα» (N 5343/32, ΦΕΚ 86Α/23-03-1932, άρθρο 202, παρ. 2)

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης εκπόνησης διατριβής: 25/07/2016

Ημερομηνία ορισμού θέματος και τριμελούς επιτροπής: 11/10/2016

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 18/11/2019

Ημερομηνία κρίσης διατριβής: 5/12/2019

Βαθμός: Άριστα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αν. Καθηγητής Δ. Βλαχοδημητρόπουλος (Επιβλέπων)

Αν. Καθηγήτρια Α. Νόννη

Καθηγήτρια Χ. Σπηλιοπούλου

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια Σπηλιοπούλου Χ.

Καθηγητής Μαρκόπουλος Χ.

Καθηγητής Καβαντζάς Ν.

Καθηγητής Λάζαρης Α.

Αν. Καθηγητής Βλαχοδημητρόπουλος Δ.

Αν. Καθηγήτρια Νόννη Α.

Αν. Καθηγητής Γούτας Ν.

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής Αθηνών Σφηκάκης Π.

Ιπποκρατικός όρκος

Πρωτότυπο

Όμνυμι Απόλλωνα ιητρών, καὶ Ἀσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωύτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λουπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπηίης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιπορκῶντι, τάναντία τουτέων.

Μετάφραση

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονεῖς μου και την κοινωὸ του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδελφια μου και να τους διδάσκω αυτή την τέχνη αν θέλουν να τη μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτόν και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιπορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

In memoriam
Professore Renzo Lodi

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή αυτής της διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους μου έδωσαν το έναυσμα να αρχίσω και στάθηκαν δίπλα μου κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τη σύζυγό μου (Κάλλη) που έμαθε κατά κάποιον τρόπο να ζει με την απουσία μου, τις ατελείωτες ώρες εργασίας στο εργαστήριο αλλά και τις φορές που έφερνα δουλειά στο σπίτι, τη μητέρα μου (Ντέμη) που πλέον των παραπάνω με βοήθησε και στην επιμέλεια της συγγραφής και τη μικρή Αιμιλία που όταν έγραφα αυτές τις γραμμές (αλλά και όλο το βιβλίο) με σκούνταγε για να παίξω μαζί της.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας» και ιδιαίτερα τη διευθύντρια Ν. Αρνογιαννάκη και τη Ν. Σωτηριάδου για την ουσιαστική μας συνεργασία κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους συνεργάτες μου από το Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας». Τον Κ. Μπαξεβάνη διευθυντή του Κέντρου που στήριξε ηθικά και έμπρακτα την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Τον Σ. Φόρτη με τον οποίο έχουμε δουλέψει ατελείωτες ώρες πάνω στις μελέτες που απαρτίζουν αυτήν τη διατριβή. Τον Χ. Βαξεβάνη που ανέλαβε τα στατιστικά και τη Σ. Περέζ που συντόνιζε τις μελέτες, την οποία και θεωρώ πνευματική μητέρα της εργασίας των τριτογενών λεμφικών δομών.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή Δ. Βλαχοδημητρόπουλο, για τον χρόνο που αφιέρωσε και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Στην καθηγήτρια Α. Νόννη για τις πολύτιμες συμβουλές της. Τέλος, ευχαριστώ την καθηγήτρια και διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α. Χ. Σπηλιοπούλου που με εμπιστεύτηκε, ως μη όφειλε, και μου έδωσε τη δυνατότητα να συνεργαστώ μαζί της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
ANATOMIA.....	4
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ.....	9
Μορφολογικοί χαρακτήρες.....	9
Κυτταρικοί πληθυσμοί και ανοσοϊστοχημικοί χαρακτήρες στο φυσιολογικό μαστικό παρέγχυμα και τη θηλή.....	12
ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	14
Σταδιοποίηση (Staging).....	14
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade).....	18
Ιστολογική ταξινόμηση.....	20
Μη διηθητικά/in situ καρκινώματα του μαστού.....	20
Διηθητικό καρκίνωμα μαστού.....	26
Ορμονικοί δείκτες.....	42
Ενίσχυση HER2.....	43
Ki67.....	45
Μοριακή ταξινόμηση.....	46
ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	48
Ενδοπορικά καρκινώματα.....	48
Διηθητικά καρκινώματα σταδίου I και II.....	48
Διηθητικά καρκινώματα σταδίου III.....	50
Σταδίου IV (μεταστατικά-M1).....	50
Ανοσοθεραπεία.....	50
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	51
Ενδονεοπλασματικό και περινεοπλασματικό μικροπεριβάλλον.....	51
Μεταστατικό μικροπεριβάλλον.....	52
Μοριακές αλλοιώσεις στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου του μαστού.....	52
Στοιχεία μικροπεριβάλλοντος και η διάδρασή τους με τον καρκίνο του μαστού.....	54
Το μικροπεριβάλλον στον καρκίνο του μαστού ως θεραπευτικός στόχος.....	63
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	65
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	66
Επιλογή ασθενών.....	66
Επιλογή κύβων παραφίνης και ανοσοϊστοχημεία.....	66
Αξιολόγηση - ανίχνευση - ποσοτικοποίηση TILs και M2 μακροφάγων ανά νεοπλασματικό διαμέρισμα.....	67
Ποσοτικοποίηση TLS και σχηματισμός ομάδων.....	68
Στατιστική ανάλυση.....	69

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
Αξιολόγηση CD8+ CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου και η συσχέτισή τους με τους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και την κλινική πορεία της νόσου.....	70
Αξιολόγηση CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου.....	75
Συλλογική αξιολόγηση των CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου.....	76
CD8+ και CD163+ ενδονεοπλασματικές πυκνότητες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και η συσχέτισή τους με κλινική πορεία της νόσου στρωματοποιημένες από κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες.....	77
Ανάστροφη σχέση ανάμεσα σε FCIS και κατάσταση νόσου.....	81
Πολυπαραγοντική ανάλυση του διαστήματος ελεύθερου νόσου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών σχετιζόμενα με κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και συνδυασμένη ανοσοϋπογραφή.....	81
Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των εφαπτόμενων και απομακρυσμένων TLS και η συσχέτισή τους με κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και την κλινική πορεία της νόσου.....	82
Ενδονεοπλασματική ανοσολογική διήθηση και περινεοπλασματικά TLS· ένα βελτιωμένο ανοσολογικό προφίλ όγκου.....	88
Οι ενισχυμένες ανοσολογικές υπογραφές: Ένα τρίτο επίπεδο αξιολόγησης του ανοσολογικού προφίλ στο νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον.....	90
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	95
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	102
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	113
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	114
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	115
SUMMARY.....	117
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ.....	119
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΑΣΚΟΠΙΣΗΣ (REVIEW).....	145
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ – ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	156
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ.....	157
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	180

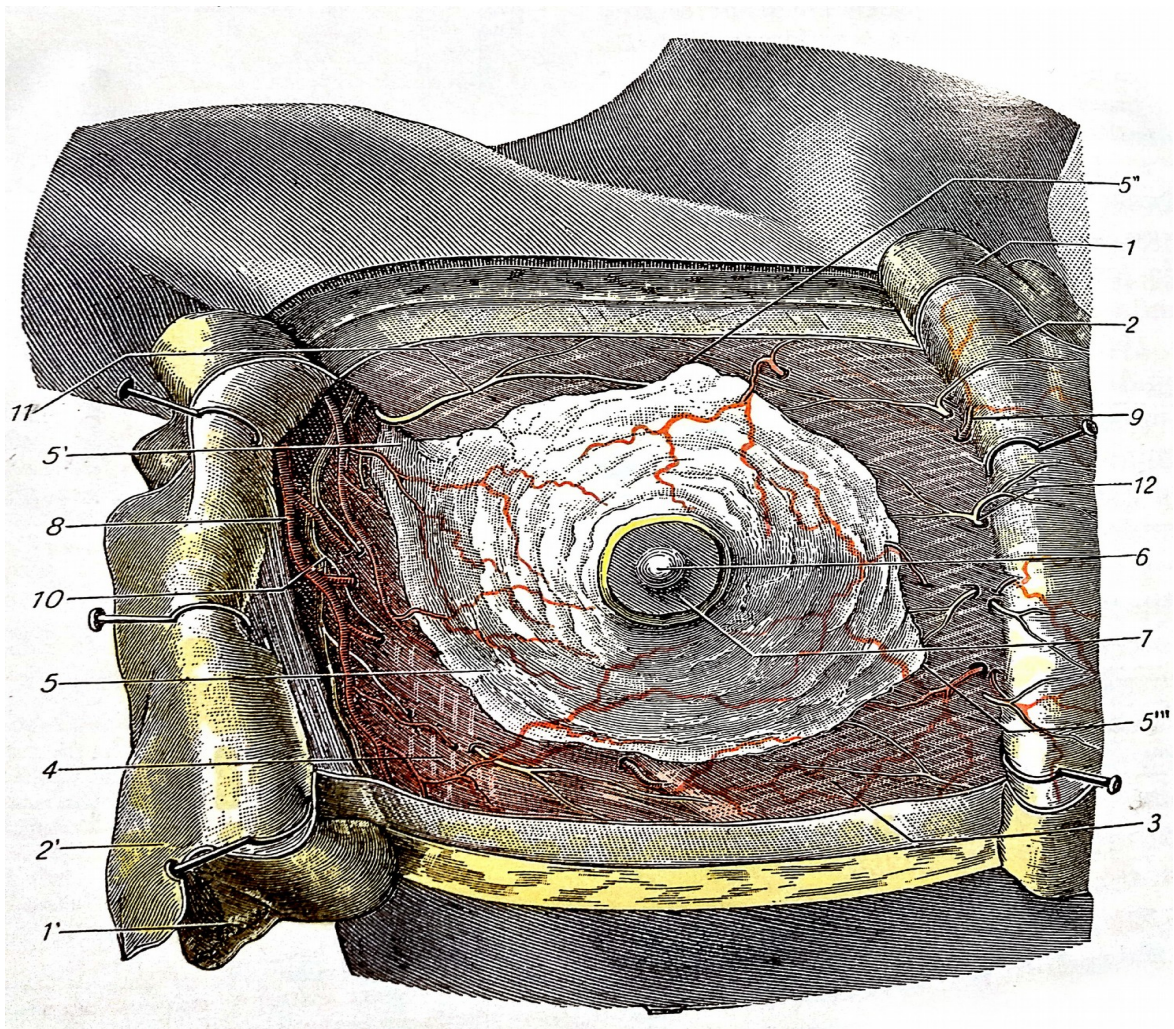
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ANATOMIA

Οι μαστοί είναι τροποποιημένα δερματικά εξαρτήματα. Για την ακρίβεια είναι εξαιρετικά τροποποιημένοι και αναπτυγμένοι ιδρωτοποιοί αδένες.

Όρια

Διακρίνονται σε επιφανειακά και εν τω βάθει. Τα πρώτα αντιστοιχούν στα όρια του μαζικού αδένος. Στον άντρα, δεδομένης της μικρής ανάπτυξης, είναι εξαιρετικά περιορισμένα και εντοπισμένα στη περιοχή της θηλής και της περιθηλαίας άλως, στη δε γυναίκα αντιθέτως τα όρια δεν είναι ξεκάθαρα καθώς παρουσιάζει αυξημένες διαστάσεις, αν και με σημαντικές διακυμάνσεις. Γενικά ο μαστός καταλαμβάνει καθέτως το διάστημα ανάμεσα στην 3η και την 7η πλευρά και οριζοντίως από το στέρνο έως τη μασχαλιαία χώρα. Όσον αφορά τα εν τω βάθει όρια ο μαστός περιορίζεται από τη θωρακική περιτονία η οποία επικαλύπτει τον μείζονα θωρακικό μυ και τμήμα του ελάσσονος θωρακικού (εικόνα 1).



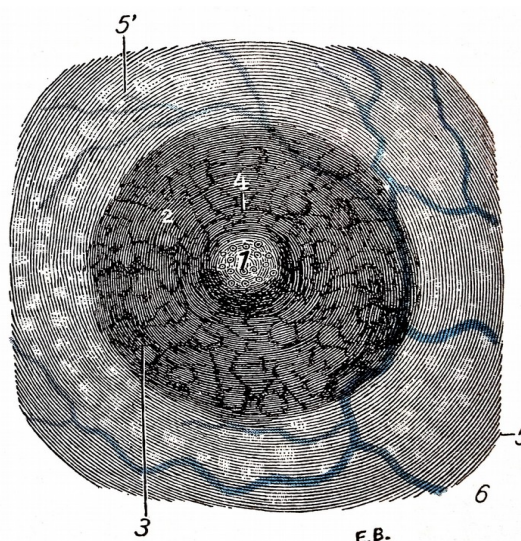
Εικόνα 1: 1.Δερματικοί κρημνοί, 2.Πρόσθια περιτονία, 3.Μ. Θωρακικός μυς, 4.Μ. Οδοντωτός μυς, 5.Μαζικός αδένας με ουρά Spencer (5''), 6.Θηλή, 7.Περιθηλαία άλως, 8.Πλάγια θωρακική αρτ., 9.Αρτηριακοί κλάδοι προερχόμενοι από διατητρώνες, 10. Νεύρο οδοντωτού μύος, 11.Νευρικός κλάδος 2ο διατητρέου πλευρικού, 12 Πρόσθιοι διατητρώνες νευρικοί κλάδοι. Τροποποιημένη ανατύπωση από {Testut L}.

Διαστάσεις και μορφολογία

Ο μαστός σε μια φυσιολογικά αναπτυχθείσα γυναίκα έχει ημισφαιρική μορφή με την επίπεδη επιφάνεια αυτού να εναποτίθεται στη θωρακική περιτονία και παρουσιάζει στο κέντρο της κυρτής επιφάνειας μια μικρή προεκβολή, τη θηλή. Ο μαστός διαχωρίζεται από το θώρακα με μια πτυχή εμφανή μόνο κατά το κάτω όριο, την υπομάστια πτυχή. Η κατά κύριο λόγο ημισφαιρική μορφολογία και το μέγεθος του μαστού παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, η οποία σχετίζεται κυρίως με την ανάπτυξη του μαστικού αδένος. Η τελευταία είναι ανάλογη της ηλικίας και διαφορετική για κάθε άτομο.

Θηλή

Η θηλή αποτελεί μια ωοειδή προσεκβολή μέγιστης διαμέτρου από 8-15 χιλιοστά που είναι εντοπισμένη στο κέντρο της περιθηλαίας άλως. Ανεξαρτήτως διαστάσεων παρουσιάζει ζαρωμένη εξωτερική επιφάνεια και χροιά όμοια με εκείνη της περιθηλαίας άλως. Σε αντίθεση με το υπόλοιπο δέρμα που επικαλύπτει τον μαστό, εκείνο κατά την περιοχή της θηλής είναι συμφυόμενο με τους υποκείμενους ιστούς και φέρει κατά την εν τω βάθει επιφάνειά του ίνες λείων μυικών ιστών που σχηματίζουν το θηλαίο μυ.



Εικόνα 2: 1.Θηλή, 2.Περιθηλαία άλως, 3. Φυμάτια Morgagni, 4. Αύλακες κάτωθεν θηλής, 5.Δέρμα θηλής (5'Δευτερεύουσα άλως), 6. Φλεβική κυκλοφορία του Haller. Τροποποιημένη ανατύπωση από {Testut L}.

Περιθηλαία άλως

Ονομάζεται το τμήμα δέρματος που περιβάλλει τη βάση της θηλής. Συνήθως έχει μέγιστη διάμετρο 15-25 χιλιοστά. Παρουσιάζει καστανή χροιά και πολλαπλά μικρά εξογκώματα τα οποία αντιστοιχούν στα φυμάτια του Morgagni, τα οποία παροχετεύουν τους επικουρικούς σμηγματογόνους αδένες του Montgomery (εικόνα 2).

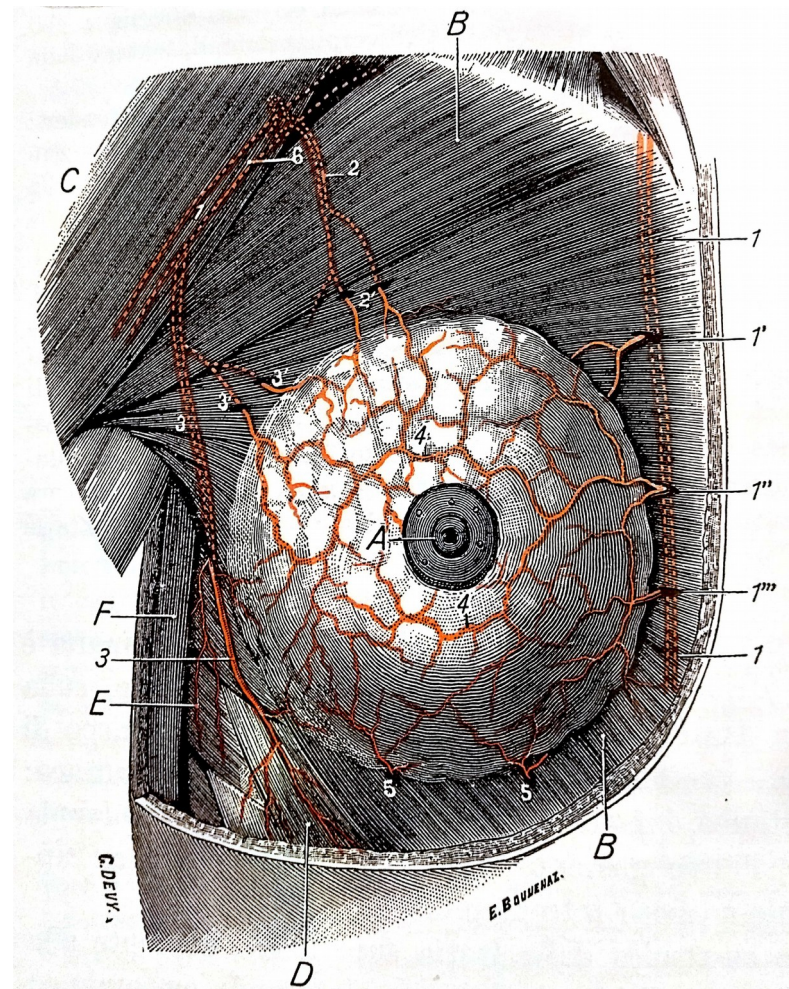
Μαστικός Αδένας

Ο μαστικός αδένος εμφανίζει λευκόφαιη - κιτρινόφαιη χροιά και ακανόνιστο σφαιρικό σχήμα. Παρουσιάζει μια προσεκβολή προς τη μασχαλιαία χώρα την επονομαζόμενη ουρά Spence. (εικόνα 1) Αυτή περιβάλλει το κάτω όριο του μείζονος θωρακικού μύος και εισέρχεται στη μασχαλιαία χώρα. Ο μαστικός αδένος δεν είναι στερεά συνδεδεμένος με τη θωρακική περιτονία. Μεταξύ αυτού και της περιτονίας υπάρχει μια μικρή ποσότητα συνδετικολιπώδους ιστού.

Αντιθέτως, ο μαστός είναι συνδέεται στερεά με το δέρμα και την πρόσθια επιφάνεια της κλείδας μέσω ινών πυκνού συνδετικού ιστού που σχηματίζουν τους συνδέσμους του Cooper.

Αρτηριακό δίκτυο μαστού

Η αιμάτωση του μαστού προέρχεται από την έσω θωρακική αρτηρία (έσω μαστική), την πλάγια θωρακική και τις μεσοπλεύριες. Η έσω θωρακική, κλάδος της υποκλείδιας αρτηρίας, εκβάλλει σε 2-3 αρτηρίες οι οποίες με τη σειρά τους και αφού έχουν διαπεράσει τους μεσοπλεύριους και τον μείζονα θωρακικό μυ αιματώνουν την άνω έσω πλευρά του μαζικού αδένου. Από την πλάγια θωρακική, κλάδος της μασχαλιαίας αρτηρίας, χορηγούνται 2-3 αγγειακοί κλάδοι που αιματώνουν την έξω πλευρά του αδένου. Σε αυτούς προστίθενται αρτηρίες προερχόμενες από την άνω θωρακική. Από τις μεσοπλεύριες αρτηρίες εκφύονται πολυάριθμοι διατιτρώστες κλάδοι οι οποίοι αιματώνουν τον αδένου κατά την οπίσθιά του επιφάνεια (εικόνα 3).



Εικόνα 3: 1.Έσω θωρακική αρτηρία, 2.Άνω θωρακική αρτηρία, 3.Πλάγια θωρακική αρτηρία, 4. Περιθηλαία αγγείωση, 5. Διατιτρώστες αρτηρίες, 6.Μασχαλιαία αρτηρία. Τροποποιημένη ανατύπωση από {Testut L}.

Φλεβική Παροχέτευση

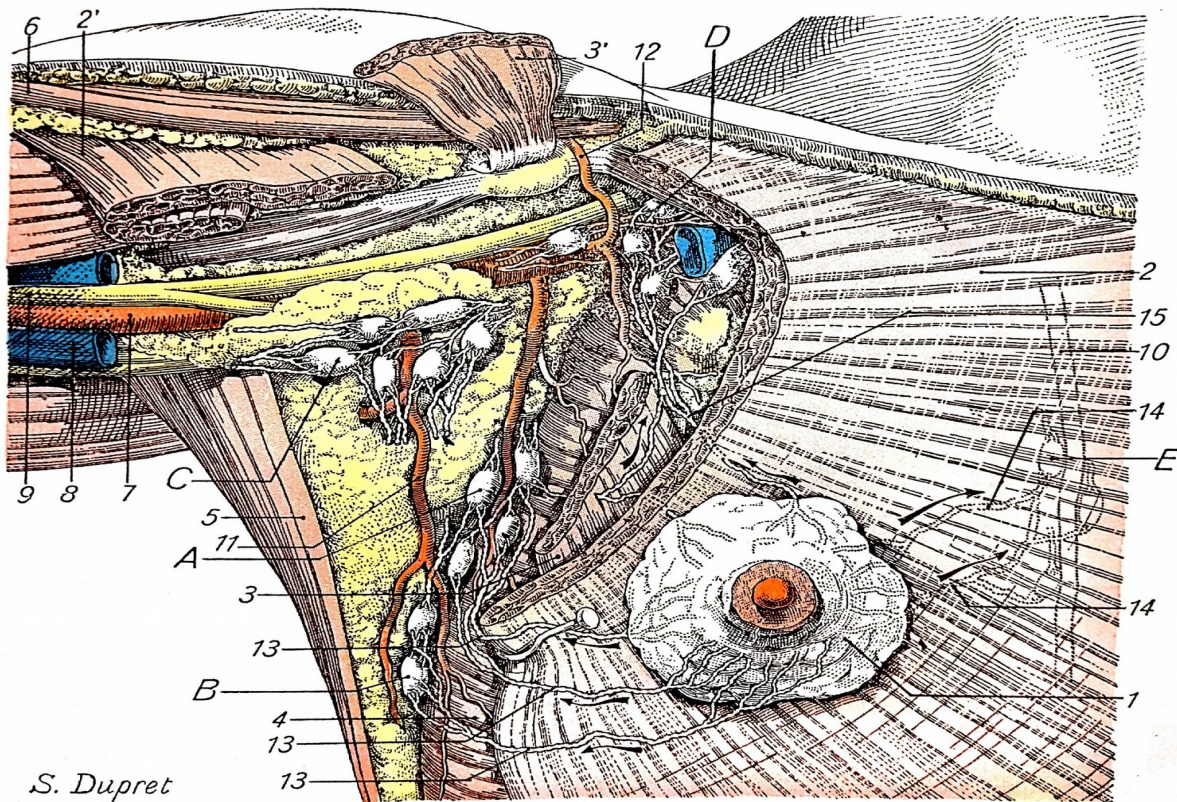
Ο μαστός παρουσιάζει εξαιρετικά αναπτυγμένο φλεβικό δίκτυο το οποίο διακρίνεται σε επιπολής και εν τω βάθει. Οι επιπολής φλεβικοί κλάδοι εκβάλλουν στην έσω μαστική φλέβα και σχηματίζουν ένα ιδιαίτερα πλούσιο δίκτυο γύρω από τη περιοχή της θηλής ονομαζόμενο και φλεβικό δίκτυο του Haller (εικόνα 2). Οι εν τω βάθει καταλήγουν προς την έσω μαστική, τη μασχαλιαία και τις μεσοπλεύριες φλέβες.

Λεμφική Παροχέτευση

Ένα πλούσιο δίκτυο αναστομώσεων αποτελούμενο από τα λεμφοφόρα τριχοειδή της περιθηλαίας άλω, των γαλακτοφόρων πόρων και του υποδόριου ιστού παροχετεύει τη λέμφο προς

την περιοχή της συστοίχου μασχαλιαίας χώρας (κυρίως) όπου και υπάρχουν πέντε ομάδες λεμφαδένων οι οποίες χωρίζονται σε τρία επίπεδα (I ,II ,III). Το πρώτο επίπεδο (I) περιλαμβάνει τους λεμφαδένες που εντοπίζονται επί τα εκτός του ελάσσονος θωρακικού μύς και αποτελείται από τρεις ομάδες λεμφαδένων: α) τους πρόσθιους (έξω μαστικοί - ευρισκόμενοι κάτω από το μείζονα θωρακικό μυ), β) τους οπίσθιους (υποπλάτιοι λεμφαδένες - πρόσθια του υποπλάτιου μύς), γ) τους έξω (επί τα εντός ή πρόσθια της μασχαλιαίας φλέβας). Το δεύτερο (II) επίπεδο περιλαμβάνει τους λεμφαδένες της κεντρικής ομάδος οι οποίοι βρίσκονται πίσω από την κατάφυση του ελάσσονος θωρακικού μύς. Το τρίτο επίπεδο (III) περιλαμβάνει την υποκλείδια (κορυφαία) ομάδα η οποία βρίσκεται επί τα εντός του ελάσσονος θωρακικού μύς (εικόνα 4).

Ανάμεσα σε μείζον και έλασσον θωρακικό μυ ανευρίσκονται οι λεμφαδένες Rotter, οι οποίοι διοχετεύουν τη λέμφο στη μασχαλιαία χώρα. Η παροχέτευση της λέμφου ακολουθεί συντεταγμένη πορεία από το επίπεδο I στο επίπεδο III. Δεν παροχετεύεται όμως όλη η λέμφος στη μασχαλιαία χώρα· μια μικρή ποσότητα αυτής προερχόμενη από το έσω τμήμα του αδένος διοχετεύεται μέσω διαπιτρινόντων λεμφικών αγγείων προς τους παραστερνικούς λεμφαδένες. Τέλος, υπάρχει μια μικρή αλλά σημαντική οδός λεμφικής παροχέτευσης προς τον αντίθετο μαστό και το κοιλιακό τοίχωμα.



Εικόνα 4: 1.Μαζικός αδένος, 2.Μ. θωρακικός μυς, 3.Ελ. θωρακικός μυς, 5.Ραχιαίος μυς, 6.Δελτοειδής μυς, 7.Μασχαλιαία αρτ. 8. Μασχαλιαία Φλ. 9.Διάμεσο νεύρο, 10.Έσω θωρακική, 11. Θωρακικός Κλάδος της υποωμοπλατταίας, 12 Ακρωμιαίος αρτηριακός κλάδος, 13. Ομάδα έξω (πλάγιων) μαζικών λεμφαδένων, 14. Ομάδα έσω μαζικών λεμφαδένων, 15 Ομάδα οπίσθιων μαζικών λεμφαδένων (Rotter), Α Ομάδα μασχαλιαίων λεμφαδένων (επίπεδο I), Β Ομάδα πλάγιων θωρακικών λεμφαδένων (επίπεδο I), C Βραχιακή ομάδα μασχαλιαίων λεμφαδένων (επίπεδο II), D Υποκλείδιαι λεμφαδένες (επίπεδο III), Ε Έσω θωρακικοί λεμφαδένες. Τροποποιημένη ανατύπωση από {Testut L}.

Νεύρωση του μαστού

Η αισθητική νεύρωση του μαστού προέρχεται κυρίως από τους πλάγιους και τους πρόσθιους διατιτρώντες κλάδους του δεύτερου έως έκτου μεσοπλεύριου νεύρου. Τμήμα της άνω έξω επιφάνειας του δέρματος νευρώνεται από κλάδους του αυχενικού πλέγματος. Στη περιοχή της περιθλαίας άλω παρατηρούνται σωματία Ruffini, Pacini και Meissner που συμμετέχουν στο αντανακλαστικό του θηλασμού{Vorherr H.}.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ

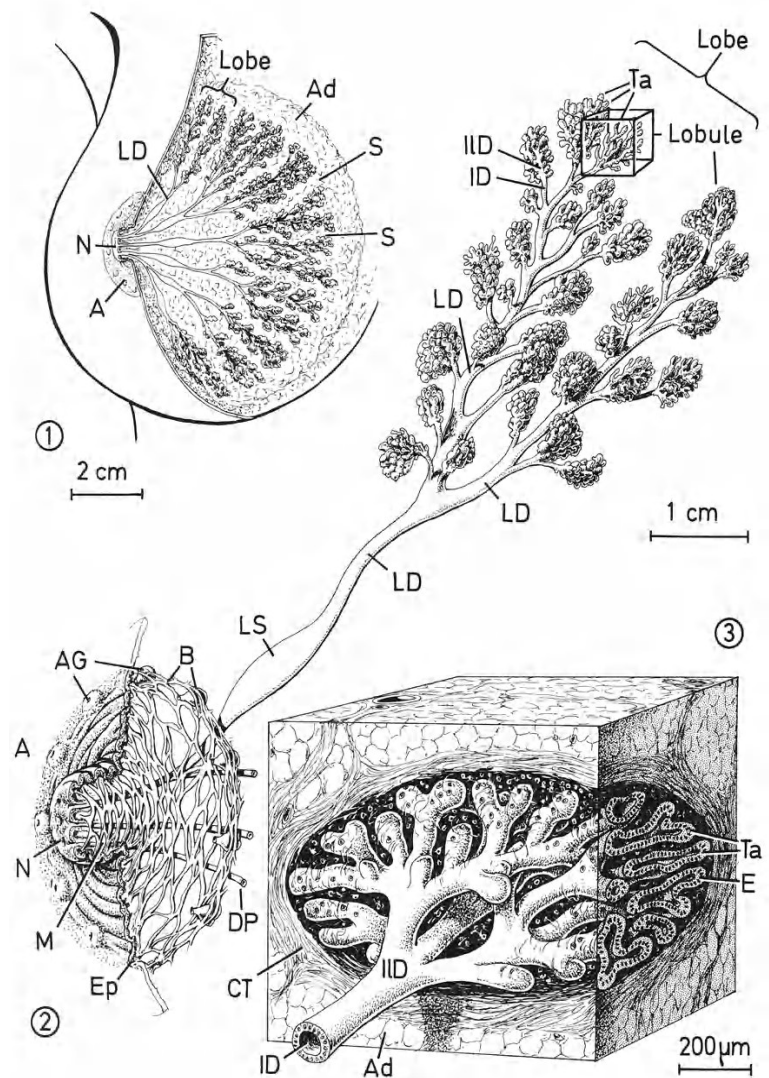
Μορφολογικοί χαρακτήρες

Γενικά στοιχεία

Ο μαζικός αδένας είναι τροποποιημένος αποκρινής ιδρωτοποιός αδένας ο οποίος αναπτύσσεται πλήρως μόνο στη γυναίκα. Αποτελείται από στρώμα και παρέγχυμα. Το τελευταίο συγκροτείται από λιπώδη και συνδετικό ιστό, ο οποίος σχηματίζει τα διαφραγμάτια που χωρίζουν το παρέγχυμα σε λοβούς και λόβια. Η λειτουργική μονάδα του μαζικού αδένος είναι η τελική πορολοβιακή μονάδα (Terminal ductal lobular unit-T.D.L.U.).

Το μαζικό παρέγχυμα αποτελείται από ένα σύστημα διακλαδιζομένων λοβίων οι πόροι των οποίων συνενώνονται. Οι ομάδες των συνενωμένων λοβίων σχηματίζουν έναν από τους 15-25 λοβούς ο καθένας εκ των οποίων τροφοδοτεί ένα γαλακτοφόρο πόρο, ο οποίος με τη σειρά του καταλήγει στην κορυφή της θηλής (εικόνα 1).

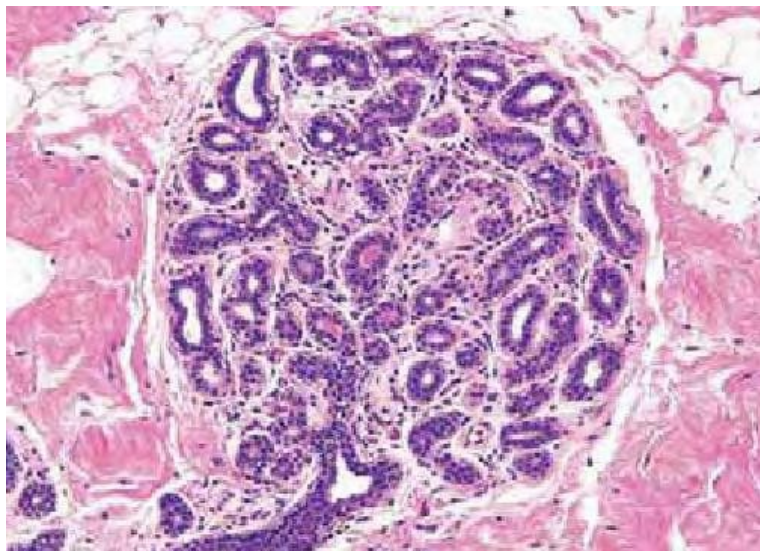
Κάτωθεν της θηλαίας άλω η διάμετρος των γαλακτοφόρων πόρων διευρύνεται σχηματίζοντας τους γαλακτοφόρους κόλπους, οι οποίοι κατά την περιοχή της θηλής λεπταίνουν δραστικά και συγχωνεύονται μεταξύ τους φτάνοντας στην επιφάνεια της θηλής έως 5-10 φύματα πόρων.



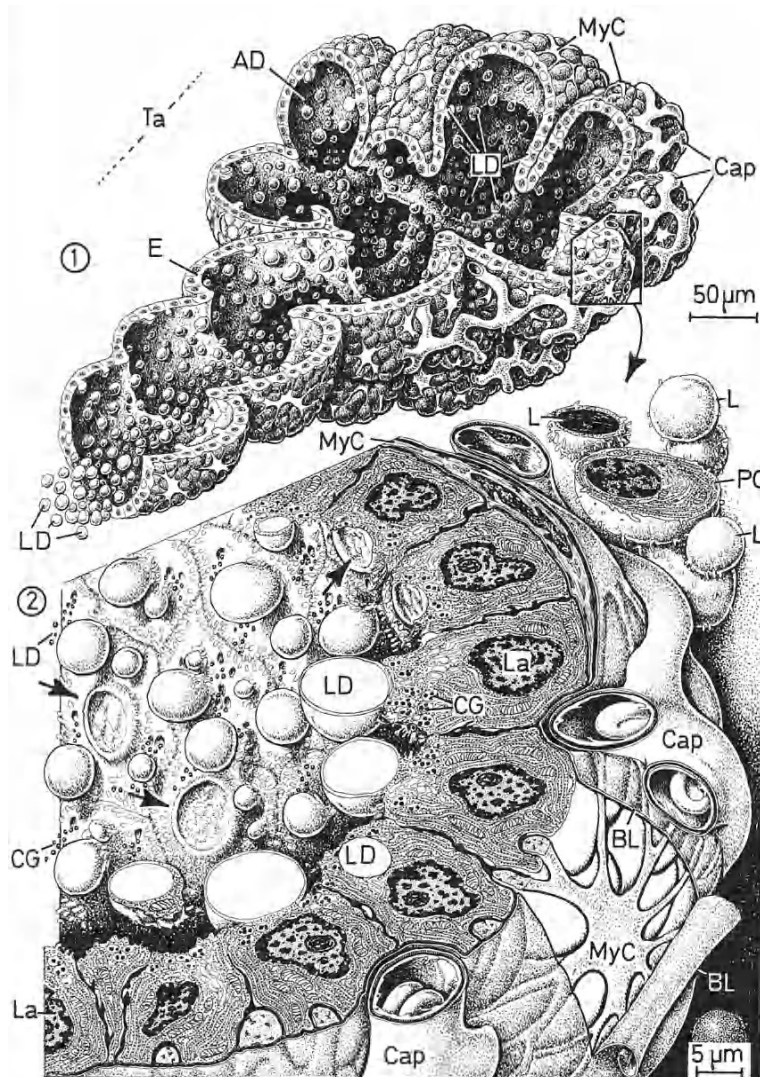
Εικόνα 1: Ad:Λιπώδης ιστός, S:Διαφραγμάτιο, LD:Γαλακτοφόρος πόρος, N:Θηλή, A:Περιθηλαία άλω, Ta:Πορολοβιακή μονάδα, ID:Εξωλοβιακός πόρος, LS:Γαλακτοφόρος κόλπος, DP:Φύματα κόλπων, Ep:Επιδερμίδα, B:Δεσμίδες μυικών ινών, M:Θηλαίος μυς, AG:Εξογκώματα Montgomery, E:Επιθήλιο, CT:Συνδετικός ιστός, IID:Ενδολοβιακός πόρος. Μετάφραση και Ανατύπωση από {Kristic R.V}.

Δομή λοβίου - Τελικής πορολοβιακής μονάδας T.D.L.U.

Το λόβιο του μαζικού αδένος χαρακτηρίζεται από ομάδες αδενοκυψελών που εκβάλλουν στους ενδολοβιακούς τελικούς πόρους και επικαλύπτονται από κυβικό καλυπτικό επιθήλιο (εικόνα 2). Τα εν λόγω κύτταρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αποκτούν πλούσιο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο και εκκρίνουν αποκρινώς ευμεγέθη σταγονίδια λίπους και εκκρινώς κοκκία καζεΐνης εντός του αυλού. Οι αδενοκυψέλες περιβάλλονται κατά την εξωτερική τους επιφάνεια από μυοεπιθήλια και βασική μεμβράνη (εικόνα 3). Εφαπτόμενο στη βασική μεμβράνη από την εξωτερική πλευρά ανευρίσκεται πλέγμα τροφοφόρων τριχοειδών αγγείων μαζί με σπάνια λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Τα λόβια περιβάλλονται από χαλαρό συνδετικό και λιπώδη ιστό. Η παρουσία του τελευταίου χρησιμεύει ως εφεδρικός χώρος για την υπερτροφία του αδένος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο δε συνδετικός ιστός εμπεριέχει ινοβλάστες, σπάνια Β-λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα τα οποία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τους πρώτους μήνες λοχείας αυξάνονται στον αριθμό. Τα ανοσολογικά αυτά κύτταρα όντας σχετιζόμενα με την έκκριση IgA, IgG συμβάλλουν στην ανοσοπροστασία του νεογνού κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του. Όταν ο ενδολοβιακός



Εικόνα.2: A&HX100 Τυπική τελική πορολοβιακή μονάδα. Ανατύπωση από {Rosen P.P.}.



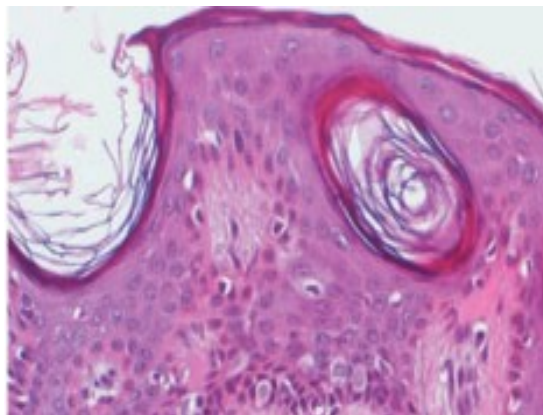
Εικόνα .3: Τελική πορολοβιακή μονάδα σε γαλουχία. Ta:Πορολοβιακή μονάδα, AD:Διάταξη λοβίων, E:Επιθήλιο, LD:Λιπίδια, Cap:Τριχοειδή, Lac:Γαλακτοκύτταρα, CG:Κοκκία καζεΐνης, Myc:Μυοεπιθήλια, BL:Βασική Μεμβράνη, L:Λεμφοκύτταρα, PC:Πλασματοκύτταρα. Μετάφραση και Ανατύπωση από {Kristic R.V.}

ανοσοπροστασία του νεογνού κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του. Όταν ο ενδολοβιακός

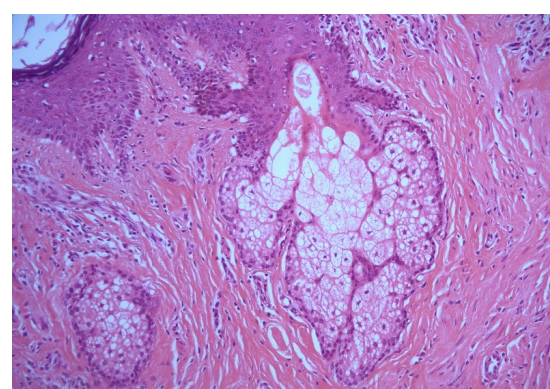
τελικός πόρος εξέλθει του λοβίου ονομάζεται εξωλοβιακός τελικός πόρος. Κάθε τελικός πόρος (ένδο/έξω-λοβιακός) μαζί με το λόβιο αποτελούν μια ενιαία ανατομική και λειτουργική μονάδα του μαζικού αδένα, ονομαζόμενη τελική πορολοβιακή μονάδα (Terminal Ductal Lobular Unit-T.D.L.U.).

Θηλή και περιθηλαία άλως

Η θηλή καλύπτεται από πολύστοιβο πλακώδες επιθήλιο με έντονη εναπόθεση μελανίνης κατά τη βασική στοιβάδα αυτής. Εντός της επιδερμίδας μπορεί να ανευρεθούν μεμονωμένα ελαφρώς διογκωμένα επιθηλιακά κύτταρα με απαυγάζον κυτταρόπλασμα (κύτταρα Tokel) (εικόνα 4). Κάτωθεν της επιδερμίδας της θηλής, παρατηρείται το πλέγμα των λείων μυικών ινών του θηλαίου μυός ως και οι γαλακτοφόροι πόροι που εκβάλλουν από την επιφάνεια της θηλής. Η βάση της περιβάλλεται από την περιθηλαία άλω, η επιδερμίδα της οποίας παρουσιάζεται κεχρωσμένη όπως το επιθήλιο της θηλής. Η δικτυωτή στοιβάδα του δέρματός της, είναι πλούσια σε ελαστικές ίνες και εμπεριέχει δίκτυο λείων μυικών ινών διατεταγμένο κυκλοτερώς (γνωστό και ως μυς του Sappey), το οποίο συνέχεται με τις τις λείες μυικές ίνες της θηλής σχηματίζοντας το θηλαίο μυ (mammary muscle).



Εικόνα 4: Θηλή με παρουσία κυττάρων Tokel.



Εικόνα 5: A&HX200 Ογκίδιο Montgomery (Σμηγματογόνος αδένας) που εκβάλλει στην επιδερμίδα διαμέσου του φυματίου Morgagni.

Κατά την περιφέρεια της περιθηλαίας άλω και περιβαλλόμενα με ίνες από το μυ του Sappey παρατηρούνται μικρές υπεγέρσεις της επιδερμίδας. Επίσης αποκαλούμενες και εξογκώματα του Montgomery (επικουρικοί σμηγματογόνοι αδένες) με τα σύστοιχα φυμάτια του Morgagni (εικόνα 5). Συνυπάρχουν και πολυάριθμες νευρικές απολήξεις και σωμάτια (Ruffini, Pacini Meissner). Τόσο οι σμηγματογόνοι αδένες όσο και τα νευρικά σωμάτια εμπλέκονται στη γαλουχία. Κατά την περιφέρεια της θηλαίας άλω παρατηρούνται άξονες τριχών με τα συνοδά εξαρτήματά τους.

Κυτταρικοί πληθυσμοί και ανοσοϊστοχημικοί χαρακτήρες στο φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα και τη θηλή

Επιθηλιακά κύτταρα

Υπάρχουν 2 ειδών επιθηλιακά κύτταρα στο μαστό: τα προσαύλια (αυλικού τύπου - luminal) και τα μυοεπιθηλιακά. Τα προσαύλια κύτταρα επικαλύπτουν το εσωτερικό των πόρων και της πορολοβιακής μονάδας. Έχουν κυβοειδές / κυλινδρικό επιθήλιο με ωοειδή πυρήνα, δυσδιάκριτο πυρήνιο και ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Όσα εκ των κυττάρων αυτών ανευρίσκονται εντός της τελικής πορολοβιακής μονάδας μπορούν να διαφοροποιηθούν σε γαλακτοκύτταρα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, υπό την επίρεια της προλακτίνης. Τόσο τα εν δυνάμει γαλακτοκύτταρα όσο και τα υπόλοιπα



Εικόνα 6: Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση. κόκκινο χρωμογόνο ER, καφέ χρωμογόνο μυοεπιθήλια X400: μπλε βέλος προσαύλια κύτταρα θετικά στο ER, λευκό βέλος μυοεπιθήλια αρνητικά στο ER, μαύρο βέλος μυοεπιθήλια θετικά στην SMA. Ανατύπωση από {Hicks D}.

προσαύλια κύτταρα εκφράζουν κερατίνες χαμηλού μοριακού βάρους CK7, CK8, CK18, CK19, τη μεμβρανική πρωτεΐνη E-Cadherin ως και καθολική πυρηνική χρώση έναντι του αντισώματος GATA3. Παρατηρείται σποραδική έκφραση οιστρογονικών/προγεστερονικών δεικτών (ER και/ή PR) (Εικόνα 6) και GCDFP-15. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα μονόστοιβο πλέγμα το οποίο περιβάλλει τις αδενοκυψέλες και τους πόρους του μαζικού παρεγχύματος το οποίο με τη σειρά του επικαλύπτεται από βασική μεμβράνη. Συνήθως εκφράζουν κερατίνες υψηλού μοριακού βάρους CK5/6, CK14 CK17 καθώς και SMA (εικόνα 6), Calponin, p63 και S100. Η χρώση έναντι ορμονικών δεικτών (ER/PR) είναι πάντα αρνητική. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση μυοεπιθηλιακών δεικτών δεν είναι σταθερή και η παρουσία τους πρέπει να επιβεβαιώνεται τουλάχιστον από δύο ανοσοϊστοχημικούς δείκτες.

Στρώματικά Κύτταρα

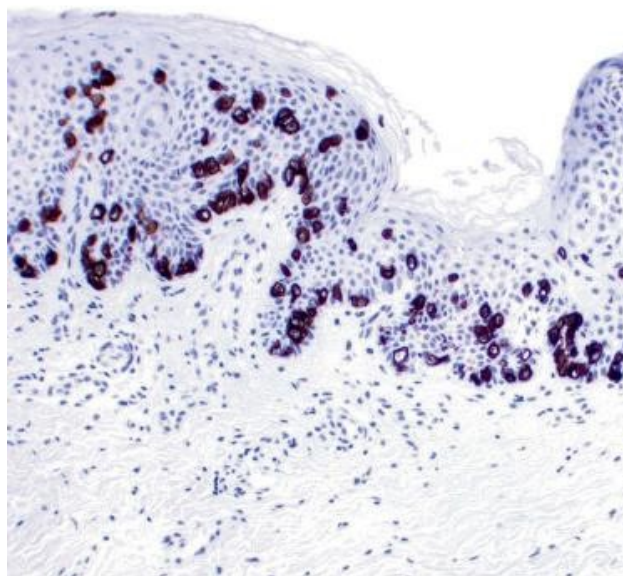
Η σύσταση του στρώματος του μαστού εξαρτάται από ηλικία, βάρος, εγκυμοσύνη, γαλουχία και εμμηνορροϊκή κατάσταση. Στις νεαρές γυναίκες αποτελείται από συνδετικό ιστό, ο οποίος με το πέρασ της ηλικίας αντικαθίσταται σταδιακά από λιπώδη. Διακρίνονται 2 τύποι στρώματος μαστού. Το ενδολόβιο στρώμα και το μεσολόβιο στρώμα.

Το μεσολόβιο στρώμα περιβάλλει και στηρίζει τους λοβούς του μαζικού αδένα και ευθύνεται για τον όγκο του μαστού. Αποτελείται από κολλαγονοποιημένο στρώμα με ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και αγγεία. Το ινοβλαστικό/μυοϊνοβλαστικό στοιχείο του εκφράζει CD34, οι μυοϊνοβλάστες SMA και σπανιότερα ασθενώς ορμονικούς υποδοχείς.

Το ενδολόβιο στρώμα περιβάλλει και στηρίζει την πορολοβιακή μονάδα. Αποτελείται από μη κολλαγονοποιημένο, χαλαρό, σχετικά κυτταροβριθές συνδετικό ιστό με άφθονους ινοβλάστες, και ήπια παρουσία λεμφοπλασματοκυτταρικού πληθυσμού.

Θηλή και περιθηλαία άλως

Η θηλή/περιθηλαία άλως εξωτερικά καλύπτονται από πολύστοιβο πλακώδες κερατινοποιημένο επιθήλιο που συνδέεται με αυτό της επιδερμίδας του παρακείμενου δέρματος. Το εν λόγω επιθήλιο έχει τυπικό ανοσοφαινότυπο πλακώδους τύπου (Καθολική έκφραση CK5, 34βΕ12, E-Cadherin). Τα κύτταρα Tokel γίνονται διακριτά λόγω των ιδιαίτερων μορφολογικών χαρακτήρων που παρουσιάζουν (επιθηλιακά κύτταρα με διαύγαση, ήπια διόγκωση και απουσία ατοπίας). Στις σπάνιες περιπτώσεις που χρειάζεται ανοσοϊστοχημική επιβεβαίωση της παρουσίας τους παρουσιάζουν τον ακόλουθο ανοσοφαινότυπο : CK7+, ER+, CerbB2-, Ki67<<1%, CD138-, P53-.



Εικόνα 7: CK7 X200 Κύτταρα Tokel επί της θηλής. Ανατύπωση από {Rosen P.P.}.

ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Σταδιοποίηση (Staging)

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού πραγματοποιείται σύμφωνα με το σύστημα TNM το οποίο λαμβάνει υπ' όψιν του την έκταση της νόσου έπειτα από αξιολόγηση της ανατομικής εκτάσεως του όγκου (T) που επί της ουσίας αποτελεί μια μέση εκτίμηση για το φορτίο του όγκου (διαστάσεις), την παρουσία χορήγησης μετάστασης στους τοπικούς λεμφαδένες (N) και, τέλος, την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Παρακάτω παρατίθεται η σταδιοποίηση κατά την τελευταία (8η) έκδοση του AJCC (American Joint Committee on Cancer) το 2017. Ο παθολογοανατομικός αλλά και ο κλινικός καθορισμός της εκτάσεως του πρωτοπαθούς καρκινώματος του μαστού είναι ο ίδιος και έχει ως εξής:

Κατηγορία T	Κριτήρια T
TX	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν δύναται να προσδιοριστεί
T0	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis (DCIS)	Πορογενές καρκίνωμα in situ
Tis (Paget)	Νόσος Paget της θηλής χωρίς υποκείμενο νεόπλασμα (σε περίπτωση συνύπαρξης η σταδιοποίηση γίνεται με βάση το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά του όγκου)
T1	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου ≤ 20 mm
T1mi	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου ≤ 1 mm
T1a	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου > 1 mm έως ≤ 5 mm
T1b	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου > 5 mm έως ≤ 10 mm
T1c	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου > 10 mm έως ≤ 20 mm
T2	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου > 20 mm έως ≤ 50 mm
T3	Διηθητικό καρκίνωμα μεγίστης διαμέτρου > 50 mm
T4	Όγκος ανεξαρτήτως μεγέθους που επεκτείνεται στο θωρακικό τοίχωμα ή/και το δέρμα (παρουσία εξέλκωσης ή μακροσκοπικών οζιδίων)
T4a	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα· διήθηση ή παρουσία συμφύσεων με τους θωρακικούς μύς με απουσία διηθήσεως δομών του θωρακικού τοιχώματος, δεν πληροί τις προϋποθέσεις για T4
T4b	Εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφορικά δερματικά οζίδια εντοπισμένα στον ίδιο μαστό ή/και οίδημα (συμπεριλαμβανομένης της εικόνας «φλοιού πορτοκαλιού»)
T4c	Παρουσία στοιχείων T4a και T4b
T4d	Φλεγμονώδες καρκίνωμα

Πίνακας 1 : Σταδιοποίηση κατά έκταση όγκου (pT).

Διευκρινίσεις:

- Το λοβιακό *in situ* καρκίνωμα (LCIS) θεωρείται πλέον ως καλοήθης οντότητα και έχει αφαιρεθεί από τη σταδιοποίηση TNM στις οδηγίες της 8ης έκδοσης AJCC.
- Σε περίπτωση παρουσίας πολλαπλών όγκων στον ένα μαστό χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση ο όγκος με το υψηλότερο T με τη συνοδό παρουσία του δείκτη (m) -multiple ή του αριθμού των εστιών, λ.χ. 3 όγκοι με το μεγαλύτερο 25 χιλιοστά αντιστοιχούν σε T2_(m) ή T2₍₂₎.
- Η σταδιοποίηση στα αμφοτερόπλευρα καρκινώματα του μαστού γίνεται για κάθε μαστό ξεχωριστά.
- Το μέγεθος του όγκου μετριέται και στρογγυλοποιείται στο πλησιέστερο χιλιοστό. Εξαιρούνται οι όγκοι με μέγιστη διάμετρο μεταξύ 1 και 1,4 mm. Το μέγεθος αυτών στρογγυλοποιείται ως 2 χιλιοστά για να σταδιοποιηθούν ως T1a αντί για μικροδιήθηση.
- Το φλεγμονώδες καρκίνωμα είναι μια κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα χαρακτηριζόμενη από έντονο διάχυτο οίδημα και ερύθημα, το οποίο αφορά τουλάχιστον το ένα τρίτο του δέρματος του μαστού. Σταδιοποιείται ως T4d και είναι κυρίως κλινική διάγνωση. Οι παραπάνω περιγραφείσες μακροσκοπικές αλλαγές οφείλονται κυρίως στην παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων στα δερματικά λεμφαγγεία. Η ανεύρεση των ενδοαγγειακών νεοπλασματικών εμβόλων από μόνη της, χωρίς την προαναφερθείσα συνοδό κλινική εικόνα του δέρματος, δεν αρκεί για να κατατάξει το νεόπλασμα ως φλεγμονώδες.

Ο λεμφαδενικός καθορισμός της έκτασης του νεοπλάσματος παρουσιάζει αρκετές διαφορές ανάμεσα στην παθολογοανατομική (pN) και την κλινική (cN) σταδιοποίηση.

Τα παθολογοανατομικά κριτήρια σταδιοποίησης της λεμφαδενικής επέκτασης είναι τα ακόλουθα:

Κατηγορία pN	Κριτήρια pN
pNX	Οι λεμφαδένες δεν δύναται να εκτιμηθούν (έχουν προηγουμένως εξαιρεθεί ή δεν έχουν εξαιρεθεί για παθολογοανατομική εξέταση)
pN0	Δεν παρατηρείται μετάσταση ή ανευρίσκονται αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων μικρότερες των 0,2 χιλιοστών (Isolated Tumor Cells-ITCs)
pN0(i+)	Παρουσία νεοπλασματικών αθροίσεων μικρότερων των 0.2 χιλιοστών (ITCs) εντοπισμένες με ανοσοϊστοχημεία
pN0(mol+)	Παρουσία θετικών μοριακών ευρημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) χωρίς εντοπισμένα ανοσοϊστοχημικά ITCs
pN1	Μικρομετάσταση ή μετάσταση σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες
pN1mi	Μικρομετάσταση (μέγιστη διάμετρο από 0,2 mm έως 2 mm)
pN1a	Μετάσταση σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες. Τουλάχιστον μια μεγαλύτερη των 2 χιλιοστών
pN1b	Μετάσταση στους λεμφαδένες της έσω μαστικής, μη κλινικά και απεικονιστικά

Κατηγορία pN	Κριτήρια pN
	ανιχνεύσιμη. Δεν προσμετρούνται τα ITC
pN1c	Ταυτόχρονη παρουσία pN1a και pN1b
pN2	Μετάσταση σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε θετικούς απεικονιστικά λεμφαδένες της έσω μαστικής, ελλείπει μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες
pN2a	Μετάσταση σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες. Τουλάχιστον μια μεγαλύτερη των 2 χιλιοστών
pN2b	Μεταστάσεις σε κλινικά εμφανείς λεμφαδένες της έσω μαστικής με ή χωρίς ιστολογική επιβεβαίωση· με ιστολογικά αρνητικούς λεμφαδένες της συστοίχου μασχαλιαίας χώρας
pN3	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους λεμφαδένες της συστοίχου μασχαλιαίας χώρας· ή σε υποκλείδιους λεμφαδένες (επιπέδου III)· ή απεικονιστικά ανιχνεύσιμους θετικούς λεμφαδένες της έσω μαστικής με σύγχρονη παρουσία ενός ή περισσοτέρων θετικών λεμφαδένων επιπέδου I ή II της μασχαλιαίας χώρας· ή σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες της μασχαλιαίας χώρας και σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά δεν είναι κλινικά ανιχνεύσιμες· ή σε σύστοιχους υπερκλείδιους λεμφαδένες
pN3a	Μετάσταση σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες (τουλάχιστον μία εξ αυτών μεγαλύτερη των 2 χιλιοστών)· ή στους υποκλείδιους λεμφαδένες
pN3b	pN1a ή pN2a ταυτόχρονα με pT2b (θετικοί κλινικά ανιχνεύσιμοι λεμφαδένες έσω μαστικής)· ή pN2a παρουσία pN1b
pN3c	Μετάσταση στους σύστοιχους υπερκλείδιους λεμφαδένες.

Πίνακας 2: Παθολογοανατομική σταδιοποίηση βασισμένη στη λεμφαδενική διασπορά της νόσου (pN).

Η κλινική σταδιοποίηση της λεμφαδενικής επέκτασης του νεοπλάσματος (cN) έχει ως εξής:

Κατηγορία cN	Κριτήρια cN
cNX	Οι λεμφαδένες δεν δύναται να εκτιμηθούν (λ.χ. έχουν προηγουμένως εξαιρεθεί ή δεν αναφέρεται εξέτασή τους)
cN0	Δεν παρατηρείται μετάσταση (σε απεικονιστικό ή κλινικό έλεγχο)
cN1	Μεταστάσεις σε κινητούς, ομόπλευρους λεμφαδένες μασχαλιαίας χώρας I ^{ου} και II ^{ου} επιπέδου
cN1mi	Μικρομετάσταση (μέγιστη διάμετρο από 0,2 mm έως 2 mm)
cN2	Μετάσταση σε ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες I ^{ου} και II ^{ου} επιπέδου συμφυόμενους μεταξύ τους ή με γειτονικά ανατομικά στοιχεία· ή σε λεμφαδένες της έσω μαστικής χωρίς κλινική εικόνα μετάστασης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες
cN2a	Μετάσταση σε ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες I ^{ου} και II ^{ου} επιπέδου συμφυόμενους μεταξύ τους (block λεμφαδένων) ή με γειτονικά ανατομικά στοιχεία
cN2b	Μετάσταση σε λεμφαδένες της έσω μαστικής, χωρίς κλινική εικόνα μετάστασης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες
cN3	Μετάσταση στους ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες (επιπέδου III) με ή χωρίς παρουσία θετικών λεμφαδένων επιπέδου I ή II της μασχαλιαίας χώρας· ή σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με παρουσία θετικών λεμφαδένων επιπέδου I ή II της μασχαλιαίας χώρας· ή μετάσταση στους ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες με ή χωρίς παρουσία μεταστάσεων σε λεμφαδένες επιπέδου I/II της

Κατηγορία cN	Κριτήρια cN
	μασχαλιαίας χώρας ή σε λεμφαδένες της έσω μαστικής
cN3a	Μετάσταση στους ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες (επιπέδου III)
cN3b	Μετάσταση σε ομόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες και μασχαλιαίους λεμφαδένες
cN3c	Μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες.

Πίνακας 3: Κλινική σταδιοποίηση με βάση τη λεμφαδενική διασπορά της νόσου (pN).

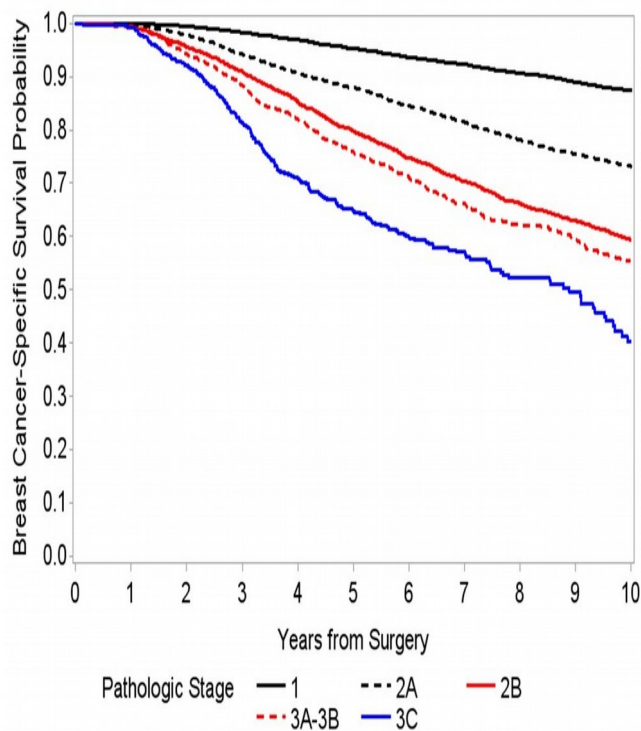
Διευκρινίσεις:

- Η παθολογοανατομική ταξινόμηση των λεμφαδενικών μεταστάσεων (pN) βασιζόμενη μόνο στη βιοψία λεμφαδένα φρουρού με λιγότερους από 6 λεμφαδένες και χωρίς ευρύτερη εκτομή μασχαλιαίων λεμφαδένων σημειώνεται με την παρουσία του δείκτη (sn) – sentinel lymph node λ.χ. pN0_(sn).
- Ως κλινικά εμφανής ορίζεται η μετάσταση που είναι ανιχνεύσιμη από τις μελέτες απεικόνισης (πλην του λεμφοσπινθηρογραφήματος) ή από την κλινική εξέταση με παρουσία χαρακτηριστικών εξαιρετικά ύποπτων για κακοήθεια ή επιβεβαιωμένη μακρομετάσταση με FNA.

Η σταδιοποίηση του πρωτοπαθούς καρκινώματος του μαστού γνωρίζοντας το TNM αποτυπώνεται στον πίνακα 4, ενώ η συνολική επιβίωση σε βάθος 10ετίας παρατίθεται στην εικόνα 1

T	N	M	Στάδιο
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIB
T4	N1	M0	IIB
T4	N2	M0	IIB
Οποιοδήποτε T	N3	M0	IIIC
Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1	IV

Πίνακας 4: Σταδιοποίηση της νόσου με βάση το TNM.



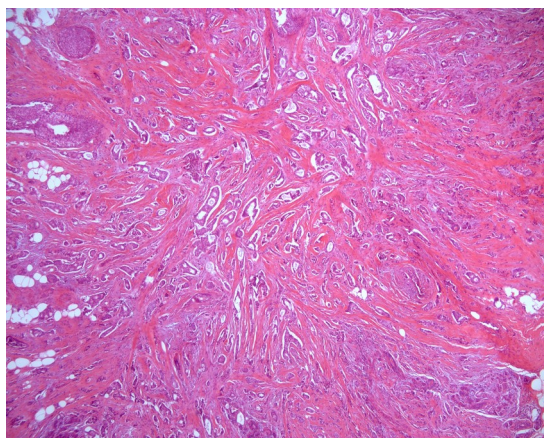
Εικόνα 1: 10ετής επιβίωση ανά στάδιο νόσου. Ανατύπωση από <https://cancerstaging.org> {Hortobagyi G.N.}.

Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)

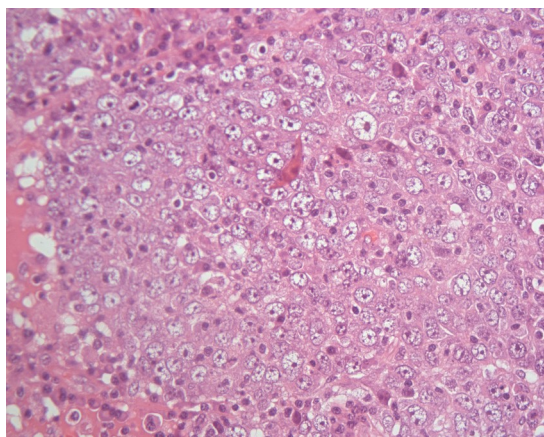
Η σημασία του βαθμού διαφοροποίησης ως ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού έχει αναδειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες και έχει προγνωστική αξία ακόμα και σε περιπτώσεις που η μέγιστη διάμετρος του νεοπλασματος δεν ξεπερνά το 1 εκατοστό. Το σύστημα ιστολογικής διαβάθμισης (Grading) της διαφοροποίησης κατά Nottingham (πίνακας 5) είναι αυτήν τη στιγμή προτεινόμενο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) αλλά και τις κατευθυντήριες οδηγίες του AJCC (American Joint Committee on Cancer). Σε αυτό το σύστημα λαμβάνεται υπ' όψιν ο βαθμός σχηματισμού σωληνίων, η πυρηνική διαβάθμιση (nuclear grade) και ο αριθμός μιτώσεων ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (HPF X 40). Σε καθ'ένα από αυτά τα στοιχεία, αποδίδεται μία τιμή 1 έως 3. Το άθροισμα των τιμών αυτών καθορίζει το βαθμό διαφοροποίησης. Αναλυτικότερα νεοπλασματικοί όγκοι με άθροισμα 3-5 κατατάσσονται ως grade 1 (ανωτέρας διαφοροποίησης – εικόνα 2), 6-7 ως grade 2 (μέσης διαφοροποίησης) και 8-9 ως grade 3 (χαμηλής διαφοροποίησης εικόνα 3). Πολλαπλές μελέτες έχουν αναδείξει ότι το ρίσκο απομακρυσμένης μετάστασης και η συνολική επιβίωση είναι σαφώς χειρότερα σε όγκους grade 3 απ' ό,τι σε grade 1 ανεξαρτήτως μεγέθους νεοπλασματος (T) και λεμφαδενικής επέκτασης της νόσου (N). Η χρήση της ιστολογικής διαβάθμισης (grading) κατά Nottingham προτείνεται σε όλους τους διηθητικούς τύπους καρκινώματος του μαστού, ανεξαρτήτως με το εάν κάποιοι ειδικοί τύποι καρκινωμάτων (αδενοειδές κυστικό, σωληνώδες) έχουν ιδιαίτερα ευνοϊκή πρόγνωση.

Χαρακτηριστικό	Score
Παρουσία σωληνίων και αδενίων.	
Στη πλειονότητα του όγκου (>75%).	1
Μέτρια παρουσία (10-75%).	2
Σπάνια ως καθόλου (<10%).	3
Πυρηνικός Πλειομορφισμός.	
Μικρά ομοιόμορφα κύτταρα.	1
Μέτρια αύξηση μεγέθους και ποικιλομορφίας.	2
Εξεσημασμένη ποικιλομορφία μεγέθους/σχήματος.	3
Μιτωτική δραστηριότητα*	
≤7 μιτώσεις ανά 10 πεδία HPF	1
8-14 μιτώσεις ανά 10 πεδία HPF	2
≥15 μιτώσεις ανά 10 πεδία HPF	3
Τελική διαβάθμιση	
Το άθροισμα των επί μέρους παραπάνω score	
Grade 1	3-5
Grade 2	6 ή 7
Grade 3	8 ή 9

Πίνακας 5: Πυρηνική διαβάθμιση κατά Nottingham.
*Η μιτωτική δραστηριότητα αναφέρεται για την πιο συχνή οπτική διάμετρο (0,5mm).



Εικόνα 2: Grade 1 NST καρκίνωμα.

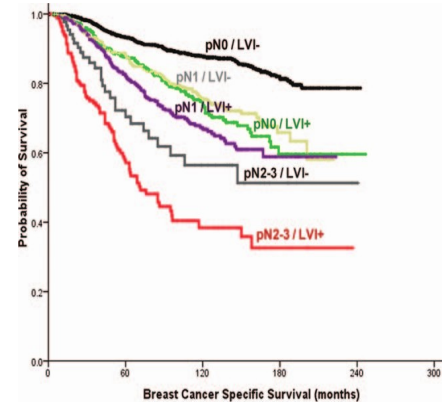


Εικόνα 3: Grade 3 NST καρκίνωμα.

Διήθηση Λεμφαγγείων

Η παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων εντός λεμφαγγειακών χώρων (LVI-lymphovascular invasion) έχει αναδειχθεί από αρκετές μελέτες ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας {Rahka et al}.

Η εντόπιση ενδοαγγειακού νεοπλασματικού εμβόλου έχει ιδιαίτερη σημασία σε pT1 ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες καθότι αναδεικνύει το αυξημένο ρίσκο απομακρυσμένης μετάστασης και λεμφαδενικής διασποράς του νεοπλάσματος σε μια ομάδα ασθενών με, κατά τα άλλα, θετική πρόγνωση (εικόνα 4). Η πλειονότητα των αγγειακών χώρων με παρουσία LVI αποτελείται από λεμφαγγεία και αρκετά σπανιότερα από αιμοφόρα αγγεία. Η παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων είναι καλύτερα να αξιολογείται στον περινεοπλασματικό ιστό.



Εικόνα 4: 20ετής επιβίωση με ή χωρίς LVI ανά στάδιο λεμφαδενικής διασποράς νόσου pN. Ανατύπωση από Rahka et al {Rahka et al}.

Ιστολογική ταξινόμηση

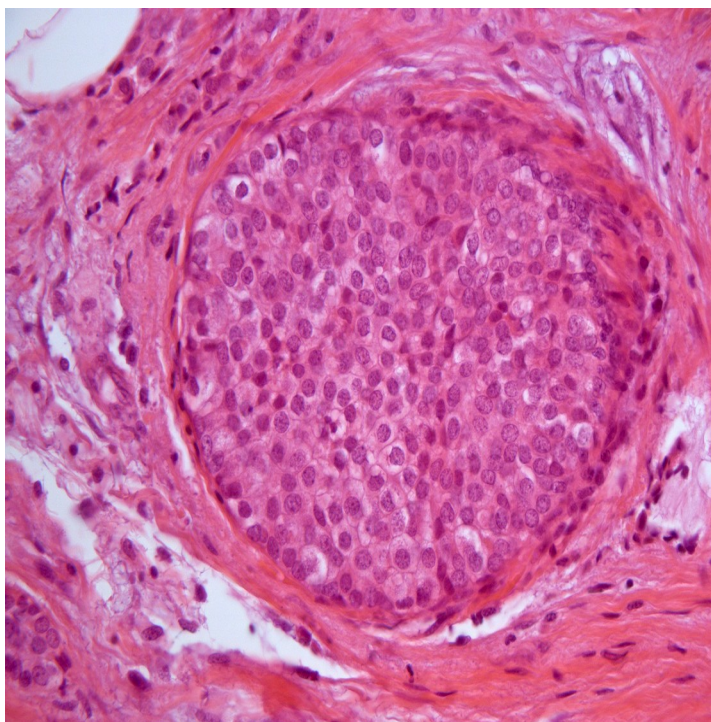
Μη διηθητικά/in situ καρκινώματα του μαστού

Ενδοπορικά πορογενή καρκινώματα (Ductal Carcinoma In Situ / DCIS)

Ο όρος ενδοπορικό καρκίνωμα περικλείει μια ετερογενή ομάδα αλλοιώσεων με διαφορετική κλινική εικόνα, ιστολογικούς χαρακτήρες βιοδείκτες, γενετικές αλλοιώσεις και συνεπώς βιολογική συμπεριφορά. Οι εν λόγω αλλοιώσεις έχουν ωστόσο ως κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία περιορίζονται εντός του συστήματος πόρος - πορολοβιακή μονάδα - λόβιο του μαστού. Συνεπώς το ενδοπορικό καρκίνωμα εμπλέκει τους πόρους και τα λόβια χωρίς επέκταση πέραν της βασικής μεμβράνης. Κλινικώς παρουσιάζεται ως μικροασβεστώσεις κατά τον μαστογραφικό έλεγχο και σπανιότερα υπό τη μορφή ψηλαφητής μάζας, νόσου Paget θηλής, ρύση θηλής ή ως τυχαίο ιστολογικό εύρημα κατά την εκτομή μαζικού παρεγχύματος για άλλους λόγους.

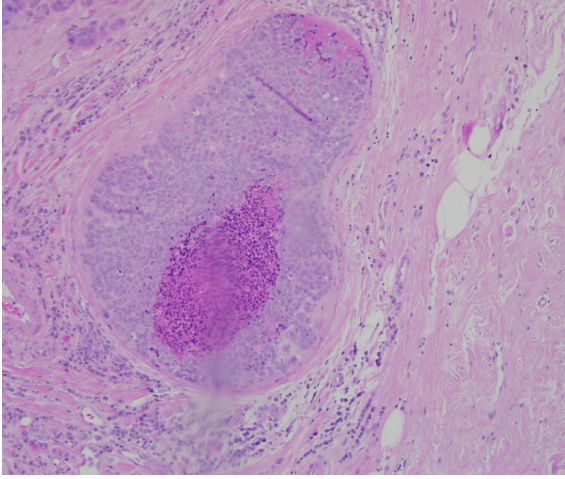
Ιστολογικώς δεν υπάρχει ένα κοινώς αποδεκτό σύστημα για την ταξινόμηση του DCIS. Παραδοσιακά κατατασσόταν με κριτήριο την αρχιτεκτονική μορφολογία του νεοπλάσματος σε πέντε μεγάλες ομάδες: comedo, ηθμοειδές, μικροθηλώδες, θηλώδες και συμπαγές. Παρ' ότι δεν έχει καθιερωθεί ακόμα ως διεθνές στάνταρ η τωρινή ταξινόμηση διαβαθμίζει αυτές τις νεοπλασίες σε 3 ομάδες (χαμηλού, μέτριου, υψηλού βαθμού κακοήθειας DCIS) με βάση την παρουσία νεκρώσεως και το πυρηνικό grade {Schnitt and Collins}.

Το χαμηλόβαθμο DCIS χαρακτηρίζεται από μικρά ομοιόμορφα κύτταρα με σαφώς διακριτή μεμβράνη, μικρό πυρήνα, χρωματίνη ομοιόμορφα κατανομημένη και δυσδιάκριτο πυρήνιο. Παρουσιάζει χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα. Το αρχιτεκτονικό πρότυπο είναι συμπαγές, ηθμοειδές μικροθηλώδες και σπανιότερα θηλώδες. Το ηθμοειδές DCIS σχηματίζει εξωκυττάρους αυλούς εντός της αλλοιώσεως (ηθμούς) με στρογγυλή μορφολογία και περιβαλλόμενους από πολωμένα νεοπλασματικά κύτταρα. Το μικροθηλώδες πρότυπο παρουσιάζει



Εικόνα 5: A&H X 400 Χαμηλόβαθμο ενδοπορικό καρκίνωμα συμπαγούς τύπου.

θηλόμορφες αλλοιώσεις, στερούμενες αγγειοσυνδετικού άξονα, που προβάλλουν εντός του αυλού με διευρυμένη κεφαλή και περιορισμένη βάση (δίκην ροπάλου). Στο συμπαγές πρότυπο οι αυλοί είναι εξ ολοκλήρου κατειλημμένοι από νεοπλασματικά κύτταρα, συχνά παρουσιάζουν μικροκυψελιδικούς χώρους, ροζετοειδείς σχηματισμούς ή γέφυρες (αψίδες) με ομοιόμορφο πάχος κυττάρων (εικόνα 5). Νεκρώσεις παρατηρούνται σπάνια στα χαμηλόβαθμα DCIS υπό τη μορφή κεντρικής comedo τύπου. Οι μικροασβεστώσεις που συχνά αποτελούν απεικονιστικό εύρημα ανευρίσκονται ιστολογικά εντός των αυλικών εκκρίματων, είναι στρογγυλές και ψαμμώδεις.



Εικόνα 6: A&H X 200 Υψηλόβαθμο ενδοπορικό καρκίνωμα με παρουσία comedo νέκρωσης

Το υψηλόβαθμο DCIS αποτελείται από κύτταρα με μεγάλο πλειομορφικό πυρήνα, με φουσαλιδώδη ή «χοντροκομμένη» χρωματίνη και ευδιάκριτο πυρήνιο. Η κεντρική comedo τύπου νέκρωση είναι συχνό εύρημα (εικόνα 6), αλλά όχι προαπαιτούμενο για τη διάγνωση υψηλόβαθμου DCIS. Η έκταση της νέκρωσης μπορεί να φτάσει σε τέτοιο βαθμό ώστε να διασώζονται μόνο ελάχιστες κυτταρικές σειρές στην περιφέρεια πάσχοντος αυλού, προσδίδοντας έτσι το παλαιότερα λεγόμενο

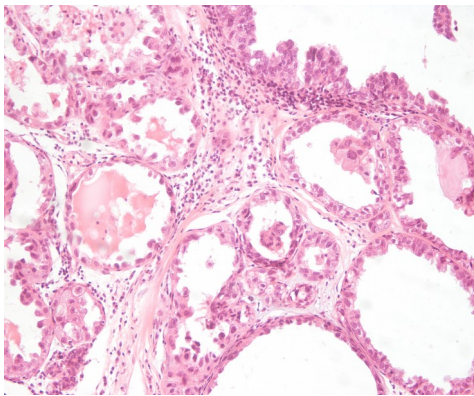
«απαλείφον» τώρα τοιχωματικό (clinging) πρότυπο ανάπτυξης. Συχνότερα όμως, εντός των πασχόντων αυλών, παρατηρούνται ψευδοθημοειδείς και ψευδομικροθηλώδεις σχηματισμοί οι οποίοι στην πραγματικότητα είναι κυτταρικές ομάδες που αποσπώνται από το τοίχωμα του αυλού ως απότοκο της νέκρωσης και κυτταρικής απόπτωσης. Οι απεικονιστικά ανευρεθείσες (γραμμοειδείς, διακλαδιζόμενες ή υπό μορφή εκμαγείου) ασβεστώσεις παρατηρούνται συνήθως εντός της κεντρικής νεκρώσεως και είναι άμορφες. Στο στρώμα που περιβάλλει τους πόρους των υψηλόβαθμων DCIS συχνά παρατηρείται δεσμοπλασία, χρόνια φλεγμονή και νεοαγγειογένεση. Κάποιες φορές η δεσμοπλασία είναι τόσο εκτενής που αποτελεί ψηλαφητό εύρημα.

Η διάγνωση του μέτριου βαθμού DCIS δίδεται όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν πληρούν τα προαναφερθέντα κυτταρολογικά κριτήρια (για χαμηλόβαθμο και υψηλόβαθμο DCIS). Συνήθως αποτελούνται από κύτταρα με σχετικά ευδιάκριτο πυρήνιο και μέτρια πυρηνική πλειομορφία, τόσο στο μέγεθος όσο και στο σχήμα. Το πρότυπο ανάπτυξης είναι ηθμοειδές, μικροθηλώδες, θηλώδες και συμπαγές.

Ειδικοί τύποι DCIS

Λιγότερο συχνά απαντώνται DCIS καρκινώματα που το ιστολογικό grade δεν είναι αρκετό να τα κατατάξει. Το συχνότερο εξ αυτών είναι αποκρινούς τύπου DCIS, χαρακτηριζόμενο από μεγάλο κύτταρο με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και ένα ή περισσότερα πυρήνια. Οι πυρήνες του

μπορεί να είναι χαμηλού, μέτριου και υψηλού βαθμού δυσπλασίας, ενώ μπορεί να παρουσιάσει συμπαγές ηθμοειδές και μικροθηλώδες πρότυπο ανάπτυξης με ή χωρίς comedo νέκρωση.

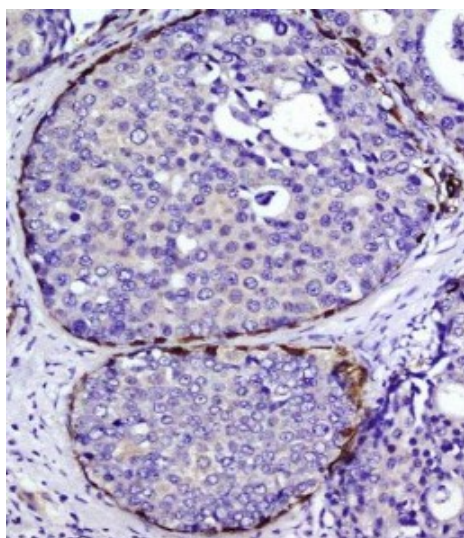


Εικόνα 7: A&H X 200 Κυστικό υπερεκκριτικό καρκίνωμα. Μικροθηλώδεις προσεκβολές από επιθηλιακά κύτταρα και παρουσία κολλοειδούς εκκρίματος.

Αρκετά σπανιότερα απαντάται το κυστικό υπερεκκριτικό καρκίνωμα που χαρακτηρίζεται από κύστες πληρούμενες από ηωσινόφιλο υλικό που μοιάζει ιστολογικά στο κολλοειδές του θυρεοειδούς (εικόνα 7). Οι κύστες επικαλύπτονται από άτυπα επιθηλιακά κύτταρα με μικροθηλώδες και τοιχωματικό πρότυπο ανάπτυξης.

Ανοσοϊστοχημεία DCIS

Τα χαμηλόβαθμα DCIS εκφράζουν έντονα τους ορμονικούς υποδοχείς χωρίς ενίσχυση του HER2+ και έχουν χαμηλό κυτταρικό δείκτη πολλαπλασιασμού, εν αντιθέσει με τα υψηλόβαθμα τα οποία ποικίλλουν στην έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, έχουν υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού και συχνά παρουσιάζουν ενίσχυση του HER2+. Συσσώρευση της p53 πρωτεΐνης (λόγω μεταλλάξεων στο p53) παρατηρείται συχνότερα στα υψηλόβαθμα DCIS. Τα μέτριου βαθμού ως αναμενόμενο είναι πιο ετερογενής όσον αφορά την έκφραση των βιοδεικτών. Ο μόνος βιοδείκτης που έχει κλινική σημασία αυτήν τη στιγμή είναι το ER{Schnitt and Collins}. Ωστόσο σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα



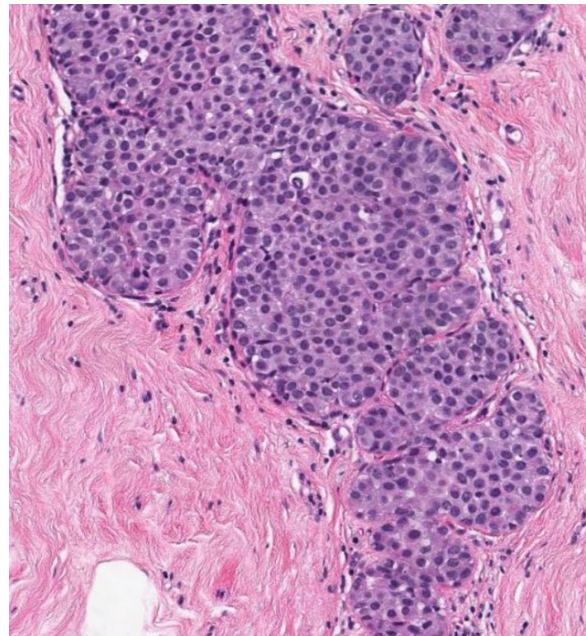
Εικόνα 8: A&H X 200 Η κερατίνη 14 εκφράζεται μόνο στα μωσεπιθήλια.

ενδοπορικά καρκινώματα ανεξαρτήτως πυρηνικού grade είναι αρνητικά στις χρώσεις κερατίνης υψηλού μοριακού βάρους (λ.χ. CK5/6,CK14 - εικόνα 8).

Λοβιακή νεοπλασία

Ο όρος λοβιακή νεοπλασία αναφέρεται σε ολόκληρο φάσμα των άτυπων επιθηλιακών αλλοιώσεων που άρχονται από την τελική πορολοβιακή μονάδα και χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό μικρών (κυρίως), χωρίς συνοχή, επιθηλιακών κυττάρων με ή χωρίς παζετοειδή διασπορά στους τελικούς πόρους. Οι όροι άτυπη λοβιακή υπερπλασία (Atypical Lobular Hyperplasia - ALH) και λοβιακό καρκίνωμα in situ (Lobular Carcinoma InSitu-LCIS) χρησιμοποιούνται ευρέως για την περιγραφή αυτών των αλλοιώσεων. Η διάκριση ανάμεσα σε άτυπη λοβιακή υπερπλασία και το κλασικό λοβιακό καρκίνωμα in situ βασίζεται στην έκταση του νεοπλάσματος στη λοβιακή μονάδα.

Ιστολογικά η λοβιακή νεοπλασία είναι νεοπλασματική ανάπτυξη που αφορά την τελική πορολοβιακή μονάδα και μπορεί να εκτείνεται παζετοειδώς και στους τελικούς πόρους. Οι βλάβες αυτές συνήθως είναι πολυκεντρικές και αμφοτερόπλευρες. Στη χαμηλή μεγέθυνση παρατηρείται διατήρηση της αρχιτεκτονικής των λοβίων με διάταση των αδενοκυψελών, οφειλόμενη στον πολλαπλασιασμό ενός μονόμορφου κυτταρικού πληθυσμού από κύτταρα χωρίς συνοχή (εικόνα 9). Τα εν λόγω κύτταρα έχουν μικρό ομοιόμορφο στρογγυλό πυρήνα με ομοιόμορφη κατανομή της χρωματίνης σε αυτόν και απουσία πυρηνίου. Μερικές φορές αναγνωρίζονται ενδοκυτ-

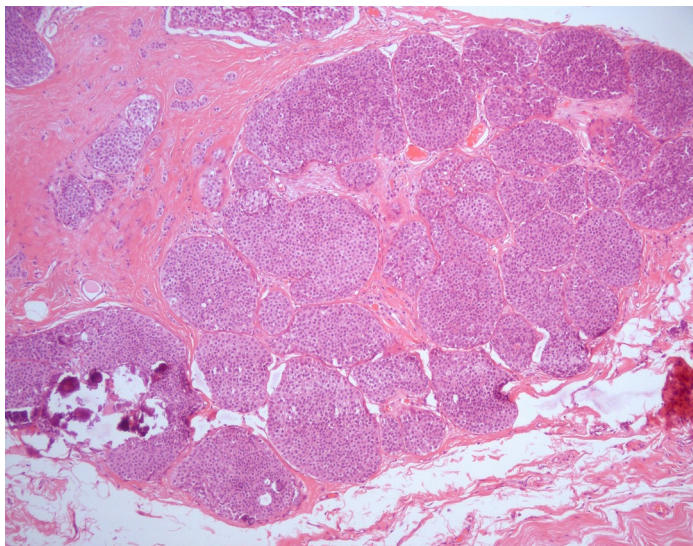


Εικόνα 9: A&E X 200 LCIS. Το νεόπλασμα αποτελείται από μονόμορφο κυτταρικό πληθυσμό με στρογγυλό πυρήνα άνευ πυρηνίου.

ταροπλασματικοί αυλοί που ανάλογα με το μέγεθος τους προσδίδουν μορφολογικούς χαρακτήρες «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου». Το κλασικό λοβιακό καρκίνωμα *in situ* διαγιγνώσκεται όταν πάνω από τις μισές αδενοκυψέλες της λοβιακής μονάδας καταλαμβάνεται από την προηγουμένως περιγραφείσα αλλοίωση. Όταν εμπλέκονται λιγότερες από τις μισές αδενοκυψέλες του λοβίου τότε η διάγνωση είναι εκείνη της άτυπης λοβιακής υπερπλασίας. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί η παζετοειδής διασπορά στον τελικό πόρο του πάσχοντος λοβίου. Συχνά παρατηρούνται LCIS που παρουσιάζουν εκτεταμένη διάταση των αδενοκυψελών και περιοχές με comedo νέκρωση καθώς και περιπτώσεις LCIS κατά τις οποίες τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι ευμεγέθη, πλειόμορφα, εξαιρετικά άτυπα και συνοδεύονται από comedo νέκρωση. Οι τελευταίες περιπτώσεις εμπίπτουν στην κατηγορία του πλειόμορφου LCIS στο οποίο έχει χορηγηθεί από τον Π.Ο.Υ. ξεχωριστός κωδικός ICD-O (γιατί χρήζει διαφορετικής κλινικής αντιμετώπισης).

Μη διθητικό πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα (Pleomorphic LCIS)

Το πλειόμορφο λοβιακό *in situ* καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από κύτταρα τα οποία είναι σαφώς μεγαλύτερα από αυτά που απαντώνται στη λοβιακή νεοπλασία κλασικού τύπου και παρουσιάζουν εκσεσημασμένη πυρηνική πλειομορφία με πυρήνες που ποικίλλουν σε μέγεθος, σχήμα και αριθμό πυρηνίων. Σε κάποιες περιπτώσεις τα κύτταρα παρουσιάζουν αποκρινείς χαρακτήρες με άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 10: A&H X200 Πλειόμορφο LCIS με αποτιτανώσεις (κάτω αριστερά) και παρακείμενο διηθητικό στοιχείο (πάνω αριστερά).

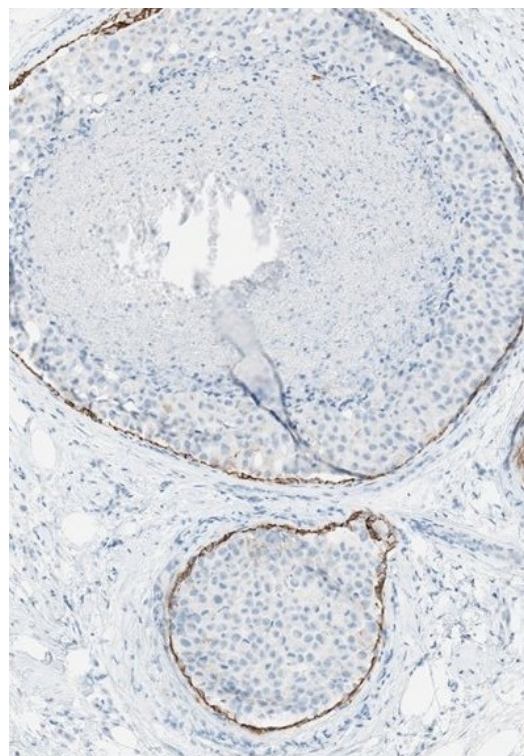
λοβιακή νεοπλασία τα κύτταρα του πλειόμορφου LCIS χάνουν τη μεμβρανική έκφραση της E-Cadherin. Είναι σημαντικό να διαχωρίζεται η παρουσία του πλειόμορφου λοβιακού in situ από τη λοβιακή νεοπλασία, γιατί βιβλιογραφικώς σχετίζεται με τη σύγχρονη παρουσία διηθήσεως. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή μιτωτική δραστηριότητα συνηγορούν υπέρ της αντιμετώπισης αυτών των ασθενών ως επί πορογενούς καρκινώματος in situ.

Ανοσοϊστοχημεία λοβιακής νεοπλασίας και μη διηθητικού πλειόμορφου λοβιακού καρκινώματος (Pleomorphic LCIS)

Τα κύτταρα της κλασικής λοβιακής νεοπλασίας έχουν χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα και εκφράζουν εντόνως και στο σύνολό τους ορμονικούς υποδοχείς ER. Αρκετά πιο σπάνια μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση του HER2 ή/και αλλοιώσεις στο p53. Τα κύτταρα του πλειόμορφου λοβιακού είναι συνήθως ER θετικά αν και συχνά με ισχνότερη χρώση, ενώ στον ιστολογικό τύπο με αποκρινείς χαρακτήρες είναι αρνητικά με παράλληλη έκφραση, όμως, των ανδρογόνων (AR). Επιπρόσθετα τα πλειόμορφα λοβιακά in situ έχουν έντονη μιτωτική δραστηριότητα και μπορεί να παρουσιάσουν ενίσχυση του HER2 και συσσώρευση της πρωτεΐνης p53, ενδεικτικό μετάλλαξης του γονιδίου p53.

Η πιο χαρακτηριστική και αναντίρρητα η πιο καθοριστική ανοσοχρώση των λοβιακών νεοπλασιών (συμπεριλαμβανομένου και του πλειόμορφου LCIS) είναι η απώλεια μεμβρανικής έκφρασης του μορίου κυτταρικής συνοχής E-Cadherin. Επιπρόσθετα παρατηρούνται ανωμαλίες εκφράσεως και σε μέρη του συμπλέγματος κυτταρικής συνοχής

Τα πλειόμορφα LCIS παρουσιάζουν έντονη μιτωτική δραστηριότητα ενώ συχνά απαντώνται εστίες κεντρικής-comedo τύπου νέκρωσης με την κεντρική νέκρωση κάποιες φορές να αποτιτανώνεται (εικόνα 10). Για τη διάγνωση αυτών των νεοπλασμάτων δεν είναι απαραίτητη η παρουσία comedo νέκρωσης. Ο συνδυασμός πλειομορφισμού, μιτώσεων και comedo νέκρωσης εγείρουν την υποψία υψηλόβαθμου DCIS, ωστόσο όπως και στη



Εικόνα 11: E-Cadherin X200. Τα νεοπλάσματα αυτά χαρακτηρίζονται από την απώλεια έκφρασης αυτού του μορίου. Στα LCIS παρατηρείται έκφραση αυτού από τα μοσεπιθήλια.

cadherin-catenin όπως η κυτταροπλασματική έκφραση του p120 (αντί για μεμβρανική) και η απώλεια εκφράσεως της β-catenin (πίνακας 6){Schnitt and Collins}. Η διαταραχή αυτού του συμπλέγματος εκφράζεται ιστολογικά ως η ασθενής κυτταρική συνοχή που χαρακτηρίζει αυτές τις αλλοιώσεις.

Ανοσοχρώση	LCIS	DCIS
E-cadherin	Απουσία μεμβρανικής χρώσης (ή ανώμαλη έκφραση αυτής)	Μεμβρανική χρώση
P120 catenin	Κυτταροπλασματική χρώση	Μεμβρανική χρώση
β-catenin	Απουσία μεμβρανικής χρώσης	Μεμβρανική χρώση

Πίνακας 6: Αναμενόμενη έκφραση E-cadherin, p120 catenin και β-catenin σε LCIS και DCIS. Ανατύπωση από {Schnitt and Collins}.

Διηθητικό καρκίνωμα μαστού

Ως διηθητικό ορίζεται το καρκίνωμα του οποίου τα κύτταρα διασπάνε τη βασική μεμβράνη και εισέρχονται (εκτείνονται) στο περιβάλλον συνδετικολιπώδες υπόστρωμα. Τα αδenoκαρκινώματα του μαστού είναι νεοπλάσματα που προέρχονται κυρίως από κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας (Terminal Ductal Lobular Unit/TDLU). Είναι τα συχνότερα πρωτοπαθή κακοήγη επιθηλιακά νεοπλάσματα. Παρουσιάζουν ποικίλους αρχιτεκτονικούς και κυτταρολογικούς χαρακτήρες οι οποίοι και τα ταξινομούν στους ακόλουθους ιστολογικούς τύπους {WHO;2012}(πίνακας 7).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ	ICD-O
Μη ειδικού ιστολογικού τύπου καρκινώματα	
Διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού ιστολογικού τύπου (Invasive carcinoma of no special type - NST)	8500/3
Πλειόμορφο καρκίνωμα (Pleomorphic carcinoma)	8022/3
Καρκίνωμα με γιγαντοκύτταρα οστεοκλαστικού τύπου (Carcinoma with osteoclast-like stromal giant cells)	8035/3
Καρκίνωμα με χαρακτηρισ χorioκαρκινώματος (Carcinoma with choriocarcinomatous features)	
Καρκίνωμα με μελανοκυτταρικούς χαρακτήρες (Carcinoma with melanotic features)	
Λοβιακά καρκινώματα	
Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive lobular carcinoma)	8520/3
Λοβιακό καρκίνωμα κλασικού τύπου (Classic lobular carcinoma)	
Συμπαγές λοβιακό καρκίνωμα (Solid lobular carcinoma)	
Κυψελιδώδες λοβιακό καρκίνωμα (Alveolar lobular carcinoma)	
Πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα (Pleomorphic lobular carcinoma)	
Σωληνολοβιακό καρκίνωμα (Tubulolobular carcinoma)	
Μικτό λοβιακό καρκίνωμα (Mixed lobular carcinoma)	
Σωληνώδες καρκίνωμα (Tubular carcinoma)	8211/3
Ηθμοειδές καρκίνωμα (Cribriform carcinoma)	8201/3
Βλεννώδες καρκίνωμα (Mucinous carcinoma)	8480/3
Καρκίνωμα με μυελοειδείς χαρακτήρες (Carcinoma with medullary features)	
Μυελοειδές καρκίνωμα (Medullary carcinoma)	8510/3
Άτυπο μυελοειδές καρκίνωμα (Atypical medullary carcinoma)	8513/3
Μη ειδικού τύπου καρκίνωμα με μυελοειδείς χαρακτήρες (Invasive carcinoma NST with medullary features)	8500/3
Καρκίνωμα με αποκρινή διαφοροποίηση (Carcinoma with apocrine differentiation)	
Καρκίνωμα με διαφοροποίηση κυττάρων «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (Carcinoma with signet-ring-cell differentiation)	
Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα (Invasive micropapillary carcinoma)	8507/3

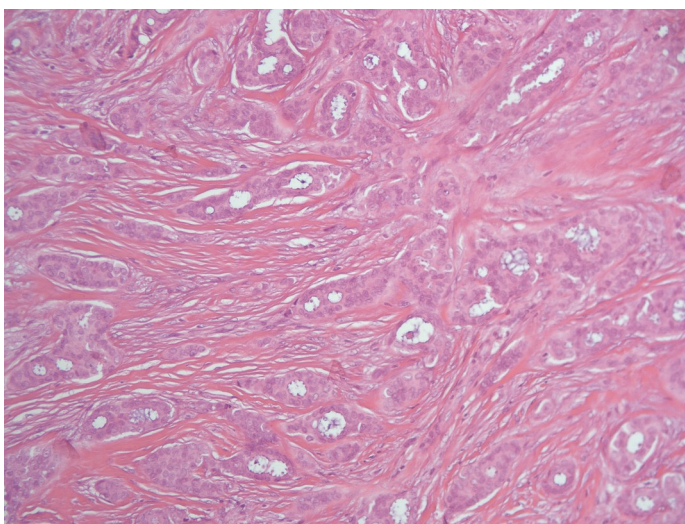
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ	ICD-O
Μεταπλαστικά Καρκινώματα	
Μεταπλαστικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (Metaplastic carcinoma of no special type)	8575/3
Χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοπλάκωδες καρκίνωμα (Low-grade adenosquamous carcinoma)	8570/3
Μεταπλαστικό καρκίνωμα με χαρακτήρες ινωμάτωσης (Fibromatosis-like metaplastic carcinoma)	8572/3
Ακανθοκυτταρικό (εκ πλακωδών κυττάρων) μεταπλαστικό καρκίνωμα (Squamous cell carcinoma)	8070/3
Ατρακτόμορφο μεταπλαστικό καρκίνωμα (Spindle cell carcinoma)	8032/3
Μεταπλαστικό καρκίνωμα με χονδρική μετάπλαση (Metaplastic carcinoma with Chondroid differentiation)	8571/3
Μεταπλαστικό καρκίνωμα με οστική μετάπλαση (Metaplastic carcinoma with Osseous differentiation)	8571/3
Μεταπλαστικό καρκίνωμα με άλλου τύπου μεσεγγηματογενή διαφοροποίηση (Metaplastic carcinoma with other types of mesenchymal differentiation)	8575/3
Μικτό (επιθηλιακό/μεσεγγυματικό) μεταπλαστικό καρκινώμα / Mixed metaplastic carcinoma	8575/3
Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα (Myoepithelial carcinoma)	8982/3
Καρκινώματα με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες	
Νευροενδοκρινής όγκος καλής διαφοροποίησης (Neuroendocrine tumour, well-differentiated)	
Νευροενδοκρινές καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης / μικροκυτταρικό (Neuroendocrine carcinoma, poorly differentiated (small cell carcinoma)	8041/3
Καρκίνωμα με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση (Carcinoma with neuroendocrine differentiation)	8574/3
Σπάνια καρκινώματα	
Εκκριτικό καρκίνωμα (Secretory carcinoma)	8502/3
Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα (Invasive papillary carcinoma)	8503/3
Κυψελιδικό καρκίνωμα (Acinic cell carcinoma)	8550/3
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα (Mucoid carcinoma)	8430/3
Πολύμορφο καρκίνωμα (Polymorphous carcinoma)	8525/3
Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα (Oncocytic carcinoma)	8290/3
Καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια ή λιποεκκριτικό καρκίνωμα (Lipid-rich carcinoma)	8314/3
Γλυκογονοεκκριτικό/διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (Glycogen-rich clear cell carcinoma)	8315/3
Καρκίνωμα εκ σμηγματογόνων αδένων (Sebaceous carcinoma)	8410/3
Επιθηλιακοί-μυοεπιθηλιακοί όγκοι	
Αδενοειδές κυστικό (Adenoid cystic carcinoma)	8200/3
Αδενομυοεπιθηλιώμα με καρκίνωμα (Adenomyoepithelioma with carcinoma)	8983/3
Θηλώδη νεοπλάσματα	

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ	ICD-O
Ενκαψωμένο (ενκαψουλωμένο) θηλώδες καρκίνωμα με διήθηση (Encapsulated papillary carcinoma with invasion)	8504/3
Συμπαγές θηλώδες καρκίνωμα με διήθηση (Solid papillary carcinoma with invasion)	8509/3

Πινάκας 7: Ταξινόμηση κατά Π.Ο.Υ. 2012 (4η έκδοση) {WHO;2012}.

Μη ειδικού τύπου καρκίνωμα (Non Special Type/NST Carcinoma)

Τα μη ειδικού ιστολογικού τύπου καρκινώματα (NST) αντιπροσωπεύουν το 70-80% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Αυτά αποτελούν ένα αρκετά ετερογενές γκρουπ με νεοπλάσματα καθοριζόμενο από την απουσία ιστολογικών χαρακτηριστικών, που θα δικαιολογούσαν τη ταξινόμησή τους ως ειδικού τύπου. Συνεπώς μικροσκοπικά τα NST καρκινώματα δεν παρουσιάζουν

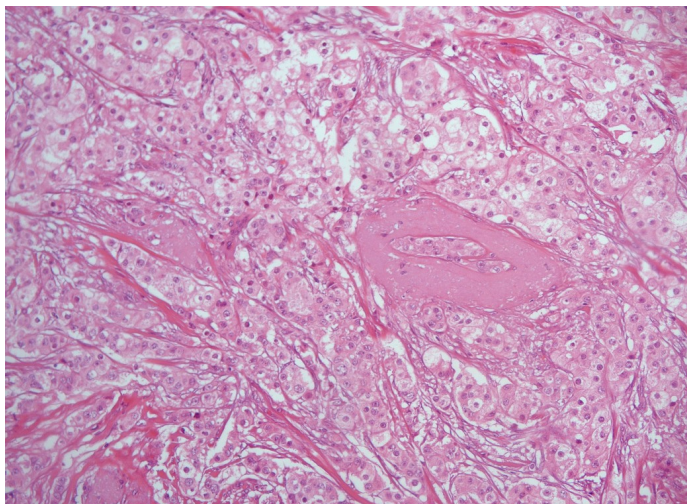


Εικόνα 12: A&H X 200 grade 1 NST καρκίνωμα.

συγκεκριμένη ιστολογική εικόνα. Για να χαρακτηριστεί ένα νεόπλασμα ως μη ειδικού ιστολογικού τύπου (NST) πρέπει οι μη ειδικού τύπου ιστολογικοί χαρακτήρες να καταλαμβάνουν άνω του 50% του νεοπλάσματος (εικόνες 12,13). Όταν έχει ιστολογικούς χαρακτήρες που το κατατάσσουν ως ειδικού ιστολογικού τύπου αλλά παρουσιάζει σε έκταση 10%-49% χαρακτηριστικά NST, τότε ονομάζεται μικτό αδenoκαρκίνωμα. Σε περίπτωση που τα ειδικού τύπου ιστολογικά χαρακτηριστικά καταλαμβάνουν πάνω από το 90% του νεοπλάσματος, τότε το νεόπλασμα ταξινομείται ως ειδικού τύπου {WHO;2012}.

Γίνεται αντιληπτό λοιπόν πως η διάγνωση ενός NST καρκινώματος είναι βασικά μια διαδικασία εξ αποκλεισμού, συνεπώς οι αρχιτεκτονικοί και κυτταρολογικοί χαρακτήρες αυτών των νεοπλασμάτων ποικίλλουν αισθητά. Ένα σχετικά κοινό χαρακτηριστικό που μπορεί να παρατηρηθεί σε αυτούς τους όγκους είναι ότι περίπου το 80% εξ αυτών συνυπάρχει με DCIS, του οποίου το πυρηνικό grade τείνει να είναι ίδιο με αυτό του διηθητικού καρκινώματος. Σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο το 70%-80% των νεοπλασμάτων αυτών εκφράζει ορμονικούς υποδοχείς και 10% με 15% ενίσχυση του HER2. Όλα τα NST καρκινώματα εκφράζουν μεμβρανικά την E-Cadherin, αν και σε κάποιες περιπτώσεις με μειωμένη ένταση.

Στην έκδοση του Π.Ο.Υ. το 2012 αναφέρονται 4 σπάνιοι ιστολογικοί υπό-τυποι. Το πλειομορφικό καρκίνωμα, το καρκίνωμα με γιγαντοκύτταρα οστεοκλαστικού τύπου, το καρκίνωμα με χοριοκαρκινωματώδεις και το καρκίνωμα με μελανοκυτταρικούς χαρακτήρες.



Εικόνα.13: A&H X 200 Grade 3 καρκίνωμα. Εμφανής κυτταρική ατυπία με απουσία αδενικών σχηματισμών.

Στα πλειομορφικά καρκινώματα άνω του 50% των νεοπλασματικών κυττάρων έχουν γιγάντιους πυρήνες με ανώμαλο περίγραμμα και πολλές

πυρηνοκινήσιες. Είναι νεοπλάσματα εξ ορισμού grade 3 και συνοδεύονται από κεντρική νέκρωση. Συνήθως είναι ορμονοαρνητικοί όγκοι με το 20% αυτών να παρουσιάζει ενίσχυση του HER2{Schnitt and Collins}. Λεμφαδενική μετάσταση παρατηρείται στο 50% των περιπτώσεων κατά τη διάγνωση.

Τα καρκινώματα με γιγαντοκύτταρα οστεοκλαστικού τύπου είναι νεοπλάσματα με ινοβλαστικό φλεγμονώδες υπόστρωμα και πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα. Το καρκινωματώδες στοιχείο της αλλοιώσεως είναι συνήθως grade 1 ή 2, ενώ έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις με συνύπαρξη ειδικού τύπου καρκινώματος, κυρίως ηθμοειδούς, σπανιότερα σωληνώδους, αλλά και λοβιακού. Η πρόγνωση του νεοπλάσματος αυτού, προφανώς, καθορίζεται από το καρκινικό στοιχείο. Μεταστατική καρκινωματώδης διήθηση παρατηρείται στο 30% των περιπτώσεων τη στιγμή της διαγνώσεως

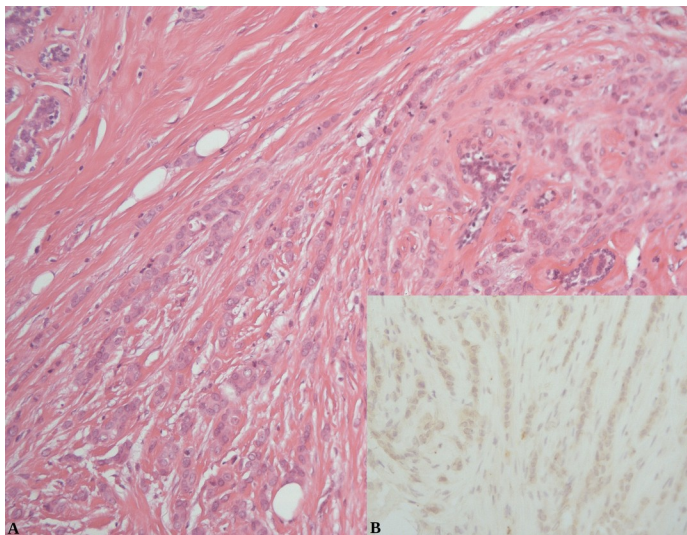
Το καρκίνωμα με χαρακτήρες χοριοκαρκινώματος είναι εξαιρετικά σπάνιο, με λίγες περιπτώσεις αναφερόμενες στη βιβλιογραφία. Αφορά γυναίκες 50-70 ετών με υψηλά επίπεδα hCG. Για τη διάγνωσή του συνιστάται ανοσοϊστοχημικός έλεγχος με hCG που αναδεικνύεται θετικός έναντι των συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων.

Τα καρκινώματα με μελανοκυτταρικούς χαρακτήρες είναι εξαιρετικά σπάνια και φαίνεται να αφορούν συνδυασμούς NST καρκινώματος και μελανώματος. Οι περισσότεροι μελανοκυτταρικοί όγκοι του μαστού είναι απότοκοι μεταστατικού μελανώματος.

Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma-ILC)

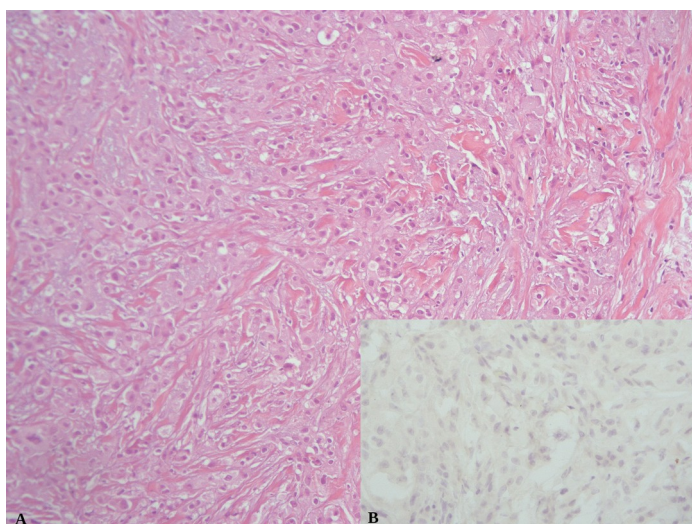
Τα διθητικά λοβιακά καρκινώματα (ILC) του μαστού αποτελούνται από κύτταρα με χαμηλή κυτταρική συνοχή τα οποία αναπτύσσονται διάσπαρτα, μεμονωμένα ή υπό μορφή «φάλαγγας κατ' άνδρα» (indian-file) (εικόνα 14). Τις πιο πολλές φορές συνυπάρχει στοιχείο LCIS. Τα νεοπλάσματα αυτά αντιστοιχούν στο 10%-15% των διθητικών καρκινωμάτων του μαστού και σπάνια συνοδεύονται από αποτιτανώσεις, ενώ υπάρχει χαμηλότερη ευαισθησία στον εντοπισμό κατά τη μαστογραφία.

Ιστολογικά τα λοβιακά καρκινώματα αποτελούνται από νεοπλασματικά κύτταρα με μικρό, αρκετές φορές έκκεντρο, ομοιόμορφο στρογγυλό πυρήνα και λίγο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα μερικές φορές περιέχουν ενδοκυτταροπλασματικούς αυλούς. Κάποιες φορές οι εν λόγω αυλοί μπορεί να είναι τόσο μεγάλοι ώστε να δίνουν την εντύπωση «σφραγιστήρος δακτυλίου», ωστόσο στο κλασικό λοβιακό καρκίνωμα το ποσοστό αυτών των



Εικόνα 14: A: A&H X200: Κλασικό λοβιακό καρκίνωμα. B: Απόλεια έκφρασης E-cadherin (X200).

κυττάρων είναι περιορισμένο. Το νεόπλασμα αναπτύσσεται διαχύτως ή γραμμοειδώς εντός υποστρώματος πυκνού συνδετικού ιστού και συχνά περιβάλλει τους πόρους δημιουργώντας στοχοειδείς (targetoid) σχηματισμούς. Η μιτωτική δραστηριότητα είναι περιορισμένη. Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλάσματα αυτά εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς σε ποσοστό 80-95%, ενώ δεν παρατηρείται ενίσχυση του HER2. Όπως και στο LCIS έτσι και στο ILC μεμβρανική απώλεια έκφρασης της E-Cadherin είναι χαρακτηριστική. Ωστόσο υπάρχει ένα 15% ILC τα οποία εκφράζουν μεμβρανικά το παραπάνω μόριο. Στις περιπτώσεις που ένας νεοπλασματικός όγκος έχει μορφολογικούς χαρακτήρες λοβιακού καρκινώματος αλλά εκφράζει την E-Cadherin, δεν πρέπει να διαγνωστεί ως μη ειδικού τύπου καρκίνωμα αλλά ως λοβιακό.



Εικόνα 15 A: A&H X200: Πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα. B: Απουσία έκφρασης E-Cadherin.

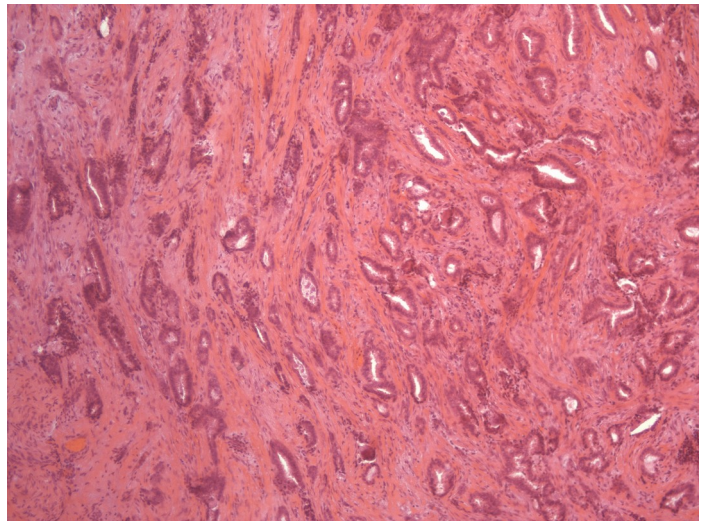
Με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναγνωρίζει πέραν του κλασικού λοβιακού καρκινώματος άλλους 5 υποτύπους (συμπαγής, κυψελιδώδης, σωληνολοβιακός, πλειόμορφος, μικτός) {WHO;2012}. Ο συμπαγής υπότυπος αποτελείται από συμπαγείς νεοπλασματικές αθροίσεις με μικρά κύτταρα στερούμενα κυτταρικής συνοχής. Ο κυψελιδώδης τύπος από μικρά ομοιόμορφα κύτταρα

(στερούμενα και αυτά κυτταρικής συνοχής), τα οποία οργανώνονται σε πολυάριθμες συστάδες άνω των 20 κυττάρων εκάστη. Το σωληνολοβιακό που αναπτύσσεται υπό μορφή σωληνωδών και γραμμοειδών σχηματισμών. Τα εν λόγω νεοπλάσματα εκφράζουν E-Cadherin τόσο στο σωληνώδες στοιχείο όσο και στους γραμμοειδείς σχηματισμούς. Στο πλειόμορφο λοβιακό καρκίνωμα τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα και παρουσιάζουν εξεσημασμένη πυρηνική πλειομορφία

με πυρήνες ποικίλου μεγέθους και σχήματος (εικόνα 15). Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι συχνά αλλά όχι πάντα θετικά στις χρώσεις για ER, PR ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση του HER2. Οι παραπάνω ιστολογικοί υπότυποι μπορούν να συνυπάρξουν μεταξύ τους υπό τη μορφή μικτού λοβιακού καρκινώματος. Συμπληρωματικά, αν και δεν έχουν ICD-O πρέπει να αναφερθούν 2 ιστολογικοί υπότυποι οι οποίοι μπορεί να δημιουργήσουν διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα. Το λοβιακό καρκίνωμα από κύτταρα με χαρακτηρισές «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet ring lobular carcinoma) και το ιστοκυτταροειδές. Ο πρώτος από τους 2 αυτούς υποτύπους πληροίται κατά τη μεγαλύτερή του έκταση από νεοπλασματικά κύτταρα με ευμεγέθεις ενδοκυτταροπλασματικούς αυλούς και έκκεντρο πυρήνα. Ο δεύτερος υπότυπος, το ιστοκυτταροειδές καρκίνωμα, χαρακτηρίζεται από ευμεγέθη κύτταρα με διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης και άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα του νεοπλάσματος είναι θετικά στη GCDFP15 ως επί αποκρινούς διαφοροποίησης.

Σωληνώδες καρκίνωμα

Αποτελεί το 2% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Δεν έχουν σαφείς απεικονιστικούς χαρακτήρες. Τα σωληνώδη καρκινώματα είναι εξ ορισμού grade 1 νεοπλάσματα αποτελούμενα σχεδόν εξ ολοκλήρου (>90%), από νεοπλασματικούς σωληνώδεις μονόστιβους σχηματισμούς (εικόνα 16). Αυτοί οι σχηματισμοί είναι συνήθως γωνιώδεις ή οβάλ, ενώ τα νεοπλασματικά κύτταρα που τους επικαλύπτουν (αλλά και του



Εικόνα 16: A&H X 100: Σωληνώδες καρκίνωμα. Εμφανείς γωνιώδεις σωληνώδεις σχηματισμοί.

υπόλοιπου όγκου) είναι μικρού/μεσαίου μεγέθους, ομοιόμορφα με δυσδιάκριτα πυρήνια και σπάνιες πυρηνοκινησίες. Πολυστιβάδωση, έντονος πυρηνικός πλειομορφισμός ή υψηλή μιτωτική δραστηριότητα είναι αποτρεπτικά στοιχεία για την παραπάνω διάγνωση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι σχεδόν πάντα έντονα θετικά για τους οιστρογονικούς υποδοχείς και φέρουν ενίσχυση του HER2. Τα εν λόγω καρκινώματα χορηγούν σπανίως μετάσταση σε λεμφαδένες (≈10%) και έχουν εξαιρετική πρόγνωση με 10ετή επιβίωση από 93-100%

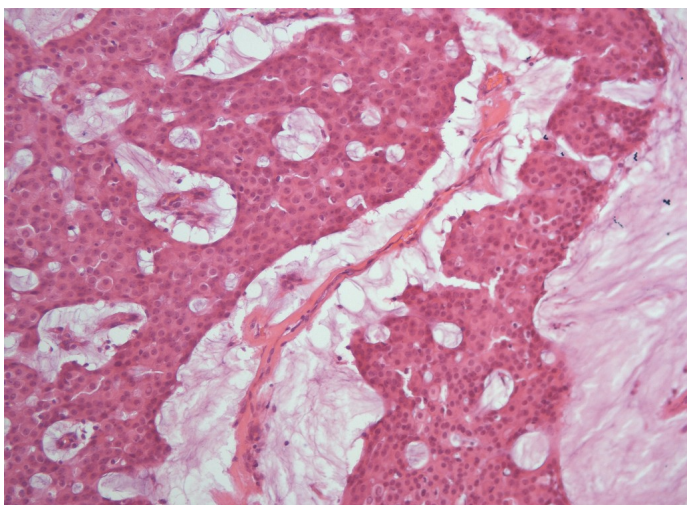
Διηθητικό ηθμοειδές καρκίνωμα

Αποτελεί το 0,3-4% των καρκινωμάτων του μαστού με μέση ηλικία προσβολής τα 55 χρόνια. Απεικονιστικά μπορεί να είναι δυσδιάκριτο, ενώ παρουσιάζει πολυεστιακότητα σε ποσοστό 10-20%. Ιστολογικά το νεόπλασμα παρουσιάζει σε έκταση μεγαλύτερη του 90% ηθμοειδές πρότυπο ανάπτυξης. Για την ασφαλή διάκρισή του από το ενδοπορικό ηθμοειδές

καρκίνωμα σκόπιμος κρίνεται ο έλεγχος της απουσίας μυοεπιθηλίων κατά την περιφέρεια των νεοπλασματικών βλαστών, που τεκμηριώνεται ανοσοϊστοχημικά. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μικρού/μεσαίου μεγέθους, ομοιόμορφα, με δυσδιάκριτα πυρήνια και ισχνή μιτωτική δραστηριότητα. Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι θετικά σε οιστρογόνα και προγεστερόνη, ενώ δεν παρουσιάζουν ενίσχυση του HER2. Το εν λόγω νεόπλασμα μπορεί να συνυπάρχει με σωληνώδες καρκίνωμα. Στην περίπτωση που τα νεοπλασματικά στοιχεία του σωληνώδους καρκινώματος είναι έως 50%, το νεόπλασμα διαγιγνώσκεται ως ηθμοειδές καρκίνωμα. Το ηθμοειδές καρκίνωμα παρουσιάζει άριστη πρόγνωση με 10ετή επιβίωση που κυμαίνεται από το 90-100%.

Βλεννώδες καρκίνωμα

Τα νεοπλάσματα αυτά αντιπροσωπεύουν στο 2% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού και εμφανίζονται συνήθως σε ηλικίες άνω των 55 ετών. Απεικονιστικά μπορεί να ομοιάζουν με καλοήγη βλάβη. Το βλεννώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται ιστολογικά από την παρουσία νεοπλασματικών βλαστών εντός λιμνών εξωκυττάριας βλέννης. Η πυρηνική ατυπία συνήθως είναι χαμηλή και οι μιτώσεις σπάνιες. Ωστόσο, σε σπάνιες περιπτώσεις, τόσο η ατυπία όσο και η μιτωτική δραστηριότητα μπορεί να είναι υψηλές. Σπανιότερα είναι πιθανό να ανευρεθεί μικροθηλώδης διαφοροποίηση εντός του νεοπλάσματος, η οποία και πρέπει να αναφέρεται στην ιστολογική έκθεση {Hicks D}.

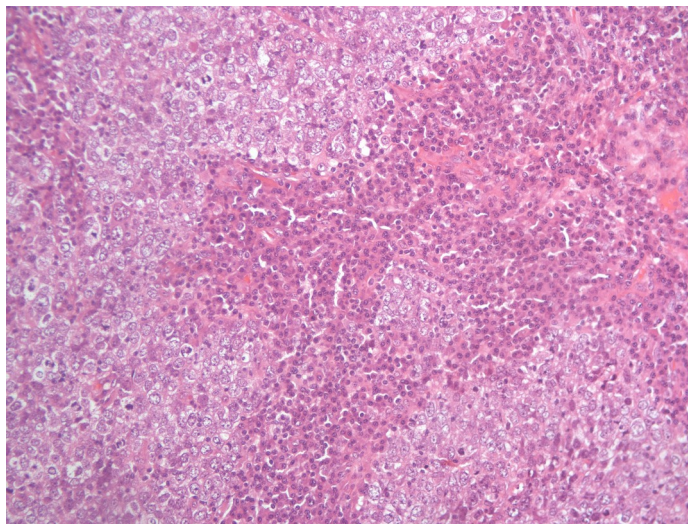


Εικόνα 17: A&H X 200: Βλεννώδες καρκίνωμα κυτταροβριθούς ιστολογικού τύπου.

Τα βλεννώδη νεοπλάσματα χωρίζονται σε 2 ιστολογικούς υποτύπους ανάλογα με την ποσότητα βλέννης, την κυτταροβριθείά τους και τη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση που παρουσιάζουν. Διαχωρίζονται σε τύπου Α «κλασικού τύπου» που δεν παρουσιάζουν νευροενδοκρινή δραστηριότητα και είναι ολιγοκυτταρικά με άφθονη βλέννη και τα τύπου Β «κυτταροβριθή» με περιορισμένη ποσότητα βλέννης (εικόνα 17), κυτταροβριθεία και συχνή έκφραση χρωμογρανίνης και συνοπτοφυσίνης. Συνήθως τα βλεννώδη καρκινώματα του μαστού παρουσιάζονται με μη ειδικού ιστολογικού τύπου καρκίνωμα. Για να τεθεί η διάγνωση του βλεννώδους καρκινώματος, το ποσοστό του βλεννώδους στοιχείου πρέπει να ξεπερνάει το 90%. Ανοσοϊστοχημικά συνήθως εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς χωρίς ενίσχυση του HER2. Η πρόγνωση του βλεννώδους καρκινώματος είναι εξαιρετική με την 10ετή επιβίωση να κυμαίνεται από 80-100%.

Καρκίνωμα με μυελοειδείς χαρακτήρες

Τα καρκινώματα αυτά περιλαμβάνουν τα μυελοειδή, τα άτυπα μυελοειδή καρκινώματα και τα καρκινώματα μη ειδικού τύπου (NST) με μυελοειδείς χαρακτήρες. Όλα τα παραπάνω νεοπλάσματα παρουσιάζουν κάποια (ή όλα) από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: απωθητικά όρια νεοπλάσματος, συγκυτιακό πρότυπο ανάπτυξης, grade 3 πυρήνες και εκτενές λεμφοκυτταρικό διήθημα (εικόνα 18).



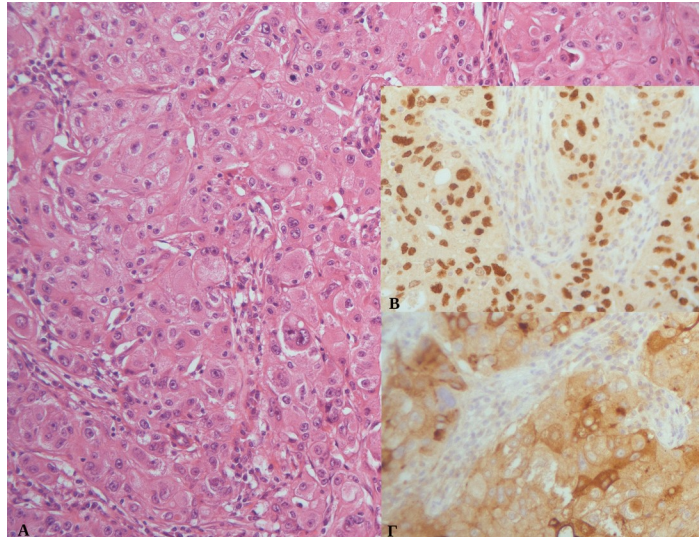
Εικόνα 18: A&H X200: NST καρκίνωμα με μυελοειδείς χαρακτήρες. Τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν συγκύτια σε έδαφος λεμφοπλασματοκυτταρικής φλεγμονής.

Επιδημιολογικά αυτά τα καρκινώματα αντιστοιχούν στο <math><1\%</math> των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Η μέση ηλικία διάγνωσης ποικίλλει από 45 στα 52 χρόνια, ενώ ένα 25% παρατηρείται σε άτομα κάτω των 35 ετών.

Τα ιστολογικά κριτήρια που είχαν καθιερωθεί για τον καθορισμό ενός καρκινώματος ως μυελοειδούς είναι η συσχυτιακή αρχιτεκτονική στο >75% του νεοπλάσματος, τα απωθητικά όρια του όγκου, η παντελής έλλειψη σωληνωδών σχηματισμών, η εξεσημασμένη παρουσία λεμφοπλασματοκυτταρικής φλεγμονής στο στρώμα του όγκου και τα ευμεγέθη νεοπλασματικά κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα και έντονη πυρηνική ατυπία. Οι όροι άτυπο μυελοειδές καρκίνωμα και καρκίνωμα με μυελοειδείς χαρακτήρες έχουν προταθεί για τους όγκους που δεν πληρούν κάποια από αυτά τα κριτήρια. Δεδομένου ότι τα εν λόγω κριτήρια είναι δύσκολο να εφαρμοστούν, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας προτείνει την ομαδοποίηση των παραπάνω νεοπλασμάτων στη γενική κατηγορία των καρκινωμάτων με μυελοειδείς χαρακτήρες. Συνήθως τα καρκινώματα με μυελοειδείς χαρακτήρες (όλες πλέον οι προαναφερθείσες κατηγορίες) δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς ούτε HER2. Αντιθέτως, μπορεί να εκφράζουν κάποια από τα CK5, CK14, EGFR και SMA. Παραδοσιακά το μυελοειδές καρκίνωμα είχε εξαιρετική συμπεριφορά, ωστόσο λόγω της χαμηλής αναπαραγωγιμότητας των διαγνωστικών του κριτηρίων συμπεριλαμβάνεται πλέον στην ομάδα των καρκινωμάτων με μυελοειδείς χαρακτήρες και θεραπεύεται ως τριπλά αρνητικό καρκίνωμα. Η παρουσία όμως της λεμφοπλασματοκυτταρικής φαίνεται να σχετίζεται με την καλύτερη πρόγνωση των καρκινωμάτων με μυελοειδείς χαρακτήρες {WHO;2012}.

Καρκίνωμα με αποκρινείς χαρακτήρες

Η αποκρινής διαφοροποίηση συναντάται στο μη ειδικού τύπου, στο λοβιακό αλλά και σε άλλους ιστολογικούς τύπους. Συνεπώς ο όρος καρκίνωμα με αποκρινείς χαρακτήρες αφορά ένα αρκετά ετερογενές γκρουπ νεοπλασμάτων. Τα καρκινώματα με αποκρινείς χαρακτήρες σχεδόν καθ' όλη την έκτασή τους είναι 4%. Τα κλινικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά αυτών των νεοπλασμάτων είναι όμοια με εκείνα του μη ειδικού τύπου καρκινώματος του μαστού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα αυτής της οντότητας έχουν μεγάλους υποστρόγγυλους πυρήνες με ευδιάκριτα πυρήνια. Παρουσιάζουν άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα με κοκκιώδη, ομοιογενή ή αφρώδη μορφολογία.

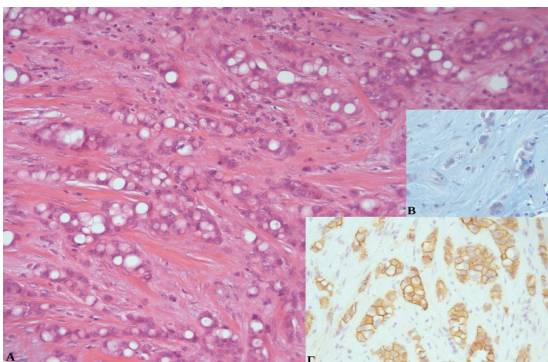


Εικόνα 19: Α: A&H X200: Καρκίνωμα με αποκρινείς χαρακτήρες. Β: Έντονη έκφραση ανδρογονικών υποδοχέων (X400). Γ: Έντονη έκφραση GCDFP-15.

Ανοσοϊστοχημικά στις περιοχές των όγκων με αποκρινή διαφοροποίηση τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν ανδρογόνα (AR) και GCDFP15 (εικόνα 19) αλλά όχι ER και PR και BCL2, ενώ η υπερέκφραση του HER2 απαντάται στο 50% των περιπτώσεων. Οι νεοπλασματικοί όγκοι που εκφράζουν AR σε συνδυασμό με την ενίσχυση του HER2 και την απουσία χρώσεως έναντι των ER, PR εμφανίζουν έντονα αποκρινείς χαρακτήρες. Η πρόγνωση των καρκινωμάτων με αποκρινείς χαρακτήρες είναι όμοια με εκείνη των NST.

Ανοσοϊστοχημικά στις περιοχές των όγκων με αποκρινή διαφοροποίηση τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν ανδρογόνα (AR) και GCDFP15 (εικόνα 19) αλλά όχι ER και PR και BCL2, ενώ η υπερέκφραση του HER2 απαντάται στο 50% των περιπτώσεων. Οι νεοπλασματικοί όγκοι που εκφράζουν AR σε συνδυασμό με την ενίσχυση του HER2 και την απουσία χρώσεως έναντι των ER, PR εμφανίζουν έντονα αποκρινείς χαρακτήρες. Η πρόγνωση των καρκινωμάτων με αποκρινείς χαρακτήρες είναι όμοια με εκείνη των NST.

Καρκίνωμα με κύτταρα «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου»



Εικόνα 20 Α: A&H X200: Καρκίνωμα με χαρακτήρες signet ring. Β: Ενδοκυττάρια βλέννη (Al.Blue). Γ: Έκφραση E-Cadherin.

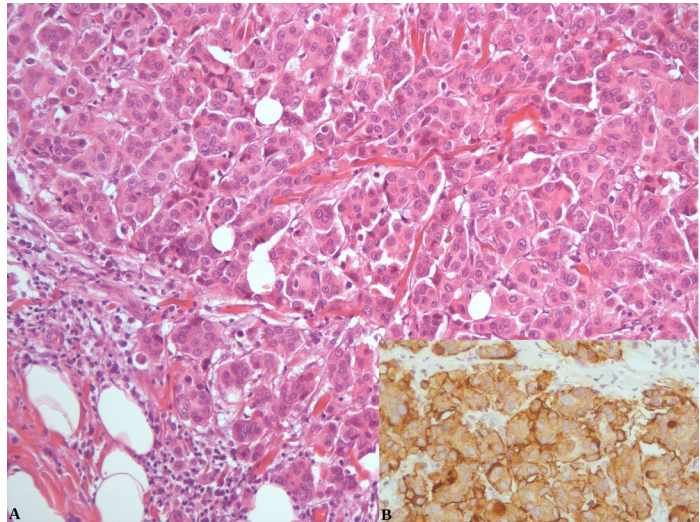
Νεοπλάσματα χαρακτηριζόμενα από τη παρουσία άφθονης ενδοκυττάριας βλέννης που εκτοπίζει τον πυρήνα στην άκρη μεταβάλλοντας τη μορφολογία του κυττάρου σε «δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου» (signet ring). Τα νεοπλάσματα του μαστού που αποτελούνται εξ ολοκλήρου από signet ring κύτταρα είναι εξαιρετικά σπάνια και συνήθως αφορούν τον signet ring υπότυπο του λοβιακού καρκινώματος. Οι εναπομείνουσες σπανιότητες περιπτώσεις (E-Cadherin+) ομοιάζουν με το χαμηλής κυτταρικής συνοχής καρκίνωμα του στομάχου (εικόνα 20). Τα νεοπλάσματα αυτά συχνά εκφράζουν ER, PR και GCDFP15.

Μικροθηλώδες διηθητικό καρκίνωμα

Τα νεοπλάσματα αυτά υπολογίζονται σε λιγότερο του 2% των καρκινωμάτων του μαστού, ωστόσο περιοχές με μικροθηλώδες πρότυπο ανάπτυξης έχουν παρατηρηθεί σε 7,4% των

καρκινωμάτων του μαστού (NST). Η μέση ηλικία εμφάνισης δεν διαφέρει από αυτήν των NST καρκινωμάτων {WHO;2012}.

Ιστολογικά τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν ολιγοκυτταρικές συστάδες περιβαλλόμενες από άδειο στρωματικό χώρο δίδοντας την εντύπωση, κατά τη μικροσκόπηση, πως αιωρούνται σε κενό χώρο. Οι συστάδες αυτές σε αντίθεση με τις θηλές δεν φέρουν αγγειακό άξονα. Χαρακτηριστικά οι νεοπλασματικές συστάδες επιδεικνύουν ένα ανεστραμμένο πρότυπο «μέσα-έξω» κατά το οποίο η



Εικόνα 21 Α:Α&Η Χ 200: μικροθηλώδες καρκίνωμα. Β: Περιφερική (εντονότερη) χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων.

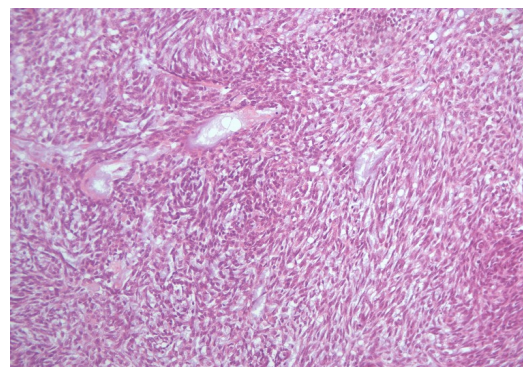
προσαύλια επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων είναι στραμμένη προς το εξωτερικό της συστάδας, κάτι που γίνεται εμφανές ανοσοϊστοχημικά με τη χρώση EMA που βάφει μόνο την προσαύλια επιφάνεια των κυττάρων (εικόνα 21). Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και μέτρια πυρηνική πολυμορφία. Η μιτωτική τους δραστηριότητα κυμαίνεται από ήπια έως μέτρια. Συχνά παρατηρούνται ενδοαγγειακά νεοπλασματικά έμβολα.

Η πλειονότητα των νεοπλασμάτων αυτών είναι ER και PR θετικά ($\approx 70\%$), ενώ ενίσχυση του HER2 επιδεικνύει το 30%. Κατά τη διάγνωση, 50%-90% των όγκων αυτών έχει χορηγήσει ήδη μετάσταση σε λεμφαδένες. Η πρόγνωση κατά στάδιο δεν διαφέρει από εκείνη των NST καρκινωμάτων.

Μεταπλαστικό καρκίνωμα

Στην κατηγορία των μεταπλαστικών καρκινωμάτων συγκεντρώνεται ένα εξαιρετικά ετερόλογο γκρουπ διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, στο οποίο τμήμα των νεοπλασματικών αδενικών κυττάρων έχει υποστεί μετάπλαση σε άλλο μη αδενικού επιθηλιακού τύπου κύτταρο (λ.χ. πλακώδους) ή μεσεγγυματογενές (ατρακτοκυτταρικό, χονδροειδές, οστικό κ.λ.π.).

Σε μερικές περιπτώσεις η μετάπλαση είναι τόσο εκτεταμένη που δεν αναγνωρίζεται υπολειμματικό στοιχείο αδενοκαρκινώματος. Τα μεταπλαστικά καρκινώματα είναι σχετικά σπάνια και αφορούν <1% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού.



Εικόνα 22: Α&Η Χ200: Ατρακτοκυτταρικό μεταπλαστικό καρκίνωμα.

Οι ιστολογικοί υπότυποι ταξινομούνται ανάλογα

με το μεταπλασθέν τους στοιχείο. Με βάση το τελευταίο αναγνωρίζονται οι παρακάτω: Χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοπλακώδες καρκίνωμα, ατρακτόμορφο μεταπλαστικό καρκίνωμα (εικόνα

22), μεταπλαστικό καρκίνωμα με χαρακτήρες ινωμάτωσης (εικόνα 23), πλακώδες μεταπλαστικό καρκίνωμα (εικόνα 24), μεταπλαστικό καρκίνωμα με χονδρική μετάπλαση, μεταπλαστικό καρκίνωμα με οστική μετάπλαση, μεταπλαστικό καρκίνωμα με άλλου τύπου μεσεγγυματογενή διαφοροποίηση, μικτό (επιθηλιακό /μεσεγγυματικό) μεταπλαστικό καρκίνωμα και μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα {WHO;2012}.

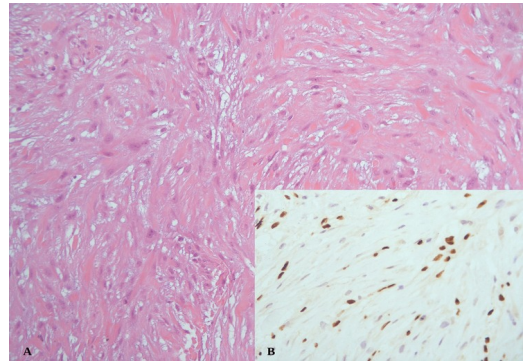
Ανοσοϊστοχημικά η συντριπτική πλειονότητα αυτών των νεοπλασμάτων δεν εκφράζει ορμονικούς υποδοχείς και HER2. Πολλά εξ αυτών είναι ανοσοθετικά έναντι των αντισωμάτων CK5, CK14, CK17 , EGFR και p63/p40.

Παρ' ότι είναι ευμεγέθη νεοπλάσματα, σπάνια χορηγούν μετάσταση σε λεμφαδένες. Τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας αδενοπλάκωδη και μεταπλαστικά καρκινώματα με χαρακτήρες ινωμάτωσης παρουσιάζουν ευνοϊκή πρόγνωση.

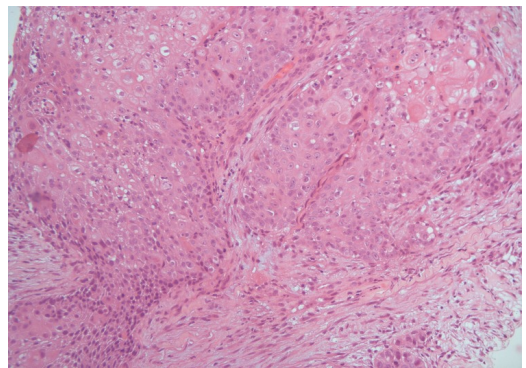
Καρκινώματα με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες

Τα καρκινώματα με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση παρουσιάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά με τους νευροενδοκρινείς όγκους του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού συστήματος. Όλοι οι νεοπλασματικοί όγκοι εκφράζουν νευροενδοκρινείς δείκτες σε μικρό ή μεγάλο βαθμό. Τα μη ειδικού τύπου καρκινώματα του μαστού (NST) (εικόνα 25) ως και κάποια ειδικού τύπου (βλενώδες τύπου B) μπορεί να εκφράσουν νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Τα νεοπλάσματα αυτά αφορούν λιγότερο του 1% των καρκινωμάτων του μαστού και συνήθως απαντώνται στην 6^η 7^η δεκαετία. Ιστολογικά διακρίνονται 3 διαφορετικοί υπότυποι: ο νευροενδοκρινής όγκος καλής διαφοροποίησης, το νευροενδοκρινές καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης/μικροκυτταρικό καρκίνωμα και το διθητικό καρκίνωμα του μαστού με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση {WHO;2012}.

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι καλής διαφοροποίησης αποτελούνται από πυκνές κυτταρικές φωλεές ή δοκίδες νεοπλασματικών κυττάρων με πρισματική/ πλασματοκυταροειδή μορφολογία, που διαχωρίζονται από λεπτά διαφραγμάτια αγγειοϊνώδους συνδετικού ιστού. Η ιστολογική εικόνα είναι πανομοιότυπη με εκείνη των καρκινοειδών στο γαστρεντερικό και το αναπνευστικό σύστημα. Μπορεί να συνυπάρχει ενδοπορικό καρκίνωμα με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά.

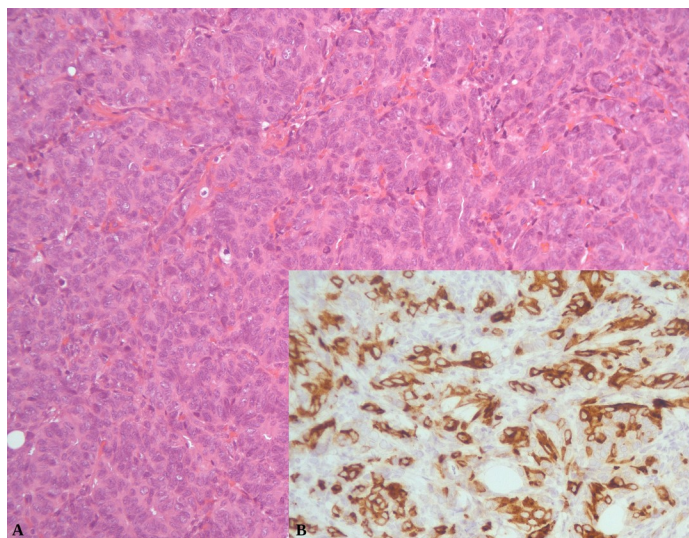


Εικόνα 23: A:A&H X200: Μεταπλαστικό καρκίνωμα με χαρακτήρες ινωμάτωσης. B: Θετικότητα έναντι του p63.



Εικόνα 24: A&H X200: Μεταπλαστικό καρκίνωμα με εμφανείς πλακώδεις χαρακτήρες.

Τα νευροενδοκρινή καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης είναι αδύνατο να ξεχωρίσουν μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά από τα ομόλογά τους μεταστατικά καρκινώματα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι μικρά υπερχρωματικά με πολλές πυρηνοκινήσιες και διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης. Μπορεί να συνυπάρχει ενδοπορικό καρκίνωμα με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και ενδοαγγειακά έμβολα



Εικόνα 25: A&H X200: NST καρκίνωμα με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες. Β: Έκφραση της συναπτοφυσίνης από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Στα μη ειδικού ιστολογικού τύπου διηθητικά καρκινώματα του μαστού μπορεί να παρατηρηθεί νευροενδοκρινής διαφοροποίηση σε ποσοστό 30%. Σε ειδικού τύπου καρκινώματα παρατηρείται στο κυτταροβριθές (τύπου B) βλενώδες καρκίνωμα και στο συμπαγές θηλώδες καρκίνωμα. Ανοσοϊστοχημικά οι χαμηλόβαθμοι νευροενδοκρινείς όγκοι εκφράζουν chromogranin (50%), synaptophysin (16%), ενώ το NSE εκφράζεται απ' όλα τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα. Ορμονικοί υποδοχείς εκφράζονται από την πλειονότητα των χαμηλόβαθμων νευροενδοκρινών όγκων {WHO;2012}.

Εκκριτικό καρκίνωμα

Τα νεοπλάσματα αυτά αντιστοιχούν σε λιγότερο από 0,15% των καρκινωμάτων του μαστού. Εμφανίζονται σε νεαρές ηλικίες (μέση ηλικία 25 έτη). Παρουσιάζονται ως υποθηλαίες περιγράπτες, ευκίνητες μάζες που μπορεί να ομοιάζουν με ινοαδένωμα απεικονιστικά. Το νεόπλασμα αυτό σπανιότερα απαντάται σε μεγαλύτερες ηλικίες, αλλά και σε άντρες.

Ιστολογικά τα νεοπλάσματα αυτά συνήθως έχουν απωθητικό πρότυπο ανάπτυξης. Τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν αδένια, συμπαγείς περιοχές, κυψελίδες και μικροκυστικές δομές. Στους αυλούς αυτών των δομών συνήθως απαντάται ηωσινόφιλο PAS+ έκκριμα. Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν ελάχιστο πυρηνικό πλειομορφισμό, σπάνιες μιτώσεις και έχουν άφθονο μικροκοκκώδες ή φυσαλιδώδες κυτταρόπλασμα. Η συνύπαρξη ενδοπορικού καρκινώματος με όμοια ιστολογικά χαρακτηριστικά είναι συχνή.

Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι ορμονοαρνητικά και δεν επιδεικνύουν ενίσχυση του HER2. Εκφράζουν EMA, S100, mamoglobin, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί έκφραση του GCDFP15. Το νεόπλασμα αυτό σχετίζεται με ETV6-NTRK3 γονιδιακή σύντηξη {Palazzo J}.

Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα

Τα διηθητικά θηλώδη καρκινώματα του μαστού είναι εξαιρετικά σπάνια νεοπλάσματα, οι διηθητικές φωλεές των οποίων αποτελούνται από ινοαγγειακό άξονα. Δεδομένου ότι τα κριτήρια

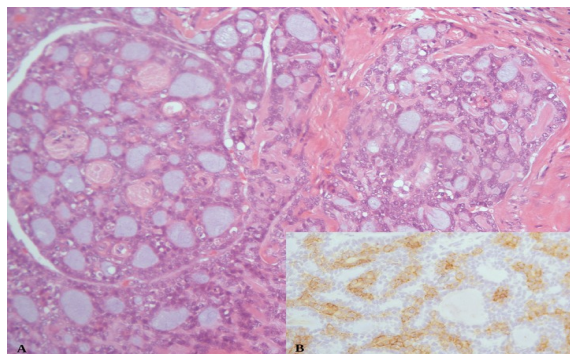
ταξινόμησης αυτών των νεοπλασμάτων δεν ήταν σαφώς καθορισμένα στο παρελθόν, δεν υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία {WHO;2012}.

Κυψελιδικό καρκίνωμα

Άριστης πρόγνωσης καρκίνωμα, όμοιο με το αντίστοιχο της παρωτίδας. Είναι εξαιρετικά σπάνια νεοπλάσματα με λιγότερες από 20 περιπτώσεις αναρτημένες στη διεθνή βιβλιογραφία. Αποτελείται από νεοπλασματικά κύτταρα με διαυγές κυτταρόπλασμα με παρουσία ηωσινόφιλων κοκκίων που ομοιάζουν με αυτά των κυττάρων Paneth. Τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν μικροαδενικούς μικροκυστικούς σχηματισμούς ή/και συμπαγείς φωλεές. Δεν έχει αναφερθεί θάνατος από το νεόπλασμα για καμία από τις αναφερόμενες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία {WHO;2012}.

Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα

Αδενοειδές κυστικό είναι ένα σπάνιο καρκίνωμα που αποτελεί το 0,1% όλων των καρκινωμάτων του μαστού. Είναι μορφολογικά όμοιο με το ομώνυμό του στους σιελογόνους αδένες. Παρουσιάζεται συνήθως κατά την 6^η με 7^η δεκαετία. Ιστολογικά πρόκειται για διφασικό νεόπλασμα με επιθηλιακό και μυοεπιθηλιακό στοιχείο. Το επιθηλιακό στοιχείο σχηματίζει ηθμούς, συμπαγείς φωλεές και δοκίδες, όλα με παρουσία αυλών και ψευδοαυλών. Οι ψευδοαυλοί περιέχουν μιξοειδές υλικό και περιβάλλονται από το μυοεπιθηλιακό στοιχείο. Η περινευρική διήθηση είναι συχνό εύρημα. Το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα του μαστού σπάνια χορηγεί μετάσταση σε λεμφαδένες.



Εικόνα 26: A: A&H X200: Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα. B: Διφασικό πρότυπο ανοσοχρώσης από το CD117 που εκφράζεται μόνο στα προσάυλια κύτταρα.

Ανοσοϊστοχημικά οι όγκοι αυτοί είναι ER-, PR-, HER2-. Παρατηρείται έκφραση του CD117 (εικόνα 26). Τα νεοπλάσματα αυτά χαρακτηρίζονται από τη γονιδιακή σύντηξη MYB-NFIB. Η πρόγνωση είναι εξαιρετική {Palazzo J}.

Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα

Πρωτοπαθές καρκίνωμα του μαστού που ομοιάζει ιστολογικά με το αντίστοιχο καρκίνωμα των σιελογόνων πόρων. Αντιστοιχεί στο 3% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Ιστολογικά αποτελείται από κυστικούς χώρους πληρούμενους από βλέννη, επιδερμοειδή κύτταρα και βλεννοκύτταρα τα οποία είναι άλλοτε διάσπαρτα και άλλοτε σχηματίζουν φωλεές. Η πρόγνωση σχετίζεται με το grade του εν λόγω νεοπλάσματος το οποίο λαμβάνει υπ' όψιν περινευρική διήθηση, κυστικό περιεχόμενο άνω του 20%, νεκρώσεις, αναπλασία και αριθμό μιτώσεων (άνω των 4 ανά ΜΟΠ) {WHO;2012}.

Πολύμορφο καρκίνωμα

Νεοπλασματικός όγκος με ιστολογικούς χαρακτήρες όμοιους με το πολύμορφο καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας των σιελογόνων αδένων. Είναι εξαιρετικά σπάνιο νεόπλασμα με ελάχιστες περιγραφές περιπτώσεων στη διεθνή βιβλιογραφία. Το νεόπλασμα παρουσιάζει διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης με δημιουργία συμπαγών φωλεών, ηθμών και γραμμοειδών σχηματισμών που κάποιες φορές δημιουργούν στοχοειδή σχέδια, ομοιάζοντα με εκείνα του λοβιακού καρκινώματος. Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλάσματα αυτά δεν εκφράζουν ER, PR HER2. Είναι όμως θετικά έναντι των χρώσεων BCL2 CK5 και CK7. Η πρόγνωση αυτών των νεοπλασμάτων είναι άγνωστη.

Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα

Τα νεοπλάσματα αυτά αποτελούνται από >70% από κύτταρα με ογκοκυτταρικούς χαρακτήρες. Η μέση ηλικία εμφάνισης του καρκινώματος αυτού είναι τα 66 έτη, παρ' ότι θεωρείται εξαιρετικά σπάνιο νεόπλασμα. Τα ογκοκύτταρα επί της ουσίας είναι διογκωμένα κύτταρα από συσσώρευση μιτοχονδρίων. Ο όρος ογκοκύτταρο χρησιμοποιείται όταν >60% του κυτταροπλάσματος καταλαμβάνεται από μιτοχόνδρια. Τα νεοπλάσματα αυτά παρουσιάζουν συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης με απωθητικά νεοπλασματικά όρια. Οι νεοπλασματικοί πυρήνες ποικίλλουν από μονότονοι σε έντονα πλειομορφικοί με εμφανή πυρήνια.

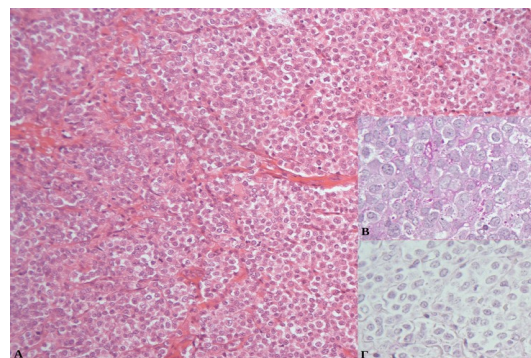
Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλάσματα αυτά εκφράζουν συνήθως ER,PR ενώ σπανιότερα παρατηρείται και ενίσχυση του HER2. Η συνολική πρόγνωση αυτών των νεοπλασμάτων είναι όμοια με τα NST καρκινώματα

Καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια

Καρκίνωμα του μαστού με παρουσία ενδοκυτταροπλασματικών λιπιδίων σε ποσοστό >90% των νεοπλασματικών κυττάρων. Το νεόπλασμα αντιστοιχεί στο $\approx 1\%$ των καρκινωμάτων του μαστού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα επίσης εκφράζουν EMA, CEA και α -Lactoalbumin είναι ωστόσο αρνητικά στους ορμονικούς υποδοχείς, ενώ δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ενίσχυση του HER2. Η πρόγνωση είναι πτωχή καθότι σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών υπάρχει ήδη μετάσταση κατά τη διάγνωση.

Διαυγοκυτταρικό / γλυκογονοεκκριτικό

Τα νεοπλάσματα αυτά αντιστοιχούν στο 1% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Αποτελούνται από νεοπλασματικά κύτταρα που φέρουν στο κυτταρόπλασμά τους κοκκία γλυκογόνου τα οποία αναδεικνύονται με τις ιστοχημικές χρώσεις PAS/PAS-D (κοκκία θετικά στην PAS, ευαίσθητα στο ένζυμο



Εικόνα 27: Α:Α&ΗΧ100:Γλυκογονοεκκριτικό καρκίνωμα. Β:Κυτταροπλασματικά κοκκία (PASX400), Γ:Ευαίσθησία στο ένζυμο διασάση (PAS-D X400).

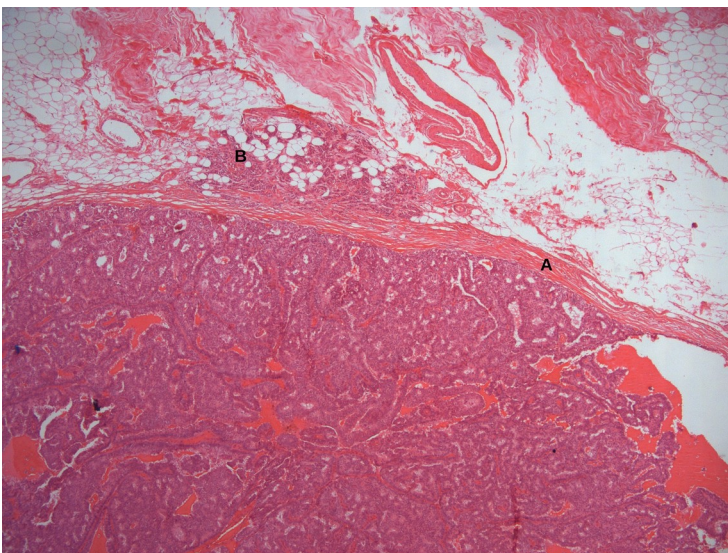
διαστάση - εικόνα 27). Τα νεοπλάσματα αυτά συνήθως παρουσιάζουν ίδιους αρχιτεκτονικούς χαρακτήρες με αυτούς των NST καρκινωμάτων και έχουν την ίδια πρόγνωση με αυτούς {WHO;2012}.

Εκ σμηγματογόνων πόρων

Εξαιρετικά σπάνιο καρκίνωμα, πανόμοιο με το ομώνυμό του στο δέρμα. Το νεόπλασμα παρουσιάζει φωλεώδη {WHO;2012}δομή και αποτελείται από σχετικά ώριμα κενοδοπιώδη σμηγματοκύτταρα αναμεμιγμένα με μικρότερα ηωσινοφιλά κύτταρα χωρίς κενοτόπια. Οι μιτώσεις είναι άφθονες ενώ μπορεί να ανευρεθούν και πλακώδη μορίδια. Τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν ER, PR, AR και σπανιότερα HER2. Δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την πρόγνωση αυτών των όγκων.

Ενκαψωμένο θηλώδες καρκίνωμα

Αυτού του τύπου οι βλάβες παρουσιάζονται συνήθως ως μονήρεις, στρόγγυλες και θεωρούνται ως ενδοπορικά καρκινώματα (DCIS). Τα νεοπλάσματα αυτά περιβάλλονται από ινώδη κάψα και χαρακτηρίζονται από νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα, χαμηλού ή/και μέσου πυρηνικού grade, που επικαλύπτουν λεπτούς ινώδεις αγγειακούς άξονες σχηματίζοντας θηλές. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτά τα νεοπλάσματα



Εικόνα 28: A&H X100. Ενκαψωμένο θηλώδες καρκίνωμα. A: Ινώδης κάψα B: Μικροδιύθηση.

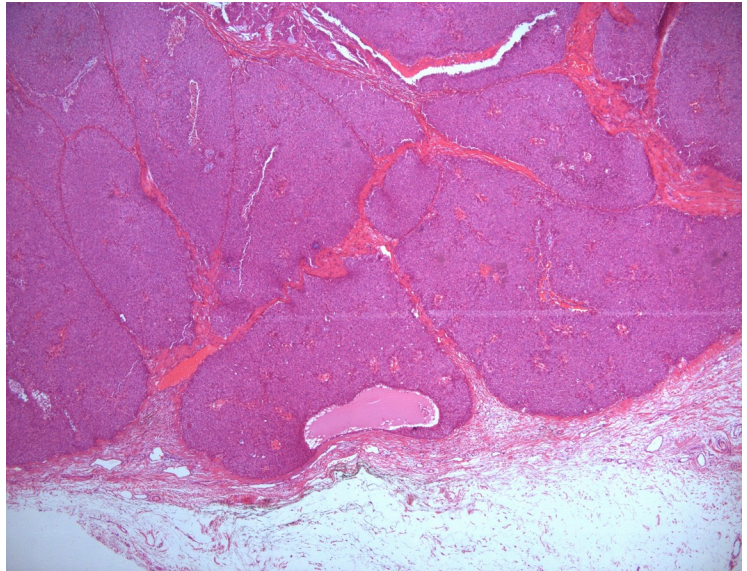
στερούνται μυοεπιθελίων τόσο στις θηλές όσο και κατά την περιφέρειά τους, γεγονός που προκαλεί διαφοροδιαγνωστικά διλήμματα για το εάν και σε ποιες περιπτώσεις υπάρχει διθητική συνιστώσα στο νεόπλασμα (εικόνα 28).

Ο Π.Ο.Υ. προτείνει ότι αυτά τα νεοπλάσματα στην περίπτωση απουσίας καθαρής διθητικής ανάπτυξης να σταδιοποιούνται και να αντιμετωπίζονται ως Tis {WHO;2012}.

Συμπαγές θηλώδες καρκίνωμα

Ένας άλλος τύπος θηλώδους καρκινώματος, χαρακτηριζόμενος από ομοειδές πρότυπο ανάπτυξης. Οι όζοι αποτελούνται από νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία επικαλύπτουν δυσδιάκριτους ινοαγγειακούς άξονες δίνοντας την εντύπωση (ιδίως σε χαμηλή μεγέθυνση) συμπαγούς βλάβης (εικόνα 29).

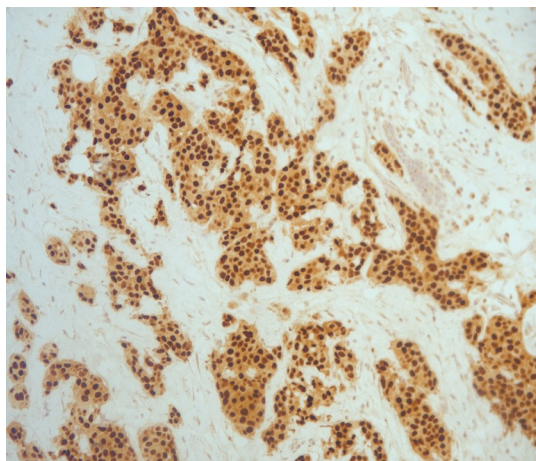
Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλάσματα αυτά είναι ορμονοθετικά, HER2- και εκφράζουν νευροενδοκρινείς δείκτες σε ένα ποσοστό $\approx 50\%$. Τα εν λόγω νεοπλάσματα παρότι εντάσσονται στην κατηγορία των ενδοπορικών καρκινωμάτων μπορεί να έχουν και διηθητική συνιστώσα. Όπως τα ενκαψωμένα θηλώδη καρκινώματα έτσι και αυτά μπορεί να στερούνται περιφερικών μυοεπιθηλίων δημιουργώντας διαγνωστικά προβλήματα στην ταξινόμησή τους (και την αντιμετώπισή τους) ως διηθητικά ή ενδοπορικά καρκινώματα.



Εικόνα 29: A&H X100. Συμπαγές θηλώδες καρκίνωμα. Εμφανής οζοειδής διαμόρφωση.

Ορμονικοί δείκτες

Η έκφραση οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών (PR) υποδοχέων είναι οι σημαντικότεροι προβλεπτικοί δείκτες φαρμακολογικής απόκρισης σε ορμονοθεραπεία. Η ανάλυσή της γίνεται ανοσοϊστοχημικώς σε αποπαραφινωμένες τομές νεοπλασματικού όγκου και πρέπει να πραγματοποιείται σε όλα τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού σύμφωνα με τις οδηγίες των College of American Pathologists (CAP), American Society of Clinical



Εικόνα 30: Ανοσοϊστοχημικός έλεγχος οιστρογόνων (ERX400)

Oncology (ASCO), και Royal College of Pathologists (RCP). Έλεγχος έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων πρέπει να πραγματοποιείται και στα ενδοπορικά (in-situ) καρκινώματα. Σύμφωνα με τις οδηγίες των ASCO/CAP οι ιστολογικές εκθέσεις οφείλουν να περιλαμβάνουν τόσο το ποσοστό όσο και την ένταση της πυρηνικής χρώσης αυτών στα νεοπλασματικά κύτταρα. Υπάρχουν αρκετές σύνθετες αξιολογιστικές μέθοδοι υπό τη μορφή score (Allred, Quick score, H-Score – πίνακας 8). Ως ορμονοθετικοί θεωρούνται οι όγκοι όπου τουλάχιστον στο 1% των νεοπλασματικών κυττάρων παρατηρείται πυρηνική έκφραση οιστρογονικών ή προγεστερονικών υποδοχέων (εικόνα 30). Κατά τις περιπτώσεις που δεν εκφράζονται υποδοχείς σκόπιμος είναι ο ποιοτικός έλεγχος της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με εσωτερικό θετικό μάρτυρα, όπως τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαζικού αδένου, προς αποφυγήν ενός ψευδούς αρνητικού αποτελέσματος {Palazzo J.}.

Πρόσφατες αναδρομικές μελέτες εγείρουν αμφιβολίες για την ταξινόμηση και τη διαχείριση καρκινωμάτων του μαστού με χαμηλά επίπεδα έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων (1-10%) αφού μέσα από αυτές αναδεικνύεται ότι οι συγκεκριμένοι όγκοι συμπεριφέρονται κλινικά περισσότερο ως ορμονοαρνητικά νεοπλάσματα παρά ως ορμονοθετικά σε σχέση με τους έντονα ER/PR όγκους και αποκρίνονται ελάχιστα στην ορμονοθεραπεία. Επιπρόσθετα, κατά το μοριακό έλεγχο, μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών των νεοπλασμάτων εκφράζει «προσαύλιους» (luminal) χαρακτήρες {Schnitt and Collins}.

Υπάρχουν ενδείξεις πως η απόκριση στην αντιοιστρογονική θεραπεία είναι εντονότερη σε όγκους που εκφράζουν αμφοτέρους τους ορμονικούς υποδοχείς σε αντίθεση με αυτούς που εκφράζουν μόνο οιστρογόνα· ωστόσο αυτό είναι διαφιλονικούμενο.

Στοιχεία από αναδρομικές μελέτες εισηγούνται τη χρήση των προγεστερονικών υποδοχέων (PR) ως προγνωστικό δείκτη μη σχετιζόμενο με την απόκριση στη φαρμακολογική ορμονοθεραπεία, δεδομένου ότι ασθενείς με ER+/PR+ καρκινώματα έχουν καλύτερη πρόγνωση από εκείνους με ER+/PR-, ανεξαρτήτως ορμονοθεραπείας {Dowsett et al}.

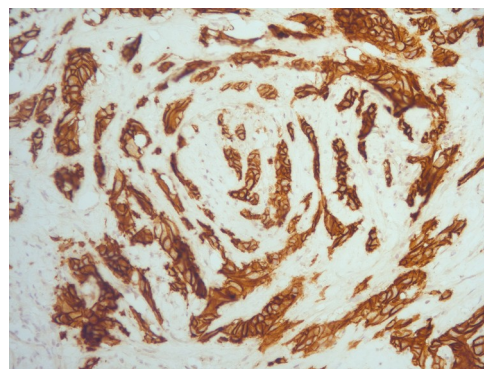
Μέθοδος	Βαθμοποιημένο % θετικών κυττάρων	Βαθμός έντασης χρώσης	Συνδυαστικό Score	Εύρος score	Βιβλιογραφική αναφορά
Allred	0%=0 1=<1% 2=1-10% 3=11-33% 4=34-66% 5=67-100%	0=χωρίς 1=ασθενής 2=μέτρια 3=έντονη	% score (0-5) + βαθμός έντασης	0-8	{Harvey et al}
Quick	0=0 1=1%-4% 2=5%-19% 3=20%-39% 4=40%-59% 5=60%-79% 6=80%-100%	0=χωρίς 1=ασθενής 2=μέτρια 3=έντονη	% score (0-6) X βαθμός έντασης	0-18	{Detre et al}
H-Score	% κυττάρων σε κάθε κατηγορία έντασης	0=χωρίς 1=ασθενής 2=μέτρια 3=έντονη	(Βαθμός % ποσοστού κυττάρων με ένταση 1 X 1) + (Βαθμός % ποσοστού κυττάρων με ένταση 2 X 2) + (Βαθμός % ποσοστού κυττάρων με ένταση 3 X 3)	0-300	{Hammond et al}

Πίνακας 8. Αξιολογιστικές μέθοδοι ορμονικών υποδοχέων. Τροποποίηση και ανατύπωση από {Palazzo J}.

Κατά τη σπάνια περίπτωση ενός ER-/PR+ νεοπλάσματος (<1% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού) πρέπει να επαναληφθεί ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για ER προς αποφυγήν ψευδούς αρνητικού αποτελέσματος, καθότι η έκφραση των προγεστερονικών υποδοχέων είναι σθεναρά εξαρτώμενη με την παρουσία λειτουργικών οιστρογονικών υποδοχέων {Palazzo J}.

Ενίσχυση HER2

Η παρουσία ενίσχυσης της μεμβρανικής πρωτεΐνης HER2 αποτελεί προγνωστικό παράγοντα ανεξάρτητο της παρουσίας μεταστατικής νόσου σε λεμφαδένες, μια και σχετίζεται με την απόκριση σε συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα. Είναι, λοιπόν, εξαιρετικά σημαντικό να αξιολογηθεί η κατάσταση των υποδοχέων HER2 στο διηθητικό καρκίνο του μαστού, για να διαχωριστούν οι ασθενείς που θα έχουν όφελος από στοχευμένη θεραπεία για HER2 με αντισώματα όπως τα Trastuzumab, Lapatinib και Pertuzamab. Η αξιολόγηση υπερέκφρασης της πρωτεΐνης HER2 γίνεται με ανοσοϊστοχημεία ή in situ υβριδισμό και πρέπει να πραγματοποιείται σε όλα τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού σύμφωνα με τις οδηγίες St. Gallen η τελευταία τροποποίηση του οποίου ήταν το 2015.



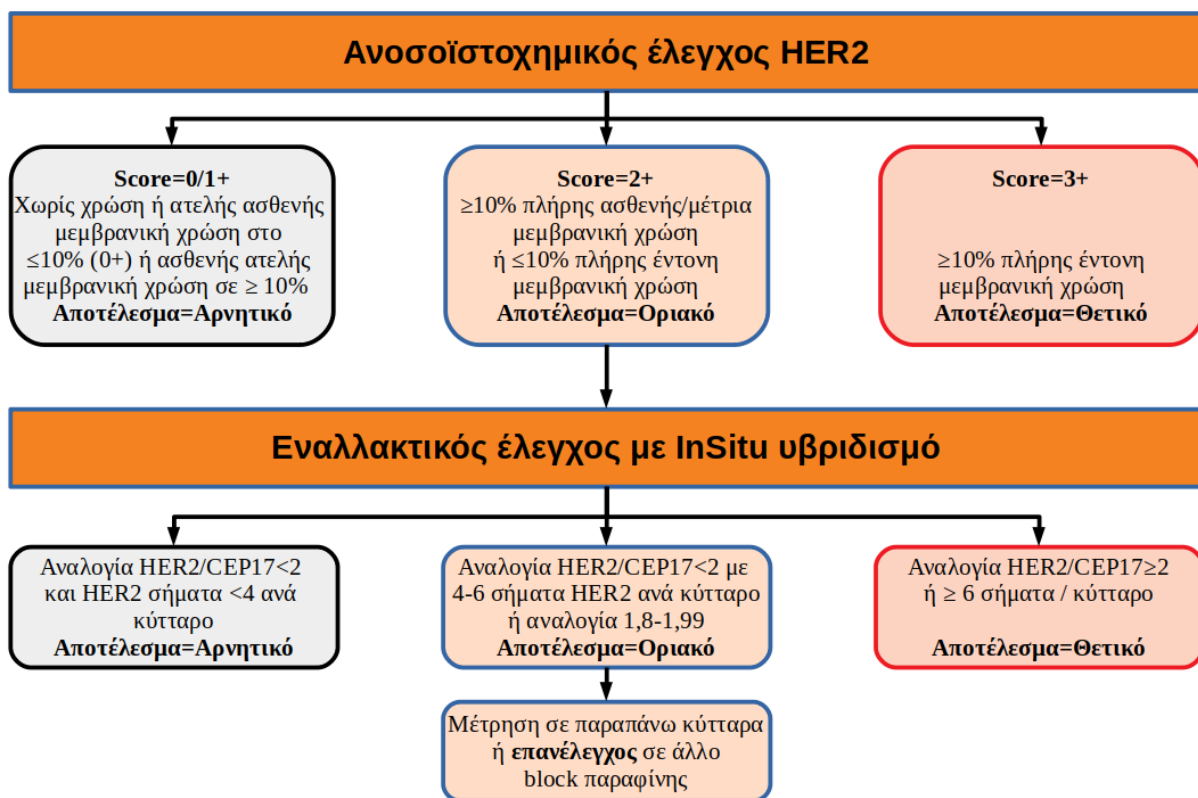
Εικόνα 31: HER2+ Score 3. Εμφανής συνεχόμενη και έντονη μεμβρανική χρώση.

Στην παρούσα κατάσταση τα παθολογοανατομικά εργαστήρια αξιολογούν το HER2 πραγματοποιώντας πρώτα ανοσοϊστοχημικό έλεγχο και προχωρούν σε insitu υβριδισμό (ISH) στις

αμφίσημες περιπτώσεις. Υπάρχουν τρεις μέθοδοι ISH: ο φθορίζων (F.I.S.H. - εικόνα 33) ο χρωμογονικός (C.I.S.H.) και ο μεταλλογραφικός με άργυρο (S.I.S.H.). Επιπρόσθετα σε αυτά τα τεστ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας (HER2 gene) ή περισσότεροι (HER2 gene και κεντρόμερο 17) ανιχνευτές (probes).

Αξιολόγηση με Ανοσοϊστοχημεία

Η αξιολόγηση του HER2 έχει τροποποιηθεί πολλάκις τα τελευταία χρόνια. Οι τελευταίες αλλαγές ορίζουν έναν καρκίνο ως HER2 θετικό (Score 3+) όταν κατά τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο τουλάχιστο 10% από τα διηθητικά νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν πλήρη συνεχόμενη έντονη μεμβρανική χρώση (εικόνα 31).



Εικόνα 32: Αξιολόγηση ενίσχυσης HER2 με Ανοσοϊστοχημεία και υβριδισμό.

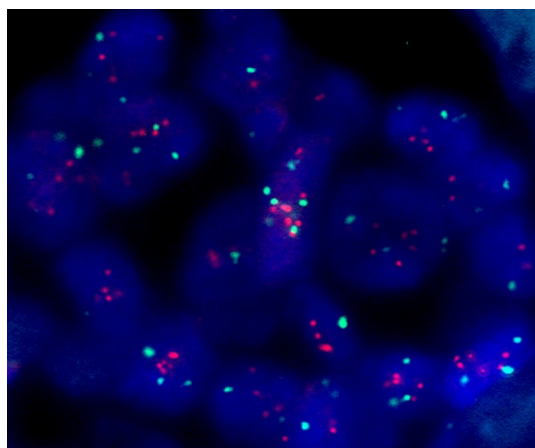
Αμφίσημα ως προς το HER2 θεωρούνται τα καρκινώματα που εκφράζουν ασθενή, πλήρη, συνεχή μεμβρανική χρώση σε περισσότερα του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων ή έντονη, πλήρη μεμβρανική χρώση σε λιγότερο του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων HER2 αμφίσημο/οριακό (Score 2+).

Αρνητικοί προς την υπερέκφραση του HER2 θεωρούνται οι όγκοι με καθόλου ή με ασθενή πλήρη μεμβρανική χρώση σε λιγότερο από το 10% των κυττάρων (Score 0) ή ατελή μεμβρανική χρώση σε περισσότερο του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων (Score 1+) {Rakha E.A. et al.} (εικόνα 32).

Αξιολόγηση με insitu υβριδισμό (ISH)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η συνήθης πρακτική είναι η αξιολόγηση με ISH των αμφίσημων αποτελεσμάτων του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου. Ως θετικός (HER2 amplified) αξιολογείται ένας νεοπλασματικός όγκος τα διηθητικά κύτταρα του οποίου παρουσιάζουν ≥ 6 σήματα / κύτταρο (στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται 1 probe) ή λόγο ≥ 2 μεταξύ σημάτων HER2 γονιδίων και κεντρόμερων (17). Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις που ο λόγος HER2/CEP17 (κεντρόμερο 17) κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 1,99 ή τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν 4-6 σήματα ανά κύτταρο.

Αυτές οι περιπτώσεις θεωρούνται αμφίσημες και ως προς ISH και συνιστάται η επανάληψη της εξέτασης σε άλλη τομή ή επαναξιολόγηση με μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων. Τέλος, αρνητικές θεωρούνται οι περιπτώσεις που ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 είναι μικρότερος του 2 και τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν λιγότερα από 4 σήματα HER2 ανά κύτταρο (εικόνα 32) {Rahka et al 2015}.

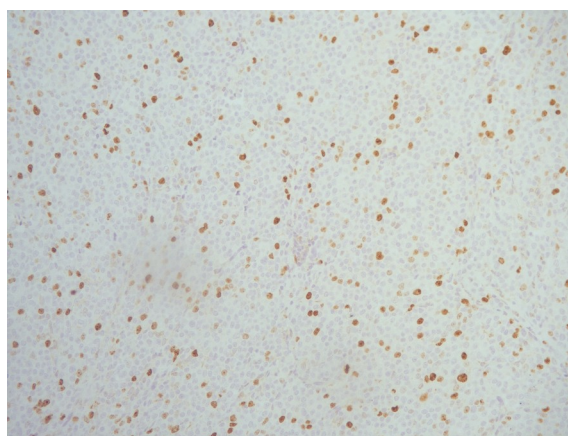


Εικόνα 33: Υβριδισμός με ανοσοφθορισμό. Πράσινο τα probes του κεντρόμερου, κόκκινο τα probes του HER2.

Ki67

Ο κυτταρικός δείκτης πολλαπλασιασμού αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προγνωστικούς παράγοντες στον καρκίνο του μαστού. Ο μιτωτικός δείκτης πολλαπλασιασμού, παρότι πραγματοποιείται στο πλαίσιο της βαθμοποίησης κατά Nottingham, απαιτεί 10 HPF διηθητικού καρκινώματος και επηρεάζεται από τη μεταβλητότητα μεταξύ παρατηρητών. Το Ki67 είναι ένας ανοσοϊστοχημικός δείκτης που εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου πλην της G0 και γι' αυτόν το λόγο εδώ και πολλά χρόνια θεωρείται ως ένα αξιολογικό, εναλλακτικό, εργαλείο για την αξιολόγηση του δείκτη πολλαπλασιασμού των καρκινωμάτων του μαστού (εικόνα 34).

Έχει αποδειχθεί ότι το Ki67 συσχετίζεται με τη μιτωτική δραστηριότητα και την όλη έκβαση της νεοπλασματικής νόσου του μαστού, κυρίως σε οιστρογονοθετικούς όγκους. Εκτός όμως από προγνωστικός δείκτης νόσου χρησιμοποιείται και για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Για την ακρίβεια υπάρχουν μελέτες που σχετίζουν υψηλό Ki67 με εξαιρετική απόκριση στη νεοεπικουρική (neoadjuvant) θεραπεία. Τυχόν ασυμφωνίες για την προγνωστική αξία του δείκτη αυτού οφείλονται



Εικόνα 34: Αξιολόγηση Ki67, ως θετική προσμετράται η πυρηνική χρώση (X400).

όχι μόνο στο εύρος της ποικιλίας των

θεραπευτικών σχημάτων αλλά και στην παρουσία διαφορετικών τρόπων μέτρησης και αξιολόγησης των κυττάρων που εκφράζεται ο δείκτης αυτός. Συγκεκριμένα, δεν έχει καθοριστεί ακριβώς το κατά κοινή συναίνεση διαχωριστικό όριο μεταξύ χαμηλού και υψηλού ποσοστού κυτταρικού δείκτη πολλαπλασιασμού στον καρκίνο του μαστού, το οποίο την παρούσα στιγμή - σύμφωνα με τις τελευταίες προτάσεις των οδηγιών του St. Gallen- κυμαίνεται ανάμεσα στο 14 και στο 20%. Η απουσία consensus οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικών τρόπων καταμέτρησης και αξιολόγησης των θετικών κυττάρων και τη διαφωνία μεταξύ ερευνητών στο εάν η καταμέτρηση αυτή πρέπει να γίνει κατά τις πιο ενεργά μιτωτικές περιοχές του όγκου (hotspot scoring) ή σε διάφορες τυχαίες περιοχές δίνοντας μια γενική εικόνα της μιτωτικής δραστηριότητας του όγκου (overall scoring).

Μοριακή ταξινόμηση

Είναι φανερό πλέον ότι ο καρκίνος του μαστού, όπως άλλωστε και άλλοι καρκίνοι σε άλλα όργανα, δεν αποτελεί μια συγκεκριμένη νεοπλασματική οντότητα· αυτά τα νεοπλάσματα ποικίλλουν όχι μόνο κατά την ιστολογική τους εικόνα, την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων και την ενίσχυση του HER2, αλλά και σε μοριακό/γενετικό επίπεδο. Η γονιδιακή ανάλυση των καρκινωμάτων του μαστού καθορίζει τέσσερις εγγενείς διακριτούς υποτύπους: προσαύλια A (Luminal A), προσαύλια B (Luminal B), ενισχυμένου HER2 και Βασικού τύπου (Basal-Like). Όλοι αυτοί με διαφορετικά γονιδιακά προφίλ, εξέλιξη, μεταστατικά μοτίβα και ευαισθησία σε συγκεκριμένες θεραπείες. Ωστόσο δεδομένου ότι το κόστος πραγματοποίησης προφίλ γονιδιακής έκφρασης είναι ακόμα αρκετά υψηλό για τη διάδοσή του ως εξέταση ρουτίνας, ο καθορισμός του μοριακού υποτύπου γίνεται με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας βασιζόμενη στην έκφραση των ER, PR, HER2 και Ki67 σύμφωνα με το consensus του St. Gallen (πίνακας 9).

Προσαύλια A (LumA)	ER(+), PR(+), HER2(-), Ki67 (χαμηλό)*, HER2(-)
Προσαύλια B (Lum B)	ER(+), PR(- ή οριακά -), Ki67 (χαμηλό)*HER2(-) ή ER(+), PR(+), Ki67(υψηλό)*
Ενισχυμένο HER2 (HER2+), (LumB,HER2+)	Ορμονοθετικοί και HER2(+) ή ER-, PR-, HER2(+)
Βασικού τύπου (Basal-Like/TNBC)	ER(-), PR(-), HER2(-)

Πίνακας 9: Μοριακή ταξινόμηση.

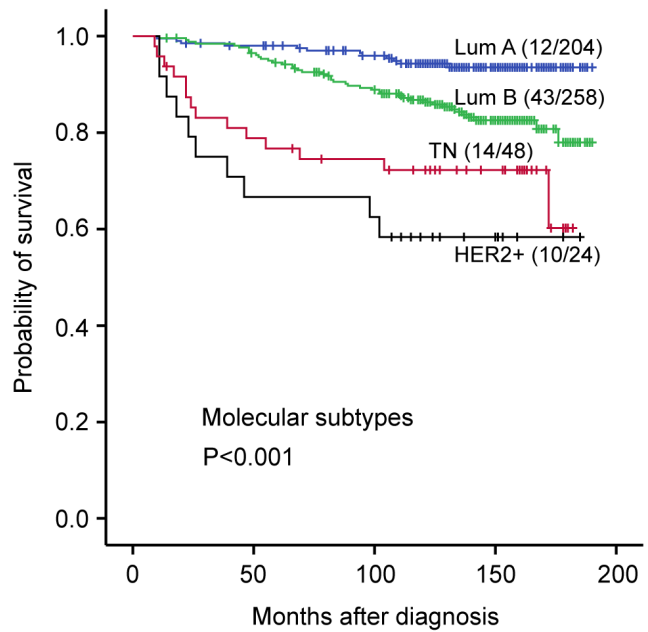
Τα προσαύλια A (Luminal A) καρκινώματα εκφράζουν έντονα τους ορμονικούς υποδοχείς και παρουσιάζουν χαμηλό κυτταρικό δείκτη πολλαπλασιασμού. Είναι νεοπλάσματα με χαμηλό πυρηνικό βαθμό κακοήθειας (nuclear grade), αποκρίνονται άριστα στην ορμονοθεραπεία αλλά όχι στην κλασική χημειοθεραπεία και έχουν εξαιρετική πρόγνωση.

Τα προσαύλια B (Luminal B) καρκινώματα εκφράζουν λιγότερο τους ορμονικούς δείκτες (κυρίως την προγεστερόνη) και παρουσιάζουν ως επί το πλείστον υψηλότερο κυτταρικό δείκτη πολλαπλασιασμού. Είναι νεοπλάσματα, συνήθως υψηλότερου πυρηνικού βαθμού κακοήθειας (από

τα προαναφερθέντα), αποκρίνονται, κατά γενικό κανόνα, στην κλασική χημειοθεραπεία και σπανιότερα στην ορμονοθεραπεία. Παρουσιάζουν δε δυσμενέστερη πρόγνωση από τα Luminal A.

Τα HER2 ενισχυμένα καρκινώματα παρουσιάζουν υπερέκφραση του HER2 χωρίς (HER2+) ή με συνοδό έκφραση των ορμονικών υποδοχέων (Luminal B HER2+). Είναι νεοπλάσματα με υψηλό πυρηνικό βαθμό κακοήθειας και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Πριν από τη στοχευμένη αντι-HER2 θεραπεία είχαν εξαιρετικά επιθετική συμπεριφορά με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης. Ωστόσο πλέον στη σημερινή πρακτική και με τη χρήση αντι-HER2 θεραπειών οι ασθενείς με αυτά τα νεοπλάσματα παρουσιάζουν σαφώς καλύτερη πρόγνωση.

Τα βασικού τύπου (Basal-Like) καρκινώματα, που θεωρείται ότι προέρχονται από τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, είναι (συνήθως) καρκινώματα με υψηλό πυρηνικό βαθμό κακοήθειας και πολλές πυρηνοκινήσεις. Τα νεοπλάσματα αυτά παρουσιάζουν τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Triple-negative Breast Carcinomas/TNBC), αποκρίνονται δύσκολα στην επικουρική (adjuvant) θεραπεία και εμφανίζουν τη μεγαλύτερη θνησιμότητα, ωστόσο κάποια εξ αυτών όπως το αδενοειδές κυστικό και το μυελοειδές παρουσιάζουν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ευνοϊκή πρόγνωση.



Εικόνα 35: Συνολική επιβίωση ανά μοριακό τύπο. Ανατύπωση από {Gøril Knutsvik et al}.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής εξαρτάται από το στάδιο της νόσου, την έκφραση συγκεκριμένων βιοδεικτών, την κλιμακτήριο κατάσταση (εμμηνόπαυση) και βεβαίως τη θέληση της ασθενούς. Διαφορετική αντιμετώπιση θα λάβει ένα *in situ* νεόπλασμα από ένα προχωρημένου σταδίου. Η θεραπεία συνίσταται στην αντιμετώπιση της νεοπλασματικής εστίας, των τυχόν διηθημένων λεμφαδένων και των απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η αντιμετώπιση γίνεται με χειρουργικά μέσα, ορμονοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και στοχευμένες θεραπείες.

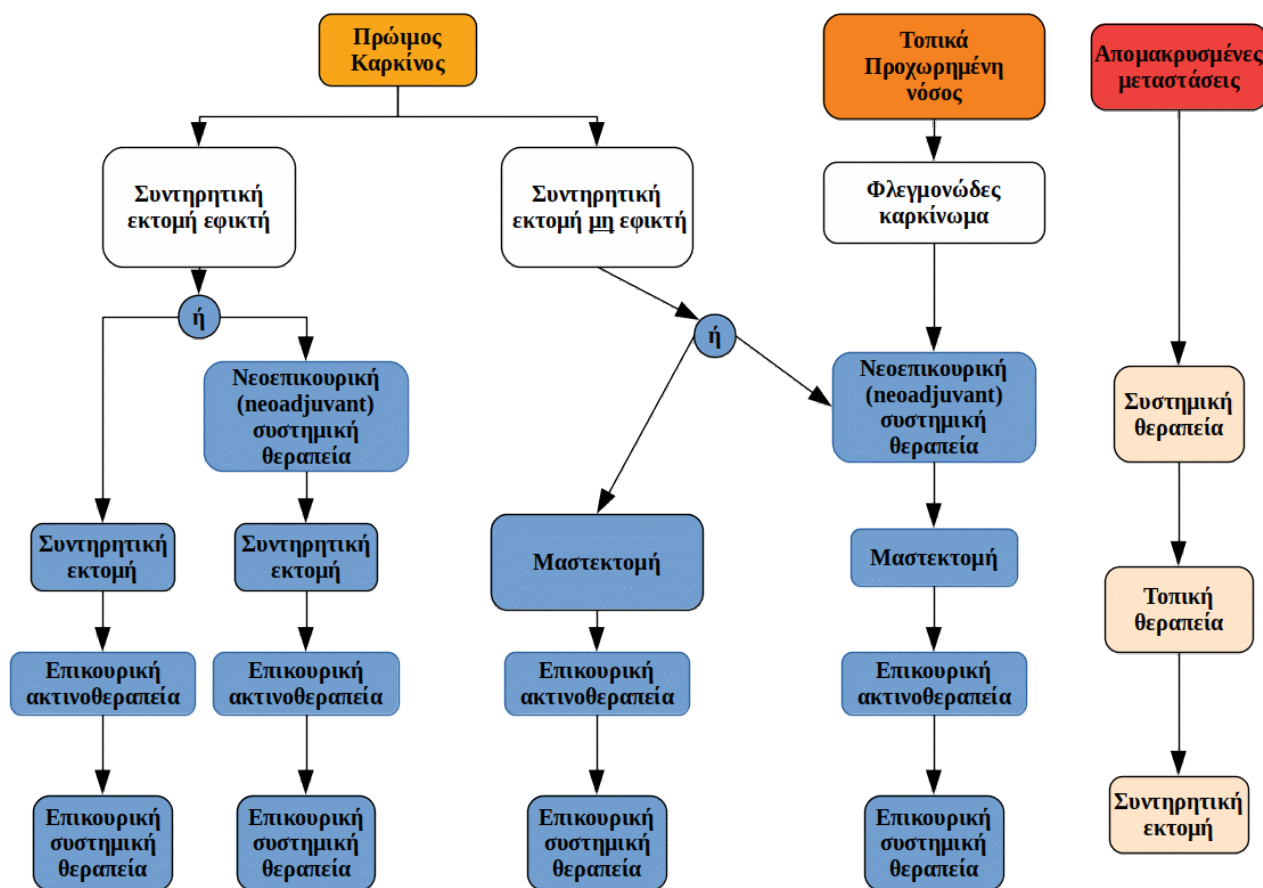
Ενδοπορικά καρκινώματα

Η πλειονότητα των μη διηθητικών (*in situ*) καρκινωμάτων αντιμετωπίζεται συντηρητικά με ογκεκτομή σε καθαρά εγχειρητικά όρια ή με την κατ' επιλογή του ασθενή απλή μαστεκτομή. Στην περίπτωση που δεν ανευρεθεί ιστολογικά διηθητική εστία στο εγχειρητικό παρασκεύασμα της συντηρητικής ογκεκτομής χορηγείται αντιοιστρογονική θεραπεία, εφόσον το νεόπλασμα είναι ορμονοεξαρτώμενο (τα περισσότερα είναι) και υποκλασματοποιημένη ακτινοθεραπεία. Στην περίπτωση που τα όρια είναι θετικά συστήνεται συμπληρωματική εκτομή. Στην περίπτωση μαστεκτομής και σε ορμονοεξαρτώμενο νεόπλασμα χορηγείται προληπτικά αντιοιστρογονική θεραπεία.

Διηθητικά καρκινώματα σταδίου I και II

Σε νόσους σταδίου I και II η αντιμετώπιση που επικρατεί είναι οι συντηρητικού τύπου χειρουργικές επεμβάσεις (ογκεκτομές) κατά τις οποίες αφαιρείται μόνο το τμήμα του μαζικού παρεγχύματος που περιλαμβάνει τον όγκο, περιβαλλόμενο από υγιή όρια. Ανάλογα με το αποτέλεσμα της βιοψίας του λεμφαδένα φρουρού, η οποία μπορεί να έχει πραγματοποιηθεί προεγχειρητικά ή υπό το καθεστώς ταχείας βιοψίας, κρίνεται εάν θα γίνει λεμφαδενικός καθαρισμός της μασχαλιαίας χώρας. Βέβαια όταν οι προεγχειρητικές εξετάσεις (υπέρηχος, FNA, κλινική εξέταση) αναδεικνύουν λεμφαδενική επέκταση της νόσου η αφαίρεση των μασχαλιαίων λεμφαδένων είναι υποχρεωτική. Εκτός από τις συντηρητικού τύπου επεμβάσεις μπορεί να πραγματοποιηθούν και πιο δραστικού τύπου όπως η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή (ολική αφαίρεση μαστού και συνοδός λεμφαδενικός καθαρισμός), η υποδόρια μαστεκτομή με διατήρηση θηλής (με ή χωρίς λεμφαδενικό καθαρισμό ανάλογα με τη λεμφαδενική επέκταση της νόσου) και απλή μαστεκτομή (χωρίς λεμφαδενικό καθαρισμό όταν η νόσος είναι N0). Οι ενδείξεις για πραγματοποίηση συντηρητικής ογκεκτομής είναι: το μέγεθος όγκου μικρότερο των 4 εκ. η απουσία πολυεστιακής νόσου, η δυνατότητα εκτομής σε υγιείς ιστούς. Οι ενδείξεις για πραγματοποίηση μαστεκτομής είναι το μεγάλο μέγεθος του όγκου (>4 εκ.), η πολυεστιακή παρουσία του νεοπλάσματος, η αδυναμία εκτομής σε υγιείς ιστούς, η αντένδειξη χορήγησης ακτινοθεραπείας, η ύπαρξη γεννητικού υπόβαθρου που αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης

καρκίνου του μαστού (μεταλλάξεις BRACA) και όταν προκύπτει πτωχό αισθητικό αποτέλεσμα από την ογκεκτομή. Βεβαίως τον πρώτο λόγο, τόσο στη μαστεκτομή όσο και στη συντηρητική αντιμετώπιση του μαστού τον έχει ο ασθενής. Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται στα στάδια I και II με σκοπό την αποστείρωση του μαστού από υπολειπόμενα νεοπλασματικά στοιχεία και τη μείωση της πιθανότητας τοπικής υποτροπής. Χορηγείται πάντοτε μετά από ογκεκτομή, μαστεκτομή όγκων ευρισκόμενων κοντά στο θωρακικό τοίχωμα ή παρουσία ευρείας λεμφαδενικής συμμετοχής (N>2).



Απλοποιημένος αλγόριθμος θεραπείας που αναδεικνύει τους διαφορετικούς χειρισμούς σε πρώιμη και προχωρημένη νόσο.

Επικουρική (adjuvant) ορμονοθεραπεία χορηγείται σε ασθενείς με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς. Στις προεμμηνοπαυσιακές δίδεται ταμοξιφαίνη, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές οι αναστολείς αρωματάσης.

Η επικουρική (adjuvant) χημειοθεραπεία χορηγείται σε ασθενείς που έχουν μεγάλο κίνδυνο υποτροπής που, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, σχετίζεται με την παρουσία ορμονοαρνητικού νεοπλάσματος, ευμεγέθους όγκου, υψηλού grade, νεαρή ηλικία, N+ λεμφαδένες και υπερέκφραση του HER2. Αυτά τα φαρμακολογικά σχήματα βασίζονται στην ανθρακυκλίνη και τις ταξάνες.

Σε HER2+ νεοπλάσματα χορηγείται τραστουζουμάμπη (trastuzumab). Αυτό είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τους υποδοχείς HER2, διακόπτοντας την αυξητική τους δράση στα κύτταρα.

Διηθητικά καρκινώματα σταδίου III

Σε νεοπλάσματα σταδίου III η αντιμετώπιση είναι διαφορετική. Η προεγχειρητική / νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (neoadjuvant) συνήθως προηγείται της επέμβασης. Τα σχήματα που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από ταξάνες, ανθρακυκλίνη ή τραστουζουμάμπη (εφόσον το νεόπλασμα παρουσιάζει υπερέκφραση HER2). Ακολουθεί η εκτομή του όγκου, που συνήθως είναι μαστεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό. Μετά της χειρουργικής εξαίρεσης έπονται η ορμονοθεραπεία (εφόσον το επιτρέπει το νεόπλασμα) και η ακτινοθεραπεία.

Σταδίου IV (μεταστατικά-M1)

Σε μεταστατικά καρκινώματα, δηλαδή σταδίου IV η θεραπεία είναι παρηγορητικού τύπου. Ωστόσο χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία μονοκλωνικά αντισώματα και ακτινοβολία επιμηκύνουν την επιβίωση και βελτιώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής. Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται στην αντιμετώπιση δερματικών, οστικών και εγκεφαλικών μεταστάσεων. Ιδιαίτερα στις τελευταίες περιορίζει τα συμπτώματα που δημιουργούνται από πιεστικά φαινόμενα. Τέλος, σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική αφαίρεση του όγκου και μεταστασεκτομές για περιορισμό των τοπικών επιπλοκών.

Ανοσοθεραπεία

Μέχρι στιγμής η ανοσοθεραπεία δεν έχει αξιοποιηθεί πλήρως στον καρκίνο του μαστού. Προκλινικά δεδομένα και τα αποτελέσματα από πρόσφατες κλινικές δοκιμές αποπνέουν ωστόσο αισιοδοξία. Η επιτυχία της ανοσοθεραπείας απαιτεί πρώτα απ' όλα την κατανόηση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινωμάτων του μαστού και τους παράγοντες που καθορίζουν την απόκριση σε ανοσοθεραπευτικά φαρμακολογικά σχήματα. Μέχρι σήμερα δεν έχουν ανευρεθεί αξιόπιστοι προγνωστικοί βιοδείκτες για την ανοσοθεραπεία στο μαστό. Η έκφραση του υποδοχέα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (Program Death Ligand 1 / PDL-1) από τα φλεγμονώδη κύτταρα που διηθούν τον όγκο βρέθηκε προαπαιτούμενη για την απόκριση στη θεραπεία με atezolizumab και nabpaclitaxel στην κλινική μελέτη IMpassion130, ενώ σε πολλαπλές άλλες μελέτες ερευνάται η έκφραση του PDL-1 από τα νεοπλασματικά κύτταρα ως φαρμακολογικός στόχος {Schmid P, et al.}. Η παρουσία των λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο (Tumor Infiltrating Lymphocytes - TILs) δίνει ελπιδοφόρα αποτελέσματα ως προγνωστικός δείκτης όπως έχει αναδείξει ο Denkert {Denkert et al}. Από την άλλη, η μικροδορυφορική αστάθεια και το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (tumor mutational burden) έχουν προσδιοριστεί ως βιοδείκτες απόκρισης στη θεραπεία σε άλλα όργανα και θα μπορούσαν να έχουν χρησιμότητα και στο μαστό, μολονότι οι συγκεκριμένες μεταβολές είναι σπάνιες σε αυτόν.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι νεοπλασματικοί όγκοι δεν αποτελούνται μόνο από νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και από ένα εμφανώς αλλοιωμένο στρώμα γύρω τους. Αυτό το μικροπεριβάλλον πλέον αναγνωρίζεται ως ένα από τα κύρια στοιχεία στην ανάπτυξη των νεοπλασματικών όγκων, καθώς και ως μια μετρήσιμη παράμετρος για την απόκριση στη θεραπεία. Το μικροπεριβάλλον στον καρκίνο του μαστού μπορεί να μελετηθεί σε τοπικό (ενδονεοπλασματικό/περινεοπλασματικό) και απομακρυσμένο (μεταστατικό) επίπεδο {Coleman RE et al}{Soysal SD et al}. Καθένα από τα παραπάνω περιλαμβάνει ποικίλα κυτταρικά στοιχεία όπως ινοβλάστες, λευκοκύτταρα, λιποκύτταρα, μυοεπιθήλια και ενδοθήλια. Εμπεριέχει επίσης εξωκυττάριο στρώμα, διαλυτούς παράγοντες όπως ορμόνες, κυτταροκίνες, ένζυμα και αυξητικούς παράγοντες.

Ενδονεοπλασματικό και περινεοπλασματικό μικροπεριβάλλον

Η διάδραση ανάμεσα σε επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διαφοροποίηση του μαζικού αδένου. Το φυσιολογικό στρώμα συμβάλλει στη διατήρηση της αρχιτεκτονικής του επιθηλιακού στοιχείου και αναστέλλει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη νεοπλασματική εξαλλαγή {Folgueira MA et al}. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα από τη φύση τους έχουν ογκοκατασταλτική λειτουργία στο μαστό, αφού παράγουν τη βασική μεμβράνη και περιβάλλουν τα προσαύλια επιθηλιακά κύτταρα δημιουργώντας ένα φυσικό φράγμα γύρω από αυτά. Μελέτες στον καρκίνο του μαστού με μοντέλα ξενομοσχεύματος έχουν αναδείξει πως η απώλεια των μυοεπιθηλιακών κυττάρων προάγει τη μετάβαση από ενδοπορικό {Min Hu et al} σε διηθητικό καρκίνωμα. Σε στρώμα σχετιζόμενο με νεοπλασία οι μυοϊνοβλάστες και οι ινοβλάστες φαίνεται να διευκολύνουν την ογκογένεση και τη μεταστατική διασπορά δημιουργώντας ένα δεκτικό μικροπεριβάλλον{Min Hu et al 2009}. Σε πολλά στοιχεία του το νεοπλασματικό στρώμα ομοιάζει με εκείνο της επούλωσης τραύματος, παρουσιάζοντας υπερπλασία του ινοβλαστικού στοιχείου και επαναδιαμόρφωση του εξωκυτταρίου στρώματος (δεσμοπλαστικό στρώμα) αλλά στερούμενου φυσιολογικών ελέγχων{Harold F. Dvorak 1986}. Σε συμφωνία με τα παραπάνω πολλαπλές μελέτες αναδεικνύουν ότι οι κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) επάγουν την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση δρώντας πάνω στα βλαστικά κύτταρα του μαστού {Jiang X et al}{Ningqiang Ma et al 2014}. Ο συνδέτης της χημειοκίνης CXCL12 είναι απαραίτητος στην εκκίνηση της ιστικής αναγέννησης και επουλωτικής διαδικασίας, επιτάσσοντας βλαστικά κύτταρα με υποδοχέα χημειοκίνης 4 (CXCR4). Αυτό

συμβάλλει στη μετανάστευση και την υπερπλασία των στρωματικών κυττάρων και την έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα άλλες έρευνες έχουν αναδείξει πως ο CXCL12 διεγείρει τη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial-mesenchymal transition/EMT) αυτών μέσω της εκφράσεως του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα {Jung Y et al}. Συνεπώς η υπερέκφραση του CXCR4 μπορεί να σχετιστεί με πτωχότερη κλινική πρόγνωση {Zhang Z et al 2014}.

Μεταστατικό μικροπεριβάλλον

Η μετάσταση είναι μια σύνθετη διαδικασία κατά την οποία τα κυκλοφορούντα νεοπλασματικά κύτταρα εξαγγειώνονται διαμέσου του τριχοειδικού τοιχώματος και εποικίζουν ένα νέο μικροπεριβάλλον {Coleman RE et al}. Εκεί είτε εισέρχονται σε μια κατάσταση νάρκης που μπορεί να διαρκέσει χρόνια ή αρχίζουν να σχηματίζουν μικρομεταστάσεις. Σχετικά με αυτό οι κυκλοφορούσες χημειοκίνες και κυτταροκίνες εκκρινόμενες από την πρωτοπαθή εστία του όγκου επιστρατεύουν κύτταρα του μυελού που δημιουργούν τις επονομαζόμενες προμεταστατικές φωλές (pre-metastatic niches) πριν καν την κινητοποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων {Käkönen SM et al} {Place A et al}. Ο σχηματισμός των οστικών μεταστάσεων είναι το πιο ευρέως μελετημένο πρότυπο μεταστάσεων. Περιλαμβάνει σύνθετες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε καρκινικά και περιοχικά κύτταρα όπως οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και βλαστικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που διεγείρουν και την παραγωγή του συνδέτη υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κΒ (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand/RANKL). Ο τελευταίος με τη σειρά του ευθύνεται για την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών που έχει ως συνέπεια την αύξηση της οστικής απορρόφησης {Coleman RE et al}. Η οστική αποδόμηση απελευθερώνει ογκοαυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους διεγείρουν και τους οστεοκλάστες δημιουργώντας ένα αυτοσυντηρούμενο κύκλωμα {Käkönen SM et al}. Έχει αποδειχθεί η συσχέτιση του RANKL με τη δημιουργία μεταστάσεων διαμέσου CD4+ ρυθμιστικών κυττάρων, γεγονός που αναδεικνύει τη συμμετοχή συγκεκριμένων ανοσολογικών κυττάρων στη διεργασία σχηματισμού μεταστάσεων {Tan W et al}.

Μοριακές αλλοιώσεις στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου του μαστού

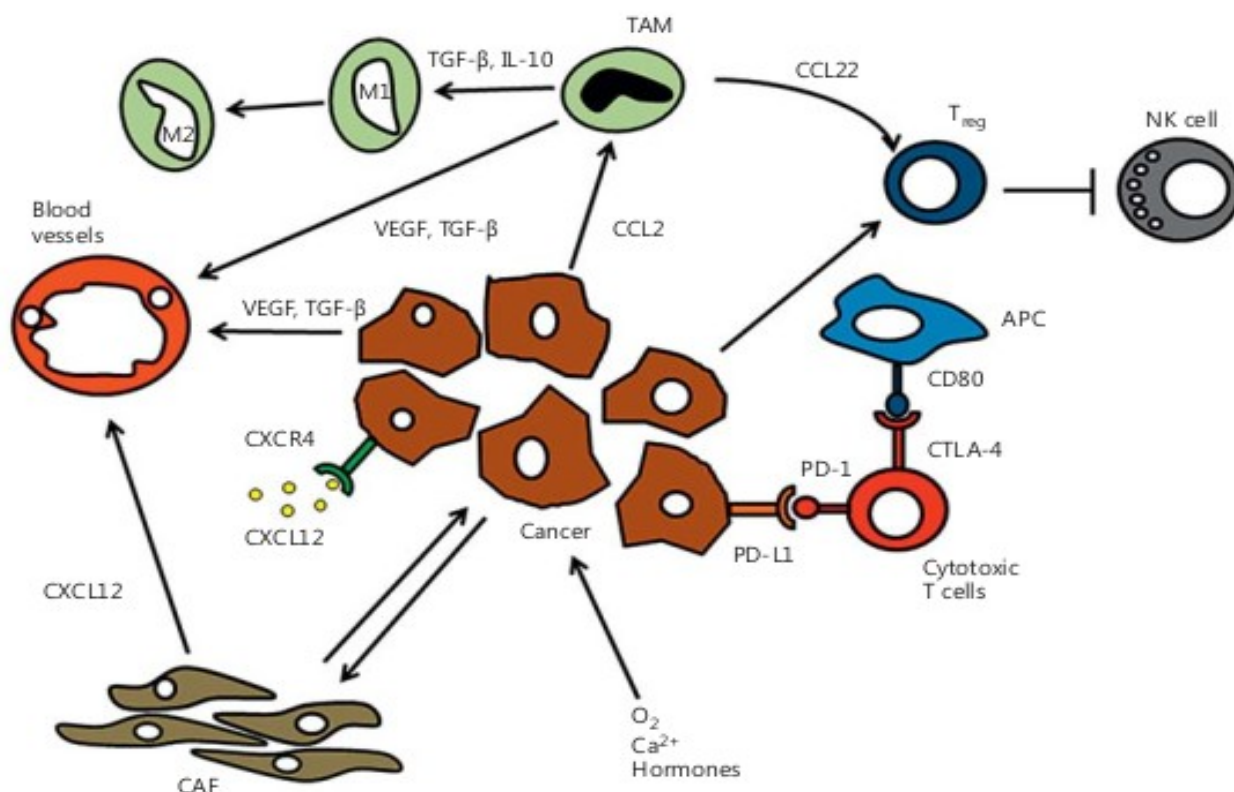
Η γονιδιακή σύγκριση των διαφόρων κυττάρων του μαζικού παρεγχύματος ανάμεσα στο φυσιολογικό μαστό, το ενδοπορικό και το διηθητικό καρκίνωμα ανέδειξαν εκτενείς μεταβολές στην έκφραση γονιδίων σε όλους τους κυτταρικούς τύπους κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης {Allinen M et al}. Ο μεγαλύτερος αριθμός μεταβολών γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται σε μυοεπιθήλια προερχόμενα από φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα και ενδοπορικό καρκίνωμα. Τα κυριότερα γονίδια που υπερκεράσσονται είναι αυτά που κωδικοποιούν τις χημειοκίνες CXCL14 και CXCL12. Αυτές με τη σειρά τους ενώνονται με τον CXCR4 με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα.

Επιπρόσθετα κατά τη μετάβαση από ενδοπορικό σε διηθητικό καρκίνωμα παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γονιδίων αρκετών πρωτεασών που αποδομούν το στρώμα {Ma XJ et al 2009}. Δεδομένου ότι εκτενείς γονιδιακές μεταβολές παρατηρούνται σχεδόν αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα, η ανώμαλη γονιδιακή έκφραση στα στρωματικά κύτταρα σχετιζόμενα με τον όγκο οφείλεται κατά κύριο λόγο σε επιγενετικές μεταβολές (κυρίως μεθυλίωση) του DNA των τελευταίων {Fiegl H}. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την υπόθεση που θέλει τους μυοϊνοβλάστες που σχετίζονται με τους νεοπλασματικούς όγκους και εποικούν το μικροπεριβάλλον αυτών να προέρχονται από βλαστικά κύτταρα του μυελού, μπορεί να θεωρηθεί πως οι επιγενετικές μεταβολές του γονιδιώματος αυτών οφείλονται σε παράγοντες εκκρινόμενους από τα νεοπλασματικά κύτταρα {Direkze NC et al}. Συνεπώς οι νεοπλασματικοί όγκοι συμμετέχουν ενεργά στη διαμόρφωση ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί την ανάπτυξη αυτών των ιδίων. Σε μια πρωτοποριακή έρευνα που συνέκρινε τη γονιδιακή έκφραση των στρωματικών κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνωμα του μαστού {Finak G et al 2008} εντοπίστηκαν δύο διακριτές ομάδες από εμπλεκόμενα γονίδια με προγνωστικούς χαρακτήρες ανεξάρτητους του κλινικού υποτύπου. Η μια ομάδα αφορούσε γονίδια υποξίας και αγγειογένεσης και είχε αρνητική πρόγνωση ενώ η άλλη με θετική πρόγνωση αφορούσε μια ανοσολογική απόκριση τύπου Th1 (έκκριση IFN- γ , IL-2 κ.ο.κ.). Επιπρόσθετα έχει αναγνωριστεί ομάδα γονιδίων που όταν εκφράζεται προσδίδει αντίσταση στη χημειοθεραπεία {Farmer P et al 2009}. Για όλους τους παραπάνω λόγους μελετάται η επιγενετική τροποποίηση των στρωματικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου η οποία θα έχει σκοπό την κανονικοποίηση του στρώματος εμποδίζοντας τον υποστηρικτικό του ρόλο στις νεοπλασίες {Place A et al}.

Στοιχεία μικροπεριβάλλοντος και η διάδρασή τους με τον καρκίνο του μαστού

Ινοβλάστες

Συνήθως τα περισσότερα κύτταρα που ανευρίσκονται εντός του στρώματος στον καρκίνο του μαστού είναι οι ινοβλάστες. Οι εν λόγω ινοβλάστες έχουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γι' αυτό και ονομάζονται και ως ινοβλάστες σχετιζόμενοι με καρκίνο (cancer-associated fibroblasts/CAF-εικόνα 1) {Folgueira MA et al}. Αυτοί εκκρίνουν παράγοντες όπως χημειοκίνες ή/και αυξητικούς παράγοντες που με τη σειρά τους τροποποιούν το στρώμα ευνοώντας τη νεοπλασματική ανάπτυξη και διήθηση {Orimo A et al 2005}{Allen M et al}. Παρ' ότι ομοιάζουν μορφολογικά με φυσιολογικούς ινοβλάστες, εντούτοις παρουσιάζουν διακριτά mRNA και πρωτεϊνικά προφίλ έκφρασης τα οποία και τους διαχωρίζουν από τους ινοβλάστες εκτός νεοπλασματικού στρώματος (λ.χ. υπερέκφραση γονιδίου NOTCH2) {Del Valle PR 2014}. Επιπρόσθετα η διάδραση ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και τους εν λόγω ινοβλάστες υποδεικνύει ότι οι τελευταίοι επηρεάζουν το μεταγραφικό προφίλ των καρκινικών κυττάρων {Folgueira MA et al}. Πολλές θεωρίες είναι προκρινόμενες για την προέλευση αυτών των ινοβλαστών, όπως η επιστράτευσή τους από τον μυελό των οστών {Direkze NC et al 2005} και η μετατροπή απλών ινοβλαστών σε CAF κατόπιν έκκρισης παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα {Martinez-Outschoorn UE et al 2014}. Όπως έχει προαναφερθεί οι εκκρινόμενες μεταλλοπρωτεΐνάσες από τους CAF υποβοηθούν τη νεοπλασματική διήθηση. Η διασπορά της νεοπλασματικής νόσου εκ μέρους των CAF γίνεται και με την απώλεια έκφρασης πρωτεϊνών που οι φυσιολογικοί ινοβλάστες εκφράζουν. Η απώλεια έκφρασης της



Εικόνα 1: Σχηματική διάδραση ανάμεσα σε στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος και καρκινικά κύτταρα του μαστού. Ανατύπωση από {Soysal S.D et al}.

calneolin-1 (ενός μορίου το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες σχετίζεται με την επούλωση των πληγών) συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα χορήγησης μεταστάσεων σε λεμφαδένες, ενώ η αυξημένη έκφρασή της με ευνοϊκότερη επιβίωση {Witkiewicz AK et al 2009}{Sloan EK et al 2009}. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι σχετιζόμενοι με τον όγκο ινοβλάστες μπορεί να σχετίζονται με τη διαμετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στον εγκέφαλο διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό {Choi YP et al 2014}.

Δενδριτικά κύτταρα

Τα δενδριτικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντινεοπλασματική απόκριση του οργανισμού δεδομένης της ιδιότητάς τους να παρουσιάζουν το αντιγόνο στα CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα, ενεργοποιώντας τα έτσι για την αντιμετώπιση των νεοπλασματικών κυττάρων (APC - εικόνα 1). Η ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων σχετίζεται με το μικροπεριβάλλον εντός του οποίου αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν προς τη δημιουργία ανοσοκατασταλτικών ή ανοχογόνων (tolerogenic) δενδριτικών κυττάρων {da Cunha A et al 2014}. Το νεοπλασματικό στρώμα είναι άφθονο σε άωρα δενδριτικά κύτταρα τα οποία έχουν μειωμένη ικανότητα επαγωγής αντινεοπλασματικής δράσης {Fainaru O et al 2010}. Επιπρόσθετα σχετιζόμενα με νεοπλασματικούς όγκους δενδριτικά κύτταρα εκκρίνουν προαγγειογενετικούς παράγοντες οι οποίοι επιστρατεύουν ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλοντας έτσι στη νεοαγγείωση του νεοπλάσματος και την περαιτέρω ανάπτυξή του {Fainaru O et al 2010}. Αυτή η προαγγειογενετική ιδιότητα καταστέλλεται με την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, γεγονός που δικαιολογεί την ευνοϊκότερη πρόγνωση που παρουσιάζουν νεοπλασματικοί όγκοι με παρουσία ώριμων δενδριτικών κυττάρων εντός τους {Lotze MT}. Η παρουσία νεοπλασματικά σχετιζόμενων κυτταροκινών όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor/VEGF) ή η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και η προσταγλανδίνη E2 δρομολογούν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων προς ένα ρυθμιστικού τύπου φαινότυπο που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων {Korkaya H et al}{Liu Q et al}. Για τους παραπάνω λόγους η επαγωγή της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων αποτελεί έναν πιθανό φαρμακολογικό θεραπευτικό στόχο.

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα κύτταρα σχετιζόμενα με τους νεοπλασματικούς όγκους (tumor associated macrophages - TAM) αποτελούν ένα μεγάλο τμήμα του κυτταρολογικού πληθυσμού στον καρκίνο του μαστού και επιδεικνύουν ένα φαινότυπο που να είναι προσανατολισμένος στο να προάγει τη νεοπλασματική ανάπτυξη, την αγγειογένεση, την αναδιαμόρφωση του ιστού και την καταστολή της προσαρμοσμένης/ειδικής ανοσίας (adaptive immunity){Allen M et al}{Mantovani A et al 2008}. Τα εν λόγω κύτταρα προέρχονται από τα κυκλοφορούντα στο αίμα μονοκύτταρα τα οποία επιστρατεύθηκαν στην περιοχή του νεοπλασματικού όγκου από παράγοντες εκκρινόμενους τόσο

από τα νεοπλασματικά όσο και από τα στρωματικά κύτταρα του όγκου, όπως ο συνδέτης της χημειοκίνης 2 (CCL2). Αυτά τα μακροφάγα εκκρίνουν μια πληθώρα παραγόντων που υποβοηθούν τη νεοπλασματική ανάπτυξη όπως κυτταροκίνες (λ.χ. VEGF) και μεταλλοπρωτεϊνάσες {Allen M et al}{Solinas G et al}. Τα μακροφάγα διαχωρίζονται σε κλασικά M1 ή ενεργοποιημένα M2. Τα τελευταία σχετίζονται με απόκριση σε τύπου Th2 κυτταροκίνες που συμμετέχουν κατά την επούλωση πληγών και στην ιστική αναδιαμόρφωση {Allen M et al}. Τα M2 συμβάλλουν επίσης στην επιβίωση και τη διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων εκκρίνοντας διάφορους παράγοντες όπως IL-10, CCL2, CCL17, CCL22, TGF-β {Mantovani A et al} (εικόνα 1). Η έκκριση των χημειοκινών καταστέλλει την αντινεοπλασματική ανοσολογική αντίδραση προσκαλώντας T κυτταρικούς πληθυσμούς στερούμενους κυτταροτοξικής ιδιότητας (Treg) {Solinas G et al}. Πολυάριθμες μελέτες αναδεικνύουν ότι τα υψηλά επίπεδα TAM σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει πως οι θεραπευτικές αγωγές που αποσκοπούν στη μείωση των επιπέδων TAM ή τον επαναπρογραμματισμό τους χρίζει να μελετηθούν περαιτέρω {Zhang Y et al}.

Λεμφοκύτταρα διηθούντα τον όγκο/Tumor infiltrating lymphocytes - TILs

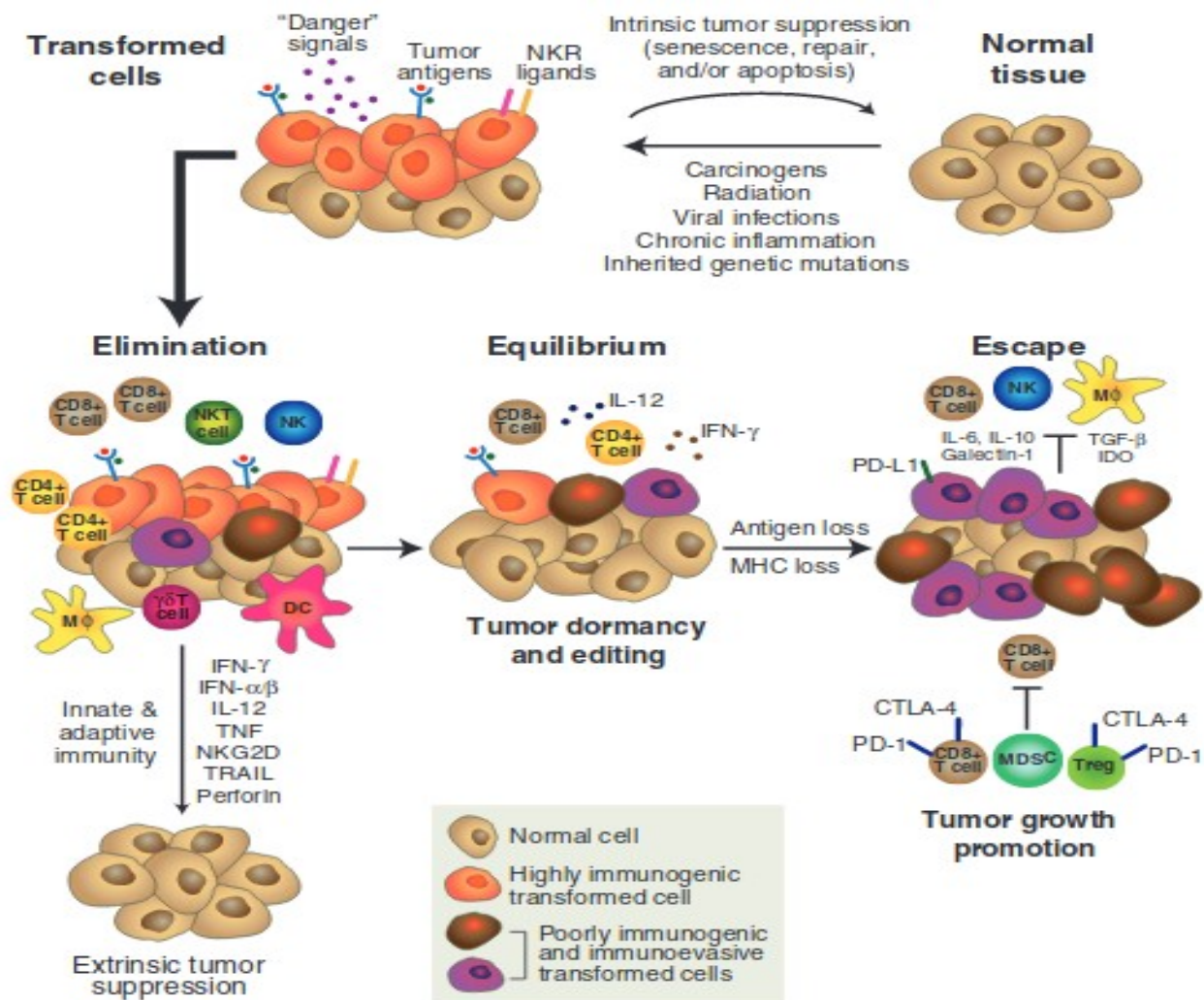
Τα διηθούντα το νεοπλασματικό όγκο λεμφοκύτταρα αναδεικνύονται πλέον ως κύρια στοιχεία του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος. Στην πλειονότητά τους αποτελούνται από T λεμφοκύτταρα τα οποία είναι είτε CD4+ βοηθητικά ή Treg με ανοσοφαινότυπο CD4+, CD25+, Foxp3+ ή δραστικά κύτταρα όπως τα NK και τα CD8+ T λεμφοκύτταρα {Baxevanis CN et al 2019}{Allen M et al}.

Τα Treg λεμφοκύτταρα υπό κανονικές συνθήκες προστατεύουν από αυτοάνοσα νοσήματα καταστέλλοντας τη δράση των αυτοαντιδραστικών T κυττάρων. Τα Treg έχουν την ικανότητα να περιορίζουν τη δράση των CD8+T, NK, B και APC κυττάρων. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου όμως, αυτό ισοδυναμεί με καταστολή της αντινεοπλασματικής δράσης {Jiang X et al}{Baxevanis CN et al 2019}.

Έχει αναδειχθεί πως τα Treg παράγουν μεγάλες ποσότητες RANKL που με τη σειρά του ενεργοποιεί τα νεοπλασματικά κύτταρα που εκφράζουν RANK διευκολύνοντας έτσι τη μεταστατική τους διασπορά, συνεπώς οι υψηλές συγκεντρώσεις Treg σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού {Tan W et al}{Ohara M et al}. Οι νεοπλασματικοί όγκοι έχουν τη δυνατότητα να επιστρατεύουν Treg μέσω έκκρισης E2 προσταγλανδίνης ή ενεργοποίηση του TGF-β μονοπατιού και να καταστέλλουν τη λειτουργία των δραστικών κυττάρων διαμέσου έκκρισης IL-10 και TGF-β, δημιουργώντας έτσι ένα τοπικά ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον {Jiang X}.

Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται ανοσοεκτύπωση (ανοσοδιαμόρφωση) και αποτελεί έναν ακόμη από τους μηχανισμούς που επιστρατεύονται κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής ανάπτυξης (εικόνα 2) {Schreiber RD et al 2011}. Αντιστρόφως, η διήθηση του νεοπλάσματος από

CD8+ δραστικά κύτταρα σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση ανεξαρτήτως αντικειμενικών παραγόντων όπως το νεοπλασματικό grade, η λεμφαδενική διασπορά, το μέγεθος του όγκου, η αγγειακή διήθηση και η υπερέκφραση HER2 {Mahmoud SM et al 2011}. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα των CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων είναι συνισταμένη των διεγερτικών και κατασταλτικών σημάτων στα λεγόμενα ανοσολογικά σημεία ελέγχου (immune check points) {Jiang X}{Muenst S et al}.

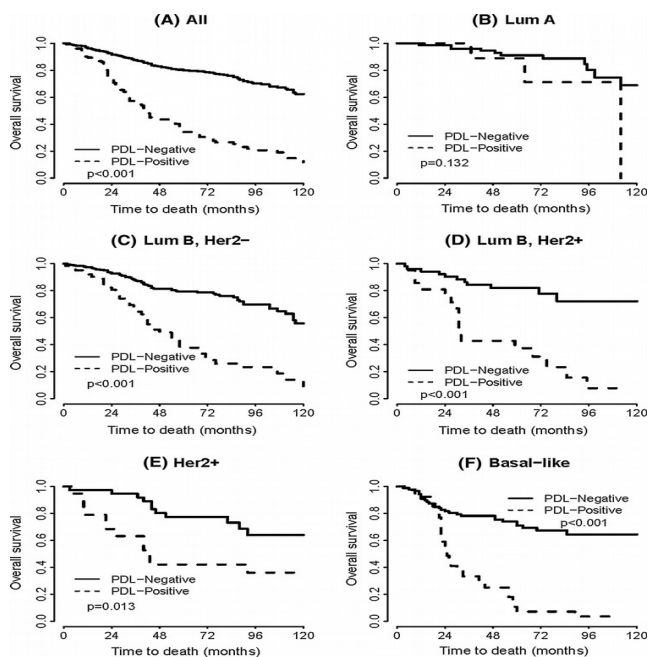


Εικόνα 2: Σχηματικά ο μηχανισμός της ανοσοεκτόπωσης, ανατύπωση από {Schreiber RD et al 2011}.

Μόρια ελέγχου όπως τα PD-1, CTLA-4 και BTLA καταστέλλουν τη δράση των T κυττάρων και μειώνουν τη διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης. Το PD-1 είναι αυτήν τη στιγμή ο πιο ευρέως μελετημένος υποδοχέας ανοσολογικού ελέγχου με το ρόλο του να αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως ένας από τους σημαντικότερους στη διαδικασία της ανοσοεκτόπωσης {Pedoeem A et al 2014}.

Ο PD-1 είναι ένας κατασταλτικός υποδοχέας, ο οποίος διαμέσου της ενώσεώς του με έναν από τους δέτες του (PD-L1 και PD-L2) καταστέλλει την T κυτταρική δράση {Muenst S et al}. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα νεοπλασματικά κύτταρα ως μέσο αποφυγής ή ελάττωσης της ανοσολογικής T αντίδρασης του οργανισμού.

Δημιουργείται έτσι μια μοριακή ασπίδα (όπως έχει εύστοχα ονομαστεί το ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προκύπτει) η οποία διευκολύνει τη νεοπλασματική ανάπτυξη και διασπορά {Muenst, S et al 2014 b}. Η έκφραση του PD-1 στα λεμφοκύτταρα και του PD-L1 στα νεοπλασματικά κύτταρα έχει ανευρεθεί σε πολλούς συμπαγείς όγκους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, όπου και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση (εικόνα 3). Η καταστολή του PD-1 ή του PD-L1 όπως εφαρμόζεται με επιτυχία σε άλλα νεοπλάσματα μπορεί να αναδειχθεί ως θεραπεία επιλογής και στα καρκινώματα του μαστού.



Εικόνα 3: Με εξαίρεση τα Luminal A καρκινώματα η έκφραση PD-L1 από τα νεοπλασματικά κύτταρα φαίνεται να συνδέεται με δυσμενή έκβαση. Ανατύπωση από {Muenst, S et al 2014 b}.

Καταγραφή/καταμέτρηση των TILs στον καρκίνο του μαστού κατά International TIL Working Group (μέθοδος κατά Salgado)

Λόγω της εξαιρετικής σημασίας των TILs στον καρκίνο του μαστού, έχουν προταθεί από το international TIL working group συγκεκριμένα κριτήρια μέτρησης και αξιολόγησης {Salgado, R et al 2014}:

1. Τα TILs καταμετρώνται ως ποσοστό που καταλαμβάνει το στρώμα του όγκου. Οι διακυμάνσεις είναι ανά 5% ή 10% και χωρίζονται σε TIL-low/group A (0-10%), TIL-moderate/ group B (10-40%), TIL-high/group C (40-90%).
2. Προσμετρώνται μόνο τα TILs στο στρώμα εντός του όγκου.
3. Δεν μετρώνται τα TILs γύρω από: DCIS, φυσιολογικά λόβια, νέκρωση, υαλίνωση από παρακέντηση.
4. Συνυπολογίζονται και τα πλασματοκύτταρα. Δεν προσμετρώνται τα πολυμορφοπύρνα.
5. Μία (1) τομή όγκου είναι αρκετή. Η μέτρηση γίνεται σε μεγέθυνση X200 ή X400.
6. Γίνεται πλήρης εκτίμηση του όγκου στην τομή και όχι εστίαση σε hot-spot.
7. Η στρογγυλοποίηση κατά την καταγραφή της μέτρησης των TIL γίνεται στο πλησιέστερο 5% ή 10%.

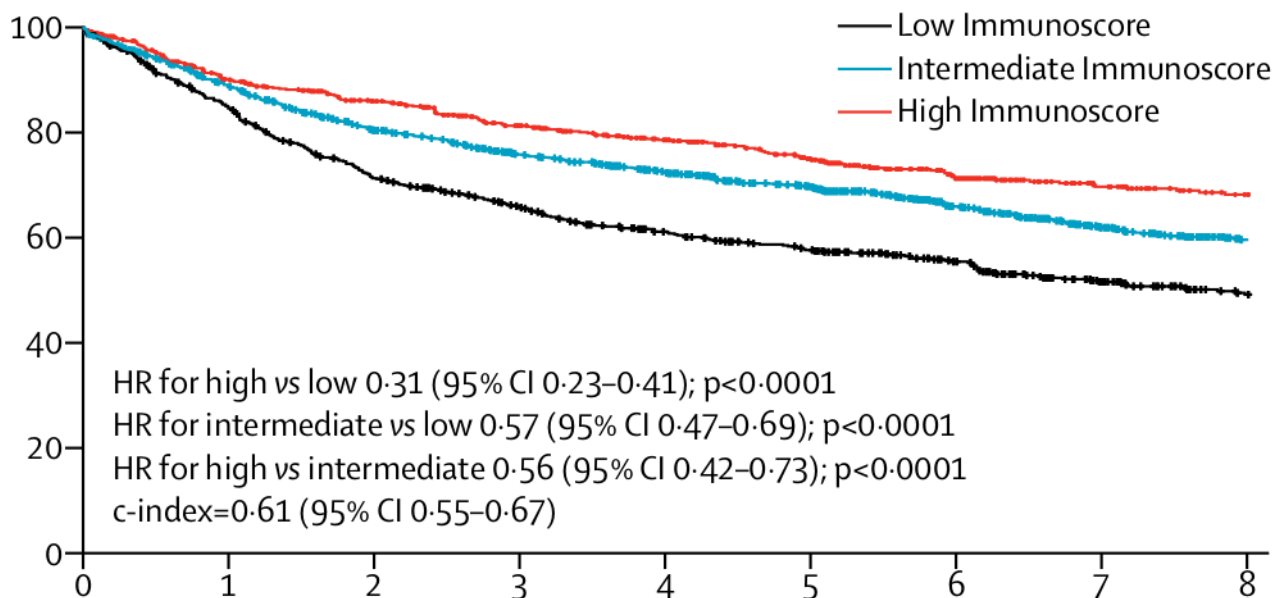
Με βάση την παραπάνω μεθοδολογία έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αναδεικνύουν πως η αυξημένη συγκέντρωση των TILs αποτελεί προγνωστικό δείκτη στην απόκριση στη θεραπεία σε όλους τους μοριακούς τύπους του καρκίνου του μαστού {Denkert C et al 2018}.

Τοπογραφική/διαμερισματική κατανομή φλεγμονωδών κυττάρων

Προγνωστικής σημασίας, όμως, είναι και ο τοπογραφικός καταμερισμός των φλεγμονωδών στοιχείων δεδομένου ότι υπάρχει διάδραση ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα και το

ανοσοπεριβάλλον του όγκου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σημαντικοί συσχετισμοί έχουν αναδειχθεί ανάμεσα στην πυκνότητα του φλεγμονώδους διηθήματος και την έκβαση της νόσου.

Στα περισσότερα νεοπλάσματα ένα πυκνό λεμφοκυτταρικό διήθημα σχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση. Πιο συγκεκριμένα και στον καρκίνο του παχέος εντέρου έχει προταθεί από τον J. Galon μια ανοσολογική ταξινόμηση, που λαμβάνει υπ' όψιν την πυκνότητα και τον εντοπισμό κάποιων φλεγμονωδών στοιχείων (CD8+, CD3+ ή CD45RO+ λεμφοκυττάρων) ως ένας προγνωστικός βιολογικός δείκτης πιο αξιόπιστος των AJCC/TNM που χρησιμοποιούνται τώρα {Galon, Jérôme et al. 2014}. Σε αυτήν η ταξινόμηση αξιολογεί, σε 2 συνολικά πλακίδια προερχόμενα από τον ίδιο κύβο παραφίνης, τις πυκνότητες των CD8+ και CD3+ (ή CD45RO) στο κέντρο του όγκου και τη διηθητική παρυφή. Ο μέσος όρος των τεσσάρων ποσοστών των ανοσοϊστοχημικά εξεταζόμενων κυτταρικών πυκνοτήτων (2 πλακίδια με 2 ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έκαστο) ορίζει το immunoscore. Ποσοστά κάτω του 25% θεωρούνται ότι ταξινομούν το νεόπλασμα ως χαμηλού βαθμού λεμφικής διήθησης (low immunoscore), από 25%-70% ως διαμέσου βαθμού (intermediate immunoscore), ενώ ποσοστά άνω του 70% το κατατάσσουν ως υψηλόβαθμης λεμφοκυτταρικής διήθησης (high immunoscore). Τα νεοπλάσματα που ανήκουν στις δυο τελευταίες ομάδες παρουσιάζουν σαφώς ευνοϊκότερη πρόγνωση {Pagès F et al}.

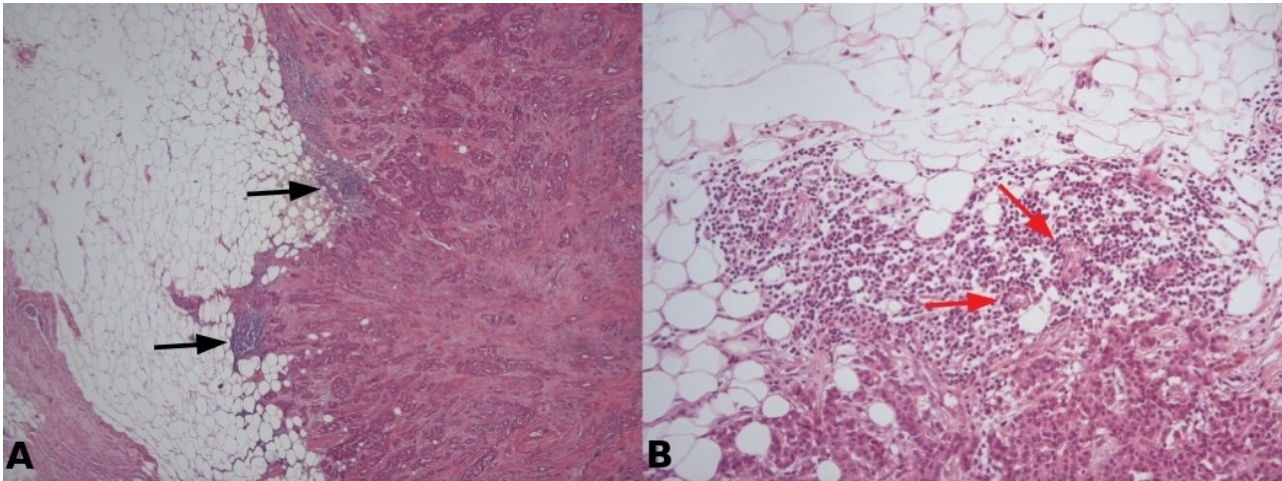


Εικόνα 4: Διάστημα ελεύθερο νόσου ανάλογα με το Immunoscore. Κάθετος άξονας ποσοστό άνευ υποτροπής, οριζόντιος άξονας έτη μετά τη χειρ. επέμβαση. Ανατύπωση από {Pagès F et al}.

Ένα από τα αντικείμενα που θα εξεταστούν σε αυτήν τη διατριβή είναι κατά πόσο έχει σημασία η διαφορετική κατανομή φλεγμονωδών στοιχείων (CD8+, CD163+) στην περιφέρεια και το κέντρο του όγκου στον καρκίνο του μαστού.

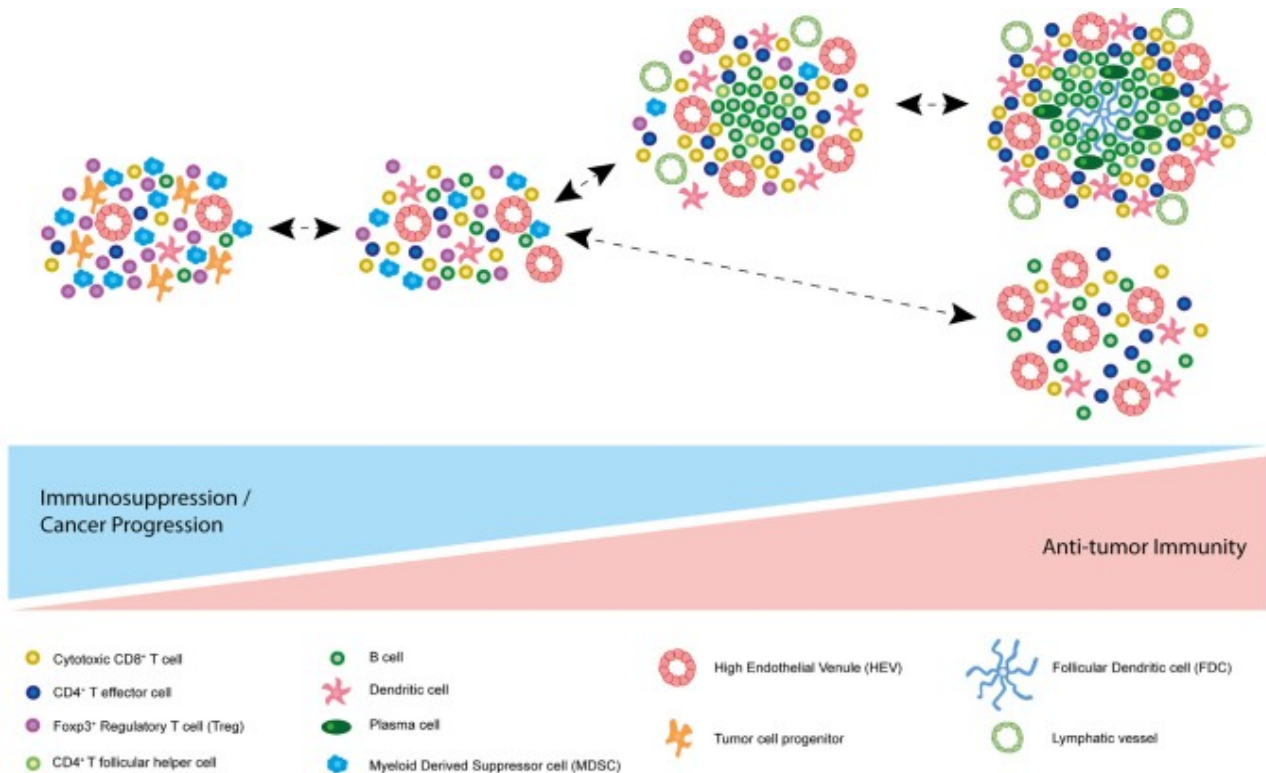
Τριτογενείς λεμφικές δομές / Tertiary Lymphoid Structures – TLS

Τόσο εντός άλλα κυρίως κατά την περιφέρεια των νεοπλασματικών όγκων παρατηρούνται ωοειδείς λεμφοκυτταρικές αθροίσεις που εμπεριέχουν φλεβίδια με υψηλού τύπου ενδοθήλιο (High endothelial venules / HEVs) ή/και βλαστικά κέντρα (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Α: Περινεοπλασματικά TLS (μαύρο βέλος) A&H X40. Β: HEVs στο περινεοπλασματικό TLS (κόκκινο βέλος) A&H X100.

Οι εν λόγω αθροίσεις παρουσιάζονται ως αντίδραση σε εμμένοντα αντιγονικό ερεθισμό στο πλαίσιο μιας μη επιλυόμενης (μη αποδραμούσας) χρόνιας φλεγμονής {Colbeck EJ et al 2017}. Τα φλεβίδια με υψηλού τύπου ενδοθήλιο μεταφέρουν λεμφοκύτταρα από την παρακείμενη κυκλοφορία στις λεμφοειδείς δομές. Η μορφολογία και οι επιμέρους ιδιότητες του αγγειακού



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων βαθμών οργάνωσης των TLS με αναφορά στη σχετιζόμενη ανοσοκατασταλτική ή ογκοκατασταλτική τους δράση. Ανατύπωση από {Colbeck EJ et al 2017}.

τοιχώματος των τελευταίων δίνει στα λεμφοκύτταρα τη δυνατότητα διαπέρασης εντός των λεμφοειδών οργάνων/δομών.

Ο όρος τριτογενείς λεμφικές δομές (TLS) μπορεί να αναφερθεί σε δομές διαβαθμιζόμενης οργάνωσης που κυμαίνονται από απλές λεμφοκυτταρικές αθροίσεις T κυττάρων μέχρι σαφώς οργανωμένες δομές που ομοιάζουν στα δευτερογενή λεμφοκυτταρικά όργανα (απαρτίζονται από ένα κεντρικό διαμέρισμα αποτελούμενο από B λεμφοκύτταρα και θυλακικά δενδριτικά κύτταρα το οποίο περιβάλλεται από T κύτταρα).

Δεδομένου ότι οι νεοπλασματικοί όγκοι δημιουργούν ένα ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον θα περίμενε κανείς πως η παρουσία των TLS σε αυτούς θα σπάνιζε. Όμως σε αντίθεση με αυτό έχουν παρατηρηθεί TLS στην πλειονότητα των συμπαγών όγκων, τόσο εντός όσο και κατά την περιφέρεια αυτών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Γενικώς η παρουσία των TLS σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση, ωστόσο λόγω της απουσίας υπάρξεως καθορισμένων κριτηρίων ορισμού, μέτρησης και αξιολόγησης των TLS σε κάποια καρκινώματα η προγνωστική αξία της ύπαρξης αυτών είναι αμφιλεγόμενη. Στον καρκίνο του μαστού, στις 7 μελέτες που έχει εξεταστεί, η προγνωστική αξία των TLS οι 5 ανέδειξαν ευνοϊκή προγνωστική αξία στην παρουσία αυτών ενώ άλλες δύο δυσμενή (πίνακας 1). Τρία από τα αντικείμενα που θα πραγματευτεί αυτή η διατριβή αποτελούν η ποσοτική καταμέτρηση των TLS που περιβάλλουν τα καρκινώματα του μαστού, ο τοπογραφικός τους διαχωρισμός και η πιθανή αξιολόγησή τους ως προγνωστικός δείκτης.

Χαρακτηριστικά των TLS που αξιολογήθηκαν	Τοπογραφική κατανομή αξιολόγησης	Προγνωστική αξία	Βιβλιογραφική Αναφορά
Διαμερισματικά T και B ζώνες, βλαστικά κέντρα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα, Tfh λεμφοκύτταρα και βλαστικά κέντρα	Στρώμα όγκου και περινεοπλασματικά	Ευνοϊκή (σχετιζόμενη με ελεύθερο νόσου και υπογραφή 8 γονιδίων Tfh λεμφοκυττάρων)	{Gu-Trantien et al}
T κύτταρα, B κύτταρα, ώριμα δενδριτικά, FoxP3+ Tregs, HEVs	Στρώμα όγκου και περιφερικά ενδοπορικού καρκινώματος	Ευνοϊκή (Ανέδειξε σχέση HEV με ρίσκο υποτροπής, ελεύθερο νόσου και συνολική επιβίωση)	{Ludovic Martinet et al 2013}
T κύτταρα, ώριμα δενδριτικά, FoxP3+ Tregs	Στρώμα όγκου και περινεοπλασματικά	Δυσμενής. Ανέδειξε σχέση / στρατολόγηση Tregs στα TLS με μειωμένη συνολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερη νόσου	{Gobert M et al}
Διαμερισματικά T και B ζώνες, βλαστικά κέντρα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα, Tfh λεμφοκύτταρα, HEVs	Στρώμα όγκου και περινεοπλασματικά	Δυσμενής. Σχέση TLS με grade νεοπλάσματος	{Figenschau et al 2015}
T κύτταρα, B κύτταρα, HEVs	Περινεοπλασματικά συμπεριλαμβανομένου ενδοπορικού στοιχείου άλλα σε βιοψία προ	Ευνοϊκή. Ανέδειξε σχέση HEVs με TLS και ελεύθερο νόσου	{Song I H et al}

Χαρακτηριστικά των TLS που αξιολογήθηκαν	Τοπογραφική κατανομή αξιολόγησης	Προγνωστική αξία	Βιβλιογραφική Αναφορά
	neoadjuvant		
Λεμφικές αθροίσεις με HEVs με ή χωρίς βλαστικά κέντρα. Καταμέτρηση TILs με κριτήρια Salgado	Περινεοπλασματικά συμπεριλαμβανομένου και του ενδοπορικού στοιχείου. Μόνο σε TNBC	Ευνοϊκή. Ανέδειξε σχέση TILs με αριθμό (ποσοστό περιφερικής κάλυψης) TLS και ελεύθερο νόσου	{Lee HJ et al}
T κύτταρα, B κύτταρα, λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα. Παρουσία νεοπλασματικών βλαστών εντός TLS	Περινεοπλασματικά, χωρίς ενδοπορικό στοιχείο	Ευνοϊκή. Ανέδειξε σχέση TILs με παρουσία ή απουσία TLS και επιβίωση	{Liu X et al 2017}

Πίνακας 1: Οι μελέτες στις οποίες καταγράφονται οι προγνωστικοί χαρακτήρες των TLS στο καρκίνο του μαστού. Ανατύπωση και τροποποίηση από {Colbeck EJ et al 2017}

Εξωκυττάριο στρώμα

Το εξωκυττάριο στρώμα (ή ενδοκυττάρια ουσία) είναι ένα πλούσιο δίκτυο πρωτεϊνών που περιβάλλει και σταθεροποιεί τα ευρισκόμενα εντός αυτού κύτταρα. Αποτελείται από τριών ειδών πρωτεΐνες: δομικού τύπου (όπως κολλαγόνο και ελαστίνη), γλυκοπρωτεΐνες (φιμπρονεκτίνη) και πρωτεογλυκάνες (θειική χονδροϊτίνη) {Roy DM et al}. Το κυριότερο δομικό στοιχείο του στρώματος είναι το κολλαγόνο, η δομική ακεραιότητα του οποίου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη νεοπλασματική ανάπτυξη καθότι η αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου IV από πρωτεάσες διευκολύνει τη διήθηση πέραν της βασικής μεμβράνης {Tanjore H et al 2006}. Κατά την παρουσία νεοπλασματικού όγκου τόσο η αρχιτεκτονική όσο και οι βιοχημικές ιδιότητες του ενδοκυττάρου στρώματος είναι διαφορετικές {Lu P et al 2012}. Σε σύγκριση με το φυσιολογικό στρώμα το καρκινικό παρουσιάζεται συνήθως σκληρότερο, γεγονός που καθιστά τα καρκινώματα του μαστού κλινικώς ψηλαφητά. Αυτή η αύξηση στη σκληρότητα του στρώματος αποδίδεται στην οξειδάση της λυσίνης (lysyl oxydase – LOX), ένα ένζυμο που ρυθμίζει την ωρίμανση των ινιδίων κολλαγόνου και τη διασύνδεση μορίων (cross-linking) κολλαγόνου και ελαστίνης {Lu P et al 2012}. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα (ποντίκια) έχουν αποδείξει πως η αύξηση της έκφρασης αυτού του ενζύμου διευκολύνει τη διηθητική ανάπτυξη των καρκινωμάτων, ενώ έχει παρατηρηθεί και υπερέκφραση αυτού του ενζύμου και στις μεταστατικές εστίες {Levental KR et al}. Τέλος, εξωκυττάριο στρώμα διευκολύνει τη νεοπλασματική ανάπτυξη εμποδίζοντας στα T κύτταρα τη φυσιολογική τους ωρίμανση και διαφοροποίηση, δυσχεραίνοντας έτσι την ικανότητα του ανοσολογικού συστήματος να αντιδράσει έναντι στα καρκινικά κύτταρα {Lu P et al 2012} {Bollyky PL et al}.

Το μικροπεριβάλλον στον καρκίνο του μαστού ως θεραπευτικός στόχος

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερα στοιχεία που απαρτίζουν το μικροπεριβάλλον των όγκων στοχεύονται φαρμακολογικά. Δεδομένου ότι τα στρωματικά κύτταρα των όγκων είναι γενετικά αμετάβλητα και συνεπώς λιγότερο επιρρεπή στο να αναπτύξουν ανθεκτικότητα έναντι στη θεραπεία, αποτελούν πολλά υποσχόμενους φαρμακολογικούς στόχους. Τρεις τύποι θεραπείας που στοχεύουν το μικροπεριβάλλον του μαστού χρησιμοποιούνται ήδη στη σημερινή πρακτική. Οι αναστολείς αρωματάσης, οι αναστολείς HER2 και οι αναστολείς αγγειογένεσης. Οι τελευταίοι (VEGF inhibitors) έχει αποδειχθεί πως αυξάνουν το χρονικό διάστημα κατά το οποίο δεν εξελίσσεται η νόσος (progression free survival) όταν συμπεριληφθούν σε σχήμα με άλλο χημειοθεραπευτικό φάρμακο. Παρουσιάζουν ωστόσο σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες {Ranpura V et al}. Η στόχευση λοιπόν του μικροπεριβάλλοντος μπορεί να δημιουργήσει επιβλαβείς παρενέργειες, αφού τροποποιεί τις φυσιολογικές ομοιοστατικές λειτουργίες.

Στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν ερευνηθεί ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Ένας από αυτούς είναι η αποκατάσταση του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος του όγκου ως αντινεοπλασματικό, με στόχο να περιορίσει τη νεοπλασματική ανάπτυξη. Ο επαναπρογραμματισμός των σχετιζόμενων με όγκους μακροφάγων (TAMs) από M2 σε M1 φαινότυπο ή ο περιορισμός «στρατολόγησης» αυτών στην περιοχή του νεοπλάσματος βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας {DeNardo DG et al}. Σε μοντέλα ποντικών η καταστολή της στρατολόγησης των μακροφάγων στις νεοπλασματικές εστίες με τη χρήση συνδυασμού CSFR1 με Paclixatel αυξάνουν την επιβίωση, μειώνοντας την ταχύτητα της νεοπλασματικής ανάπτυξης αλλά και τη συχνότητα πνευμονικών μεταστάσεων {DeNardo DG et al}. Παρόμοια σχήματα είναι υπό δοκιμή και σε ασθενείς με μεταστατική νόσο καρκίνου μαστού, όπου και αναμένεται η κοινοποίηση των αποτελεσμάτων. Ένα άλλο μόριο, το Trabectin, που παρουσιάζει επιλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι των TAMs έχει ήδη δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα {Delalogue S et al 2014}. Μείωση των TAMs παρατηρείται και με τη χορήγηση Doxorubicin {Hannesdottir L et al 2013}.

Πολλαπλά σκευάσματα που στοχεύουν τον άξονα των κυτταροκινών CXCL12/CXCR4 είναι υπό σχεδιασμό αυτήν τη στιγμή. Από αυτά το αντι-CXCR4 μόριο AMD3100 (Plerixafor) είναι το πιο μελετημένο σε ζωικά μοντέλα και σε κάποιους συμπαγείς όγκους, χωρίς όμως να έχει δοκιμαστεί ακόμα στον καρκίνο του μαστού {Ramsey DM et al}.

Ένας ακόμη στρατηγικός στόχος στο μικροπεριβάλλον των όγκων είναι το μπλοκάρισμα του μονοπατιού PD-1/PD-L1. Πολλαπλές κλινικές δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί και η χρήση των αντισωμάτων αντι-PD-1/PD-L1 έχει περάσει στην καθημερινή πρακτική σε κάποιους συμπαγείς όγκους, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα και το μελάνωμα. Στα τριπλά αρνητικά καρκινώματα του μαστού έχει παρατηρηθεί εμφανής θετική απόκριση στο 24%, ενώ ποσοστό της τάξης του 10% (στην ίδια μελέτη) παρουσίασε πλήρη απόκριση {Gibson J 2015}. Συνεπώς χρήζει

πραιτέρω διερεύνησης η χρήση anti-PD-L1, PD-1 φαρμακολογικών σκευασμάτων ιδιαίτερα στα τριπλά αρνητικά καρκινώματα του μαστού που οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες.

Η μείωση ή και εξάλειψη του πληθυσμού των Tregs είναι (μια ακόμη) θεραπευτική επιλογή που τελεί υπό διερεύνηση. Δεδομένου ότι τα Tregs εξαρτώνται από την IL-2, η εξουδετέρωσή της μειώνει σημαντικά τον αριθμό τους, συνεπώς και την ανοσοκατασταλτική τους δράση {Jiang X 2014}{Curiel TJ 2008}.

Τέλος, υπάρχουν και παράγοντες που στοχεύουν στην αναστολή της οξειδάσης της λυσίνης (LOX), ένζυμο ευθυνόμενο για τη σκληρότητα του στρώματος, οι οποίοι όμως είναι ακόμη υπό δοκιμή σε ζωικά μοντέλα{Chen LC et al}.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

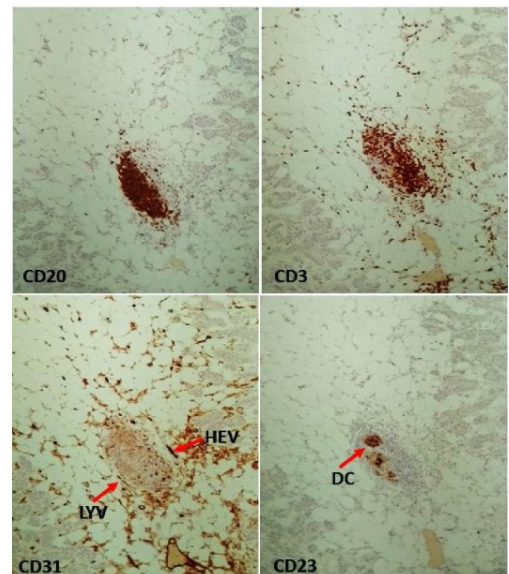
Επιλογή ασθενών

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 167 γυναίκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού μη ειδικού ιστολογικού τύπου (NST) που δεν είχε χορηγήσει απομακρυσμένη μετάσταση και δεν διηθούσε θωρακικό τοίχωμα ή εξέλκωνε το υποκείμενο δέρμα. Οι ασθενείς είχαν χειρουργηθεί και διαγνωστεί στο Νοσοκομείο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας» την περίοδο 2000-2015. Διερευνήθηκαν περισσότεροι από 2.000 φάκελοι για να επιλεγθούν στο τέλος όσοι πληρούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις, είχαν επαρκή στοιχεία follow-up (μέσος όρος παρακολούθησης ≈ 7 χρόνια) και υπήρχε διαθέσιμο άφθονο βιολογικό υλικό υπό μορφή block παραφίνης. Επιπλέον εξαιρέθηκαν της παρούσας μελέτης ασθενείς που είχαν προεγχειρητικά λάβει νεοεπικουρική χημειοθεραπεία. Αποκλείστηκαν επίσης ασθενείς με ιστορικό άλλης νεοπλασίας, καθώς και όσοι ανέπτυξαν δεύτερο πρωτοπαθές νεόπλασμα.

Επιλογή κύβων παραφίνης και ανοσοϊστοχημεία

Ανασκοπήθηκαν τα ιστολογικά πλακίδια καθενός εκ των παραπάνω αναφερθέντων διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού από δύο παθολογοανατόμους, οι οποίοι και επέλεξαν για κάθε όγκο μια ιστολογική τομή. Η εν λόγω τομή έπρεπε να εμπεριέχει νεοπλασματικό όγκο με εμφανές και πλούσιο διηθητικό μέτωπο (μέση τιμή μήκους διηθητικού μετώπου 40,5 χιλιοστά) συνοδευόμενο από τουλάχιστο 5 χιλιοστά πάχους περινεοπλασματικό μαζικό παρέγχυμα. Επιλέχθηκε το αντίστοιχο ιστολογικό block παραφίνης (νεοπλασματικού ιστού μονιμοποιημένου στη φορμόλη (Formalin Fixed Paraffin Embedded – FFPE) από το οποίο και ελήφθησαν πολλαπλές εν σειρά ιστολογικές τομές πάχους 3-4 μ . Σε αυτές τις τομές πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα ειδικά για CD4 (4B12, 1:40, Biogenex), CD8 (SP16, 1:80, Thermo Scientific), CD163 (10D6, 1:400, Biocare) και FOXP3 (236A/E7, 1:100, Abcam) με σκοπό τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των φλεγμονωδών στοιχείων εντός του κέντρου του όγκου (TC) του διηθητικού μετώπου (IM) αλλά και των TLS.

Όσον αφορά τα τελευταία, στις αμφίσημες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν επικουρικά οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις CD20 (L26, 1:500, Dako), CD3 (LN10, 1:200, Novocastra), CD23 (DAK-CD23, 1:80, Dako) και CD31 (JC70A, 1:70, Dako) για την επιβεβαίωση της παρουσίας τους, αναδεικνύοντας τα B, T λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά



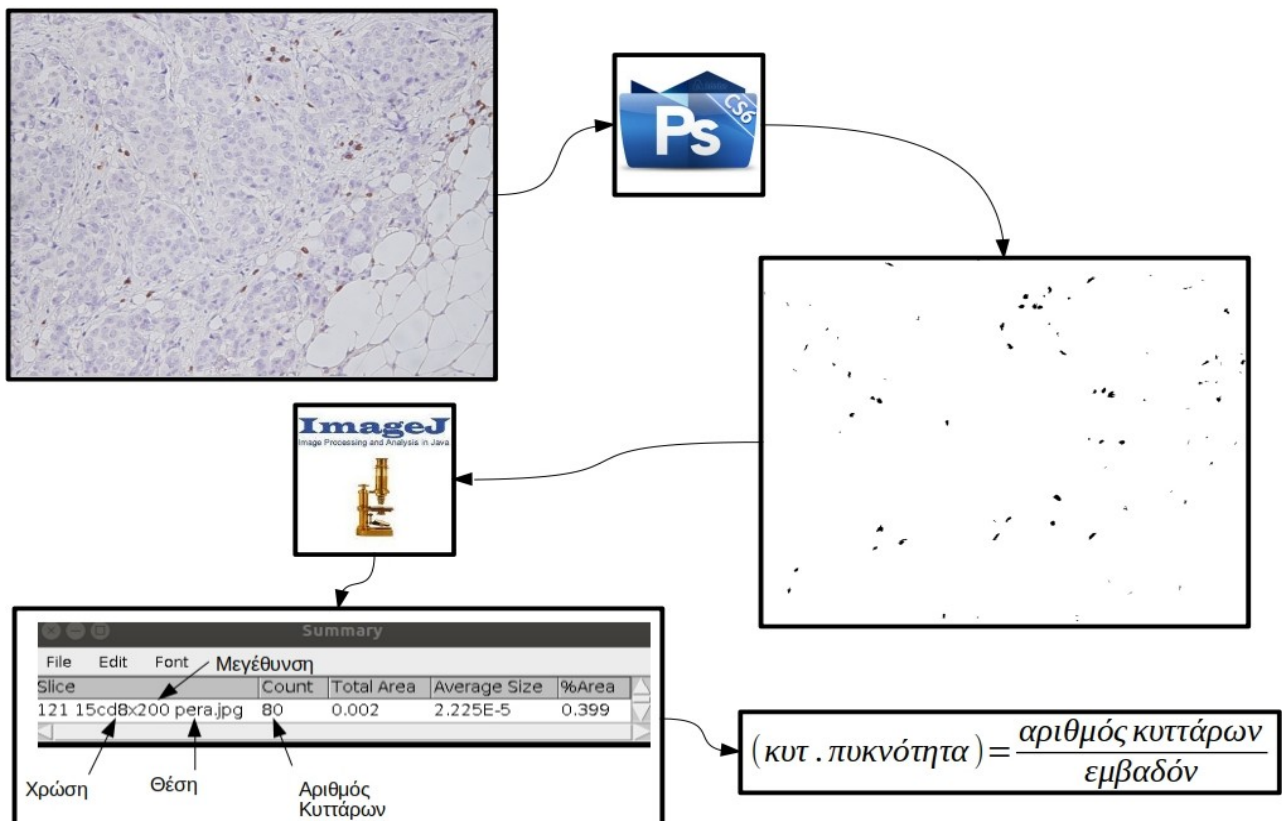
Εικόνα 1: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD20, CD3, CD31 και CD23.

κύτταρα και τα φλεβίδια με υψηλού τύπου ενδοθήλιο (High Endothelial Venules – HEVs) αντίστοιχα (εικόνα 1).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η χρώση CK7 για την επιβεβαίωση/ανάδειξη νεοπλασματικών βλαστών εντός των TLS. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αυτόματου συστήματος Leica Bond III (Leica Biosystems, Melbourne, Australia) και του αντίστοιχου κιτ ανίχνευσης Leica detection kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). Το πρωτόκολλο (οι συνθήκες και οι βέλτιστες αραιώσεις των παραπάνω αντισωμάτων) καθορίστηκε σε τομές υπερπλαστικών αμυγδαλών. Αυτό περιελάμβανε την ανάκτηση αντιγονικών επιτόπων σε υψηλό pH για την περίπτωση των CD4, CD163 και FoxP3 και σε χαμηλό pH για το CD8. Η οπτικοποίηση έγινε με τη χρήση χρωμογόνου διαμινοβενζιδίνης (DAB).

Αξιολόγηση - ανίχνευση - ποσοτικοποίηση TILs και M2 μακροφάγων ανά νεοπλασματικό διαμέρισμα

Ελήφθησαν κατά μέσο όρο 9 μικροφωτογραφίες από κάθε ανοσοϊστοχημικά χρωσμένο πλακάκι (συνολικά 5.652 φωτογραφίες) με NIKON DXM-1200 Digital Camera σε ανάλυση 3.840 X 3.072 pixels από NIKON Eclipse E800 μικροσκόπιο με φακούς E-Plan Achromat. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των μικροφωτογραφιών ήταν το Automatic Camera Tamer (ACT-1) Version 2. Οι εικόνες αποθηκεύτηκαν ως JPEG σε ποιότητα 95% χωρίς κάποια περαιτέρω επεξεργασία πέραν της ισορροπίας λευκού (white balance), η οποία και ρυθμιζόταν πριν από τη λήψη των μικροφωτογραφιών. Τρεις φωτογραφίες ελήφθησαν από το κεντρικό μέρος του όγκου (TC - tumor center) σε μεγέθυνση X100 και έξι από το διηθητικό μέτωπο (IM - invasive margin)



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάλυσης και ποσοτικοποίησης των μικροφωτογραφιών.

του κάθε όγκου σε μεγέθυνση X200. Η ανάλυση των εικόνων και η ποσοτικοποίηση των διηθητικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των Adobe Phothoshop CS6 και ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Το πρώτο λογισμικό χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των θετικών κυττάρων κεχρωσμένων με DAB με βάση τη χροιά τους. Τα θετικά κύτταρα κατόπιν βάφονταν μαύρα και η υπόλοιπη εικόνα μετατρέποταν σε άσπρο φόντο. Οι ασπρόμαυρες (πλέον) εικόνες αναλύονταν με το λογισμικό imageJ και λαμβάνοντας υπ' όψιν τα εμβαδά των μικροφωτογραφιών (υπολογισμένα από ειδικά βαθμονομημένο πλακίδιο) για τις μεγεθύνσεις 100X και 200X υπολογίστηκε ο αριθμός κυττάρων ανά $\chi\lambda^2$ (εικόνα 2). Η μεγέθυνση 100X επιλέχθηκε για το κέντρο του όγκου ως η ευρύτερη δυνατή όσον αφορά την κάλυψη εμβαδού και την ικανότητα του εξοπλισμού (μικροσκόπιο, φωτογραφικός φακός/αισθητήρας κάμερας) να αναδείξει διακριτά κύτταρα στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Η μεγαλύτερη μεγέθυνση χρησιμοποιήθηκε για το διηθητικό μέτωπο του όγκου και προτιμήθηκε της πρώτης προς αποφυγήν της προσμέτρησης κυττάρων που ανήκουν στο μέσο του όγκου ως και κύτταρα εκτός του όγκου.

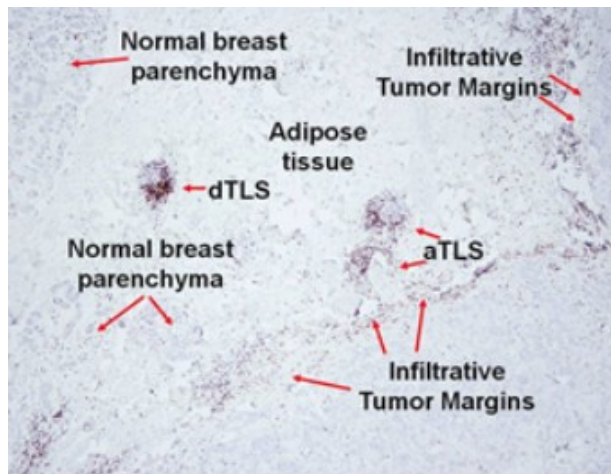
Ποσοτικοποίηση TLS και σχηματισμός ομάδων

Η παρουσία και η θέση των περινεοπλασματικών TLS κάθε όγκου εξετάστηκε στις παραπάνω εν σειρά ληφθείσες τομές (A&H και ανοσοϊστοχημικές) και μόνο όσα TLS απείχαν έως 5 χιλιοστά από το διηθητικό μέτωπο του όγκου, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που σχετίζονταν με ενδοπορικό καρκίνωμα (DCIS), μετρήθηκαν {Vingiani A, Viale G (2017)}{Liu X et al 2017}. Στα πλακάκια αιματοξυλίνης-ηωσίνης ως TLS αναγνωρίστηκαν/προσμετρήθηκαν διακριτές ωοειδείς λεμφοκυτταρικές αθροίσεις που παρουσίαζαν HEVs και/ή βλαστικό κέντρο. Δεδομένου ότι η ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης έχει αποδειχθεί πως μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της παρουσίας των TLS {Buisseret L et al 2017} (αν και αυτό αφορά κυρίως την ενδονεοπλασματική εντόπισή τους) χρησιμοποιήθηκαν, σε αμφίσημες περιπτώσεις, επικουρικά οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις CD31, CD20, CD3 και CD23. Για κάθε νεοπλασματικό όγκο τουλάχιστον 5 πλακάκια (1 A&H και 4 με ανοσοϊστοχημική χρώση) αξιολογήθηκαν και ο ακριβής αριθμός των TLS καταγράφηκε.

Στη συνέχεια τα TLS διαχωρίστηκαν σε εγγύς (εφαπτόμενα) aTLS και απομακρυσμένα dTLS. Η διάκριση αυτή έγινε με βάση την απόσταση και την πιθανή παρεμβολή φυσιολογικού μαζικού παρεγχύματος (λόβια, πόροι, λιπώδης ιστός στερούμενος φλεγμονής και δεσμοπλασίας) ανάμεσα στα TLS και το διηθητικό μέτωπο του όγκου {Pedersen L et al 2004}. Το τελευταίο στην παρούσα μελέτη ορίζεται ως το εξωτερικό όριο του νεοπλάσματος, αγνοώντας τυχόν δεσμοπλαστική και ινοβλαστικού τύπου αντίδραση. Ως aTLS προσμετρήθηκαν εκείνα που εφαπτόνταν στο διηθητικό μέτωπο του όγκου ή συνδέονταν με αυτό με μη φυσιολογικό ιστό (δεσμοπλαστικό, ινοβλαστικό) και όσα σχετίζονταν με DCIS. Ως dTLS καταχωρήθηκαν εκείνα που

διαμεσολαβούσε φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα μεταξύ των ιδίων και του διηθητικού μετώπου (εικόνα 3).

Η παρουσία των aTLS και dTLS αξιολογήθηκε σε κάθε ιστολογικό πλακίδιο. Στη συνέχεια οι όγκοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση την ποσοτική παρουσία των aTLS (στερούμενα TLS, χαμηλή ή μέτρια 1 έως 4 TLS, υψηλή ≥ 5 TLS). Η εφαρμογή εν σειρά τόμενων από κύβο παραφίνης επέτρεψε την αξιολόγηση των CD4, CD8, FOXP3 και CD163 κυττάρων εντός καθενός TLS ξεχωριστά σε 118 από τους 167 ασθενείς της παρούσας μελέτης (σε όσους ήταν



Εικόνα 3: Η παρουσία των aTLS και dTLS σε σχέση με το διηθητικό μέτωπο του όγκου (CD3 X40).

εφικτό να γίνουν ή ήδη υπήρχαν και οι 4 ανοσοϊστοχημικές χρώσεις). Η ανοσοϊστοχημική αξιολόγηση ανέδειξε διακυμάνσεις στις κυτταρικές συγκεντρώσεις των CD4+, CD8+, FOXP3+ και CD163+ κυττάρων εντός των TLS σε κάθε όγκο. Αυτό επέτρεψε το διαχωρισμό των νεοπλασμάτων ανάλογα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων που εξέφραζαν κάθε αντίσωμα. Η κατηγοριοποίηση αυτή έγινε σε 4 ομάδες πολύ χαμηλή, χαμηλή, μέτρια, υψηλή με ποσοστά θετικότητας να κυμαίνονται από 0-10%, 10-20%, 20-30%, >30% αντίστοιχα. Σε κάθε όγκο καταγράφηκε μια μέση τιμή των aTLS και των dTLS για καθένα από τα εξετασθέντα αντισώματα.

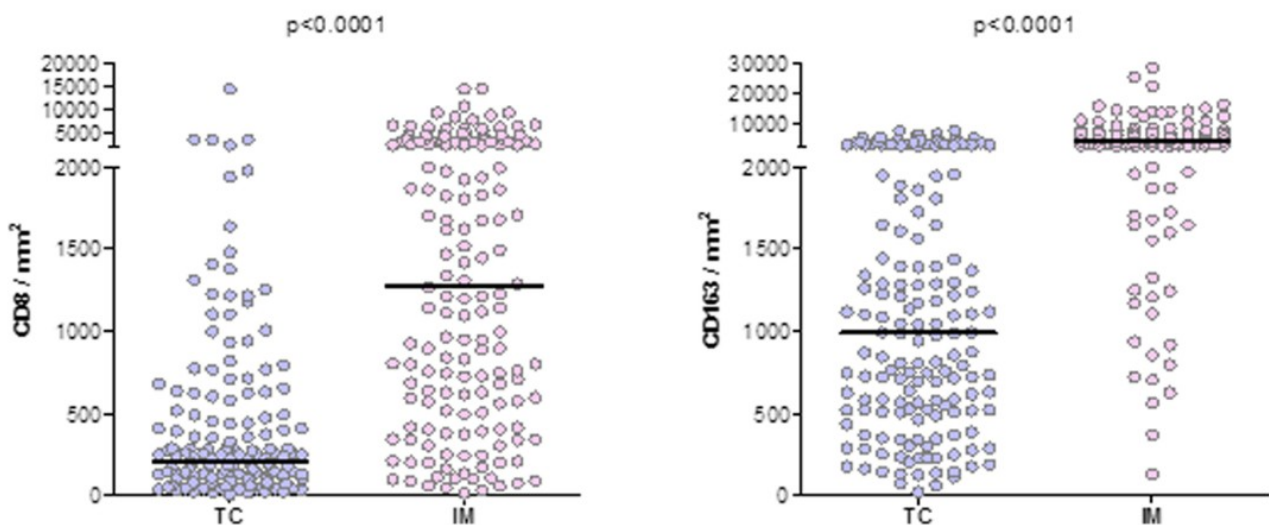
Στατιστική ανάλυση

Για τη δημιουργία των πινάκων συνάφειας και επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 7,01 του Prism Graph Pad. Όλα τα στατιστικά τεστ συνάφειας (χ^2 , Fisher's exact test) πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον αριθμό των ασθενών και όχι τα ποσοστά τους, παρ' ότι τα αντίστοιχα γραφήματα παρουσιάζουν ποσοστά. Συνεπώς οι τιμές p αναφέρονται στους αριθμούς των εξετασθέντων ασθενών σε κάθε περίπτωση. Τα μη παραμετρικά τεστ (Mann-Whitney και Kruskal-Wallis) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση συνεχών ποσοτικών μεταβλητών. Για την ανάλυση επιβίωσης υπολογίστηκαν log-rank p και Gehan-Breslow p. Οι τιμές $p \leq 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές αναλύσεις επιβίωσης (Cox Regression) πραγματοποιήθηκαν με την έκδοση 24 του IBM SPSS τόσο για το ελεύθερο νόσου όσο και τη συνολική επιβίωση. Για τις πολυπαραγοντικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προοδευτικής προσθήκης μεταβλητών (forward stepwise) με όριο για την εισαγωγή των σημαντικών μεταβλητών το 0,05. Για τη δημιουργία των γραφημάτων DFS και OS που παραθέτονται στο παράτημα «συμπληρωματικές μετρήσεις» χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 1.1.5.0 του λογισμικού jamovi (<https://www.jamovi.org/>).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αξιολόγηση CD8+ CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου και η συσχέτισή τους με τους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και την κλινική πορεία της νόσου

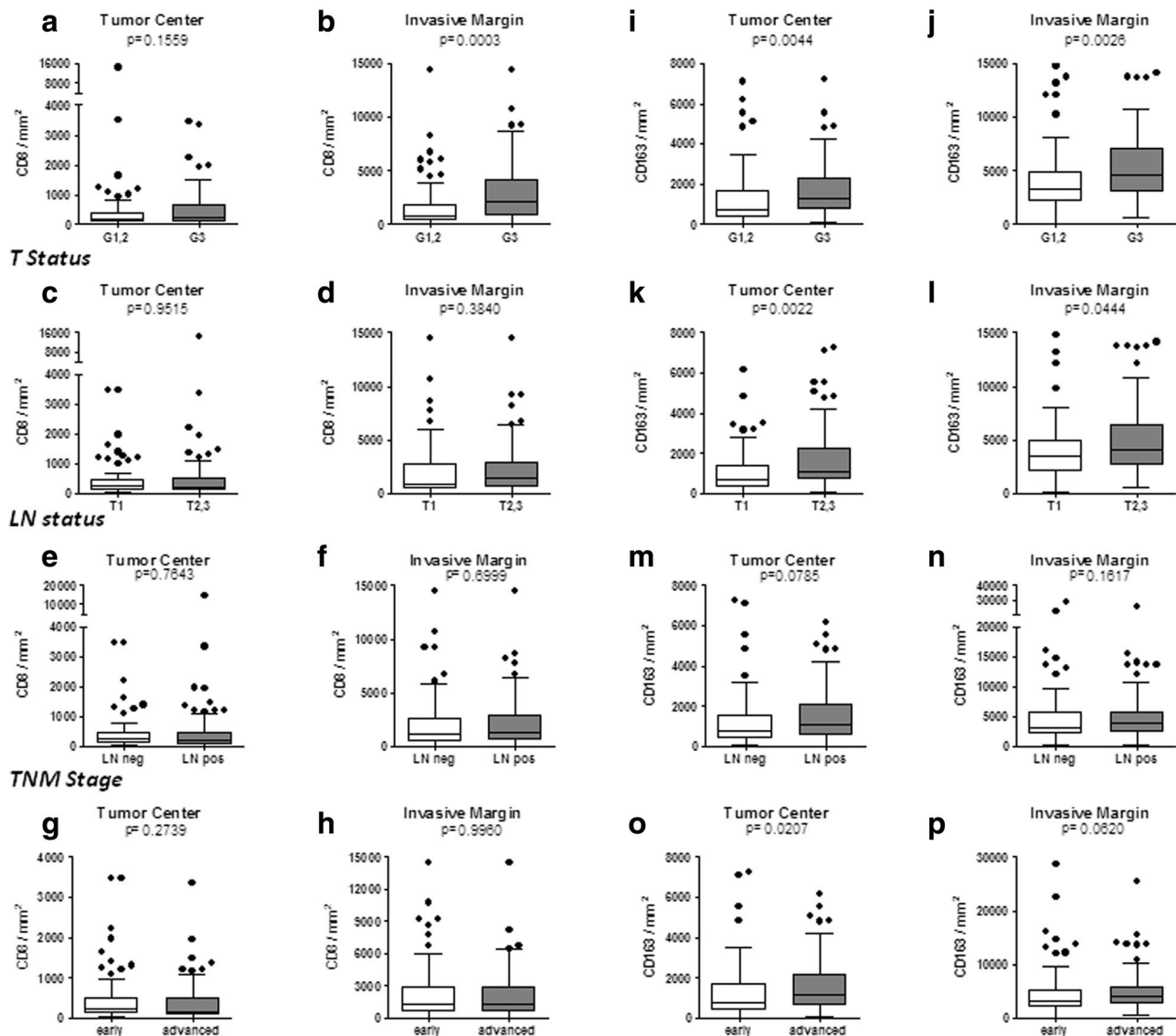
Αρχικά έγινε καταμέτρηση των CD8+ και CD163+ κυττάρων στο κέντρο και την περιφέρεια του όγκου στην οποία και παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την κατανομή, σε απόλυτους αριθμούς, ανάμεσα σε αυτά τα διαμερίσματα του όγκου. Σε μέσες τιμές το διηθητικό μέτωπο των νεοπλασμάτων περιείχε περισσότερα κύτταρα από αμφοτέρους τους καταμετρώμενους τύπους κυττάρων. Αυτό ήταν εμφανές για το σύνολο των εξεταζόμενων ασθενών (εικόνα 1) άλλα και για υποομάδες αυτών στρωματοποιημένες ανά grade, μέγεθος -T (εικόνες 2a, b, i, j), λεμφαδενική διασπορά -N (εικόνες 2c, d, k, l) και στάδιο -TNM (εικόνες 2g, h, o, p). Καταμετρήθηκαν και αξιολογήθηκαν επίσης πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στον



Εικόνα 1: CD8+ και CD163+ πυκνότητες ανά mm² στο TC και το IM. Οι οριζόντιες γραμμές αντιστοιχούν στις μέσες τιμές.

αριθμό των CD8+ και CD163+ κυττάρων στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου με το grade, μέγεθος όγκου, λεμφαδενική διασπορά (N) και στάδιο TNM. Η επικράτηση των CD8+ TILs ήταν εμφανέστερη στα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα (grade 3) έναντι των μέτριας και υψηλής (grade 1, 2), τόσο στο κέντρο του όγκου (παρατηρείται στατιστική τάση) όσο και στο διηθητικό μέτωπό του (στατιστικά σημαντικό - εικόνες 2a, b). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα σε διήθηση του νεοπλάσματος από CD8+ και μέγεθος, λεμφαδενική κατάσταση ή στάδιο όγκου (εικόνα 2 c-h). Ο αριθμός των ενδονεοπλασματικών CD163+ κυττάρων στο κέντρο και την περιφέρεια του όγκου ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς με χαμηλής διαφοροποίησης όγκους (grade 3 - εικόνες 2i, j), με T2, T3 νεοπλάσματα (εικόνες 2k, l) ή με N+ λεμφαδένες (εικόνες 2m, n) ως και σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο (στάδια IIB, III - εικόνες 2o, p). Αυτά τα δεδομένα συσχετίζουν την αυξημένη παρουσία των M2 μακροφάγων (CD163+) με δυσμενή πρόγνωση.

Grade

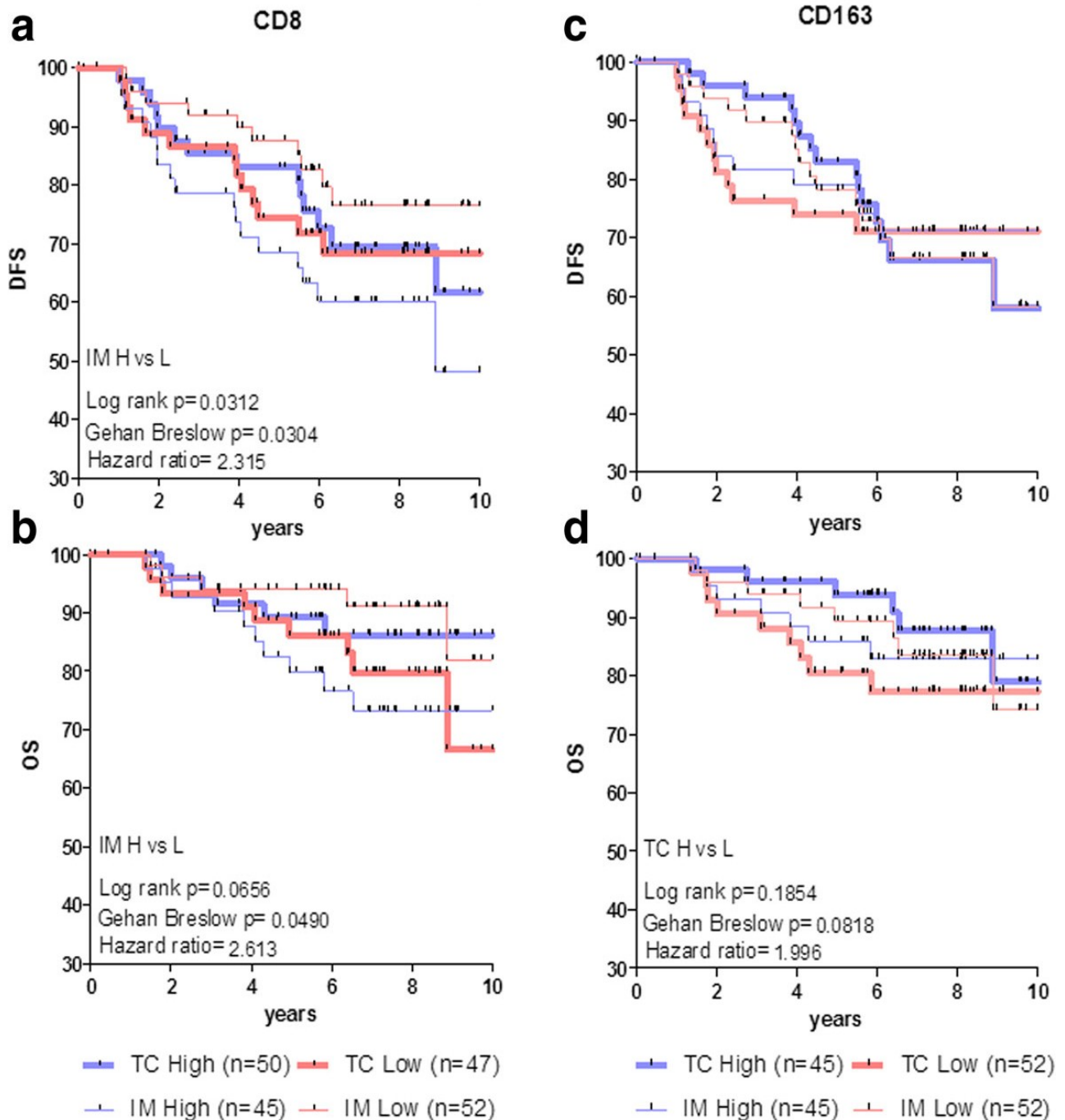


Εικόνα 2: Διαγράμματα Whisker για τις πυκνότητες των CD8+ (a, c, e, g), CD163+ (i, k, m, o) κυτταρικών πυκνοτήτων στο TC και CD8+ (b, d, f, h) και CD163+ (j, l, n, p) στο IM σε σχέση με κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες: Grade (a, b, i, j), μέγεθος όγκου T (c, d, k, l), λεμφαδενική επέκταση N (e, f, m, n) και TNM στάδιο (g, h, o, p). early=I, IIA advanced=IIB, IIA, IIC

Εξετάστηκε επίσης η σχέση ανάμεσα σε CD8+ CD163+ κυτταρικές πυκνότητες ξεχωριστά για το κέντρο του όγκου και το διηθητικό μέτωπο με την κλινική πορεία του κάθε ασθενή χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή για το διαχωρισμό ανάμεσα σε χαμηλή (L-Low) και υψηλή τιμή (H-High). Αναδρομικές αναλύσεις στους ασθενείς με follow-up (n=97) ανάδειξαν ότι οι νεοπλασματικοί όγκοι των ασθενών που απόλαυσαν το μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερου νόσου (DFS) παρουσίασαν σαφώς μικρότερες πυκνότητες CD8+ λεμφοκυττάρων κατά το διηθητικό μέτωπο (CD8+ IM L) από αυτούς που υποτροπίασαν συντομότερα (μικρότερο DFS - εικόνα 3a). Οι τελευταίοι παρουσίασαν υψηλές συγκεντρώσεις CD8+ στο ίδιο νεοπλασματικό διαμέρισμα (CD8+ IM H). Σε αντίθεση με αυτό δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο DFS σε ασθενείς με υψηλές ή χαμηλές συγκεντρώσεις CD8+ λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου (εικόνα 3a). Αυξημένη συνολική επιβίωση παρουσίασαν οι ασθενείς με όγκους CD8+ IM L έναντι αυτών με CD8+ IM, γεγονός που αναδείχθηκε και στατιστικά σημαντικό (εικόνα 3b). Οι πυκνότητες των CD163+ (M2 μακροφάγων) σε αμφότερα τα εξεταζόμενα διαμερίσματα του όγκου

(IM και TC) δεν επέτρεψαν στη στρωματοποίηση των ασθενών σε ομάδες με στατιστικά διαφορετικό διάστημα ελεύθερου νόσου ή συνολικής επιβίωσης (εικόνα 3c) οι OS (εικόνα 3d).

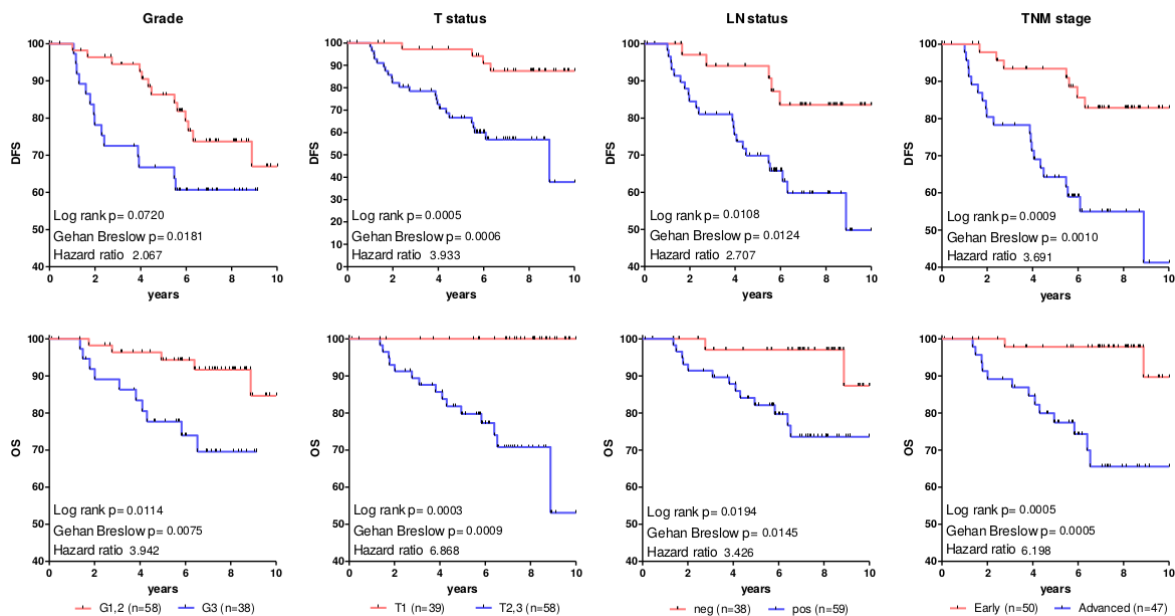
Μελετήθηκε ακόμα η συσχέτιση των CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων με DFS και OS σε υποομάδες ασθενών στρωματοποιημένες από διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές μεταβλητές (εικόνα 4).



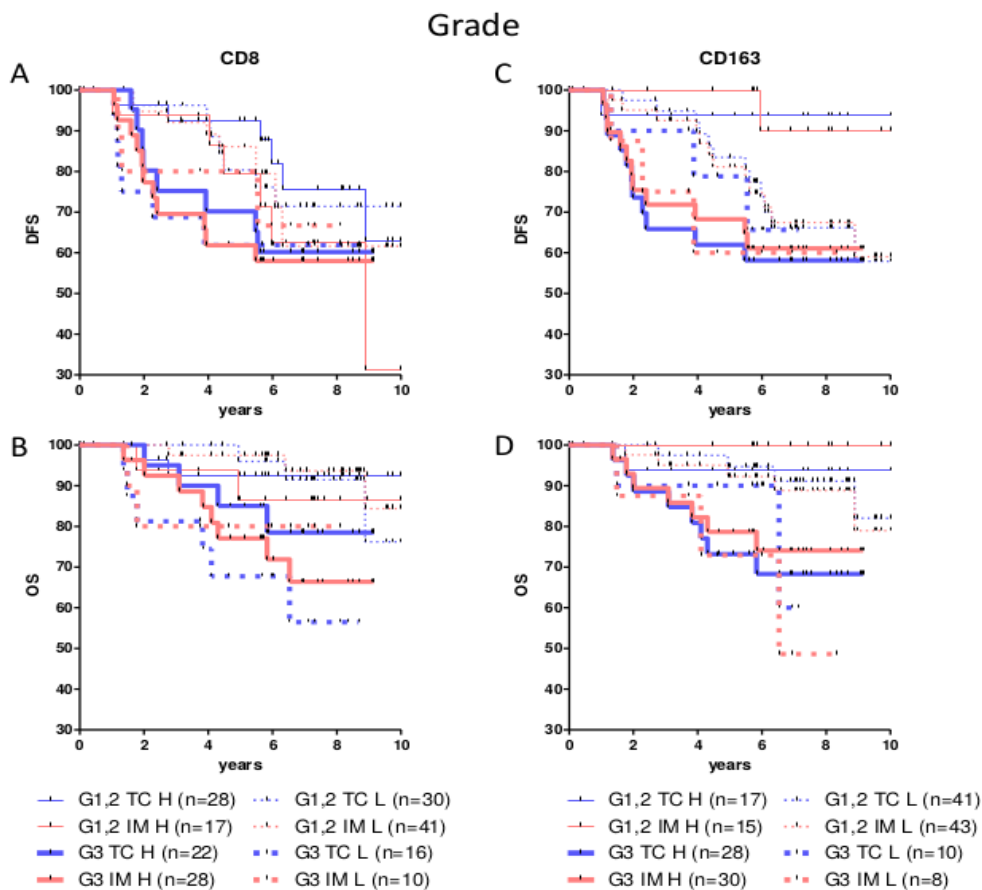
Εικόνα 3: Καμπύλες Kaplan-Meier όπου απεικονίζουν DFS (a,c) και OS (b,d) για τους ασθενείς που αναλυθήκαν σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα (H-High, L-Low) των CD8+ (a,b) και CD163+(c,d) στο TC ή το IM. Καταγράφονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές, οι τάσεις και τα Hazard ratios.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις εξεταζόμενες υποομάδες φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά απ' ό,τι με τις κυτταρικές πυκνότητες CD8+ και CD163+, ανεξαρτήτως κυτταρικού διαμερίσματος όταν αυτές εξεταστούν μεμονωμένα (εικόνες 5-8). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ξεχωριστές

αναλύσεις των πυκνοτήτων CD8+ και CD163+ σε μεμονωμένα κυτταρικά διαμερίσματα δεν είναι χρήσιμοι προγνωστικοί βιοδείκτες για την επιβίωση του όγκου ή το διάστημα ελεύθερου νόσου.

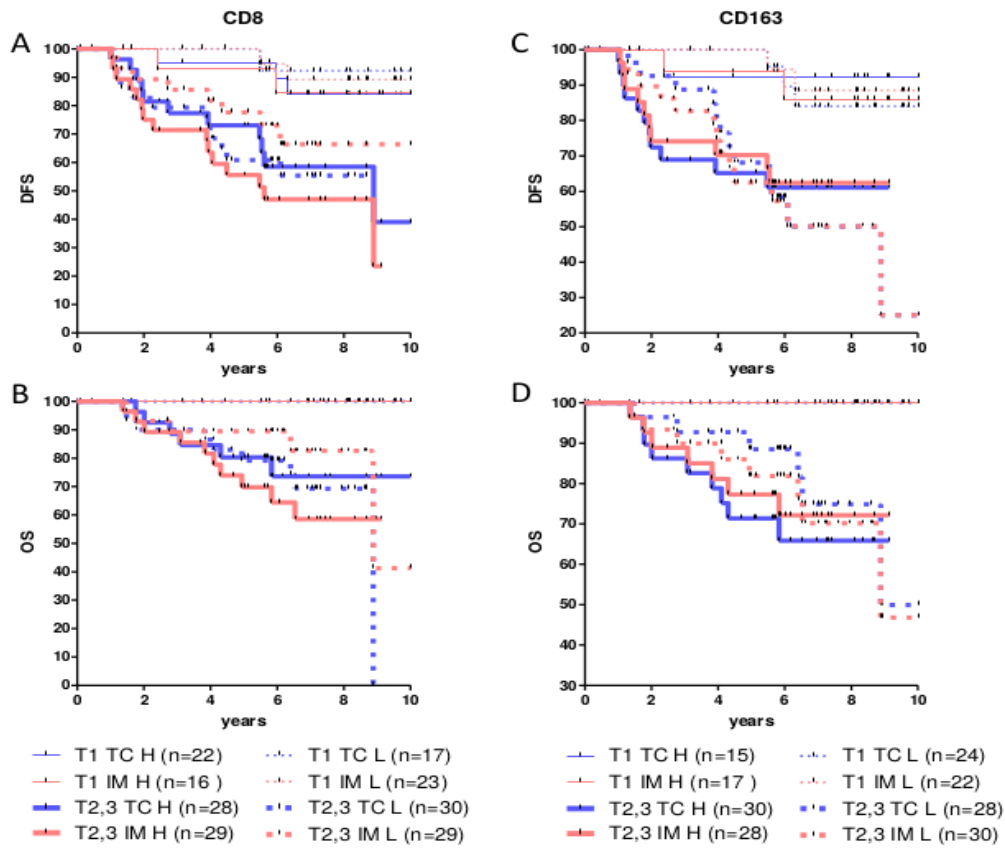


Εικόνα 4: DFS και OS των ασθενών ανάλογα με τους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες των όγκων τους.



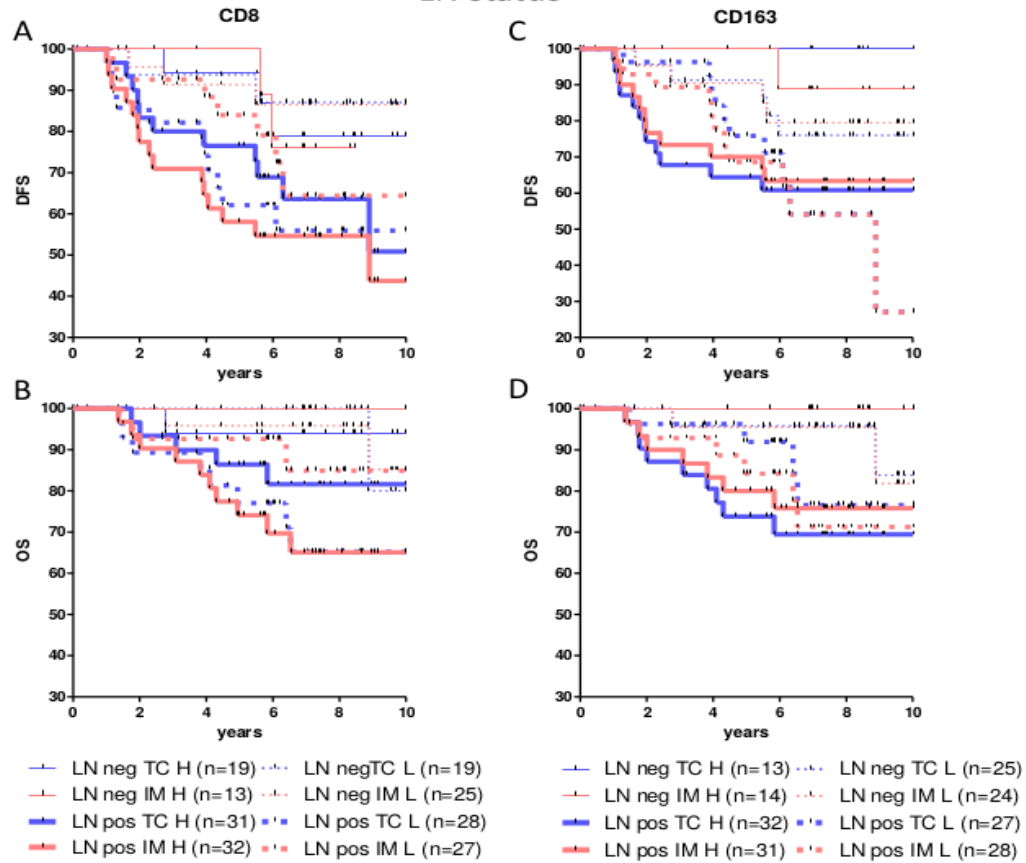
Εικόνα 5: DFS και OS στρωματοποιημένα ανά grade νεοπλασματος αναλυμένα σε σχέση με τις κυτταρικές πυκνότητες CD8+ και CD163+.

T status

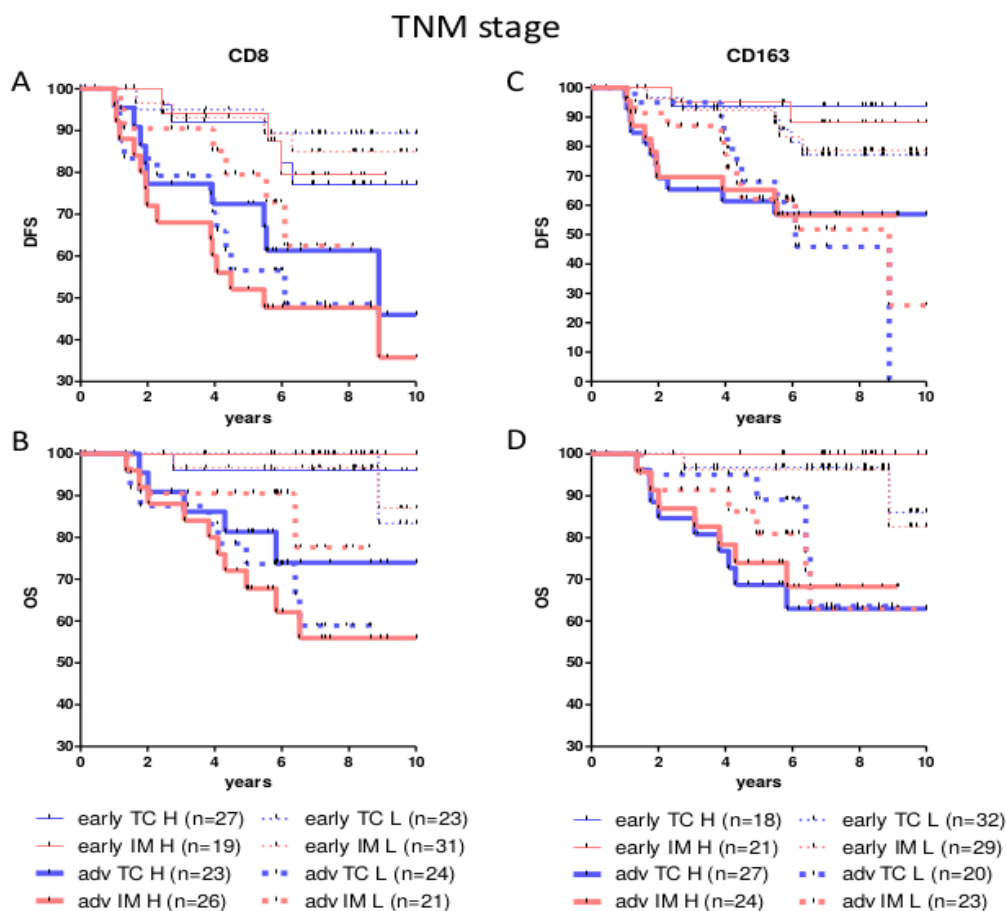


Εικόνα 6: DFS και OS στρωματοποιημένα ανά μέγεθος όγκου (T), αναλυμένα σε σχέση με τις κυτταρικές πυκνότητες CD8+ και CD163+.

LN status



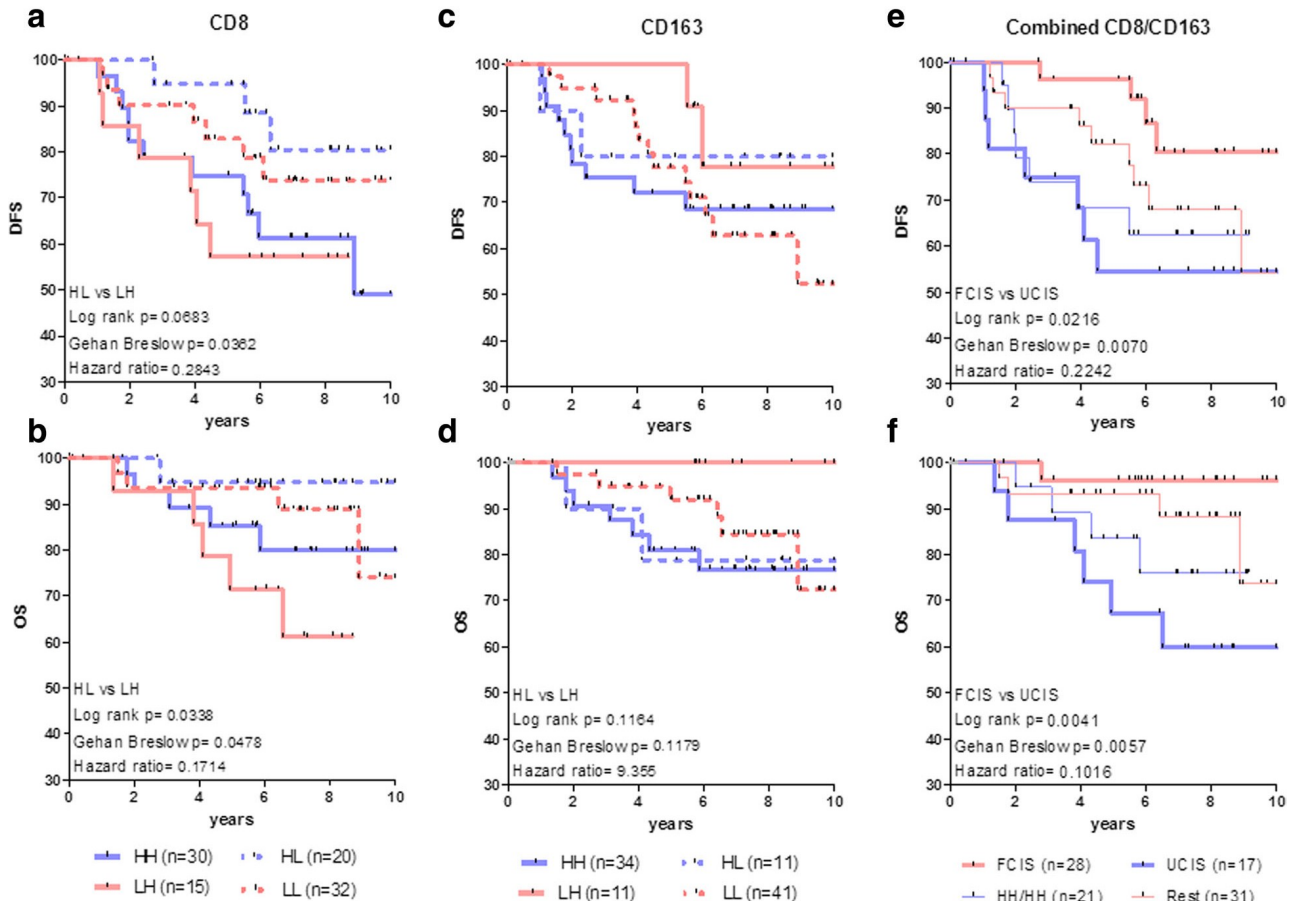
Εικόνα 7: DFS και OS στρωματοποιημένα σχετικά με τη λεμφαδενική διασπορά του νεοπλάσματος (T), αναλυμένα σε σχέση με τις κυτταρικές πυκνότητες CD8+ και CD163+.



Εικόνα 8: DFS και OS στρωματοποιημένα ανά στάδιο TNM, αναλυμένα σε σχέση με τις κυτταρικές πυκνότητες CD8+ και CD163+.

Αξιολόγηση CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου

Σε προηγούμενες μελέτες {Galon J, et al}{Pages F, et al} έχει αναδειχθεί η χρησιμότητα ενός ανοσολογικού score που θα βασίζεται στη συνδυαστική αξιολόγηση των TILs από το κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου, με σκοπό την πιο εύστοχη πρόβλεψη υποτροπής των όγκων και συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου πρώιμου σταδίου. Με βάση αυτή την ιδέα διερευνήθηκε εάν η ανάλυση των CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο συνδυαστικά, δύνανται να βελτιώσουν την πρόγνωση όσον αφορά το ρίσκο υποτροπής και τη συνολική επιβίωση στον, καρκίνο του μαστού. Όσον αφορά την επί τούτου ανάλυση των CD8+ κυτταρικών πυκνοτήτων προκύπτει ότι οι νεοπλασματικοί όγκοι που παρουσίασαν υψηλές πυκνότητες CD8+ στο κέντρο του όγκου και χαμηλές στο διηθητικό μέτωπο αυτού (CD8+ HL) είχαν καλύτερη πρόγνωση (εικόνες 9a, 9b) έναντι εκείνων που παρουσίασαν τον αντίστροφο συνδυασμό (CD8+ LH). Αντίθετα, χαμηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις από CD163+ στο κέντρο του όγκου συνδυασμένες με υψηλές συγκεντρώσεις CD163+ κατά το διηθητικό μέτωπο (CD163+ LH) παρουσίασαν ευνοϊκότερη πρόγνωση έναντι του αντίστροφου συνδυασμού (CD163+ HL) σε DFS αλλά και OS (εικόνες 9c, 9d).



Εικόνα 9: (a-d) Οι καμπύλες Kaplan-Meier απεικονίζουν DFS και OS για όλους τους ασθενείς σε σχέση με τη κυτταρική πυκνότητα CD8+ και CD163+ στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου. (e-f) αναδεικνύουν DFS και OS για όσους ασθενείς αναλύθηκαν σε σχέση με τη συνδυασμένη πυκνότητα CD8+, CD163+ στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου (TC, IM). HH/HH υψηλές πυκνότητες CD8+ CD163+ σε TC και IM. "REST" LL/LL, HH/LL, LL/HH. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες και το HR αναγράφονται.

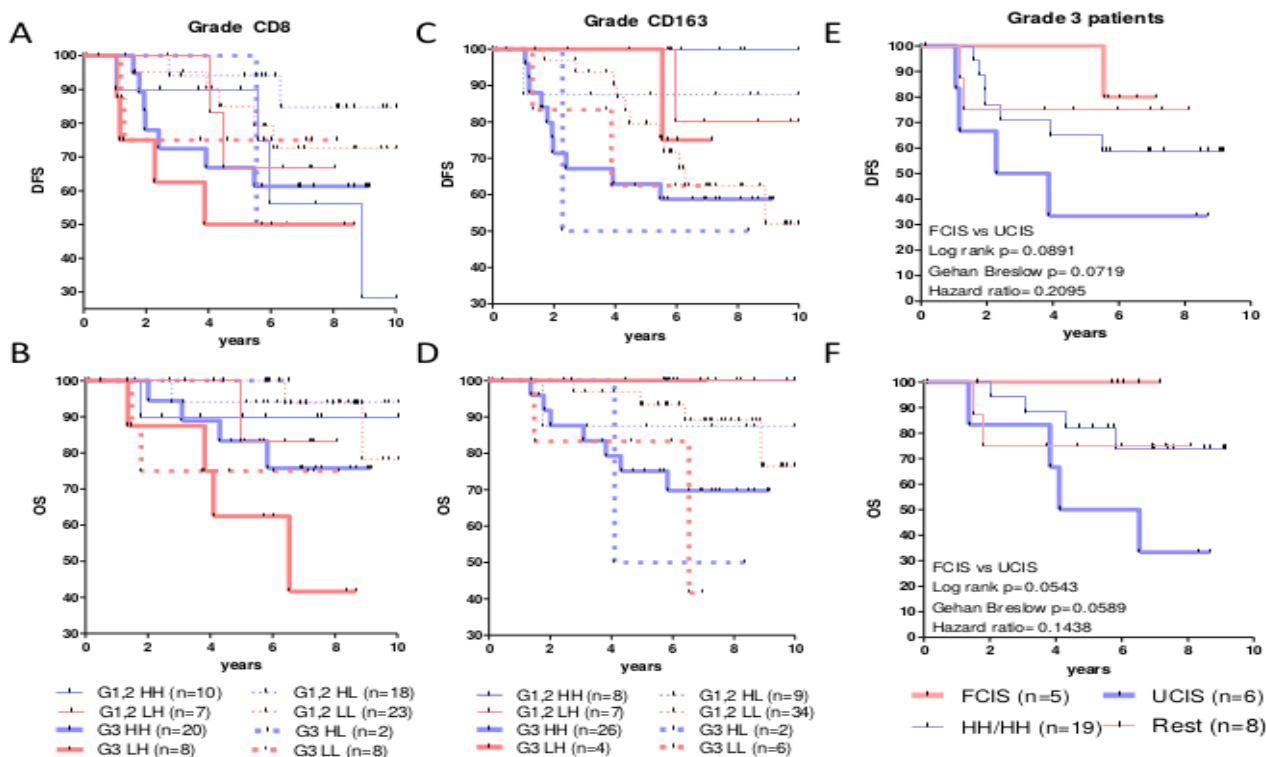
Συλλογική αξιολόγηση των CD8+ και CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου

Τα δεδομένα αναδεικνύουν πως η διαφορετική κατανομή των CD8+ και CD163+ κυττάρων στις συνδυασμένες περιοχές του όγκου έχει δυναμική προγνωστική αξία όσον αφορά το διάστημα ελεύθερο νόσου αλλά και τη συνολική επιβίωση. Με βάση αυτά τα δεδομένα αξιολογήθηκε εάν μια συλλογική αξιολόγηση των CD8+ και CD163+ πυκνοτήτων σε σχέση με τη διαμερισματική τους κατανομή (κέντρο και περιφέρεια όγκου) μπορεί να είναι πιο εύστοχη προγνωστικά όσον αφορά το DFS και το OS. Αυτές οι αναλύσεις συνέκριναν ασθενείς οι όγκοι των οποίων παρουσίασαν ευνοϊκές κατανομές κυτταρικών πυκνοτήτων CD8+ HL ή CD163+ LH ή και τις 2 μαζί (καθορίζοντας έτσι την ομάδα ασθενών με ευνοϊκή συνδυασμένη ανοσολογική υπογραφή – favourable combined immune signature – FCIS) με ασθενείς οι όγκοι των οποίων παρουσίασαν δυσμενείς CD8+ LH ή/και CD163+ HL κυτταρικές πυκνότητες (εξαιρουμένων όσων είχαν ταυτόχρονη έκφραση CD163+ LH ή CD8+ HL). Οι ασθενείς αυτοί καθορίζουν την ομάδα με δυσμενή συνδυασμένη ανοσολογική υπογραφή (unfavorable combined immune signature - UCIS). Αυτή η σύγκριση ανέδειξε σημαντικές διαφορές όσον αφορά το DFS και το OS ανάμεσα σε ασθενείς με ανοσολογική υπογραφή FCIS και εκείνους με UCIS. Σε βάθος 5ετίας οι ασθενείς με FCIS παρουσίασαν καλύτερο διάστημα ελεύθερου νόσου και συνολική επιβίωση (96,3% και στα

δύο) έναντι των ασθενών με 54,5% DFS και 67,3% OS (εικόνες 9e, f). Επίσης σε αυτού του τύπου την ανάλυση παρατηρήθηκε ότι η ομογενοποιημένη κατανομή κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο και την περιφέρεια του όγκου (συνδυασμένα CD8+/CD163+ HH/HH, LL/LL, HH/LL και LL/HH) δεν μπόρεσε να διαχωρίσει τα νεοπλάσματα ως προς DFS και OS (εικόνες 4e, f). Οι ασθενείς που παρουσίασαν αυτές τις ανοσολογικές υπογραφές εντάσσονται στην ομάδα λοιποί - “REST”.

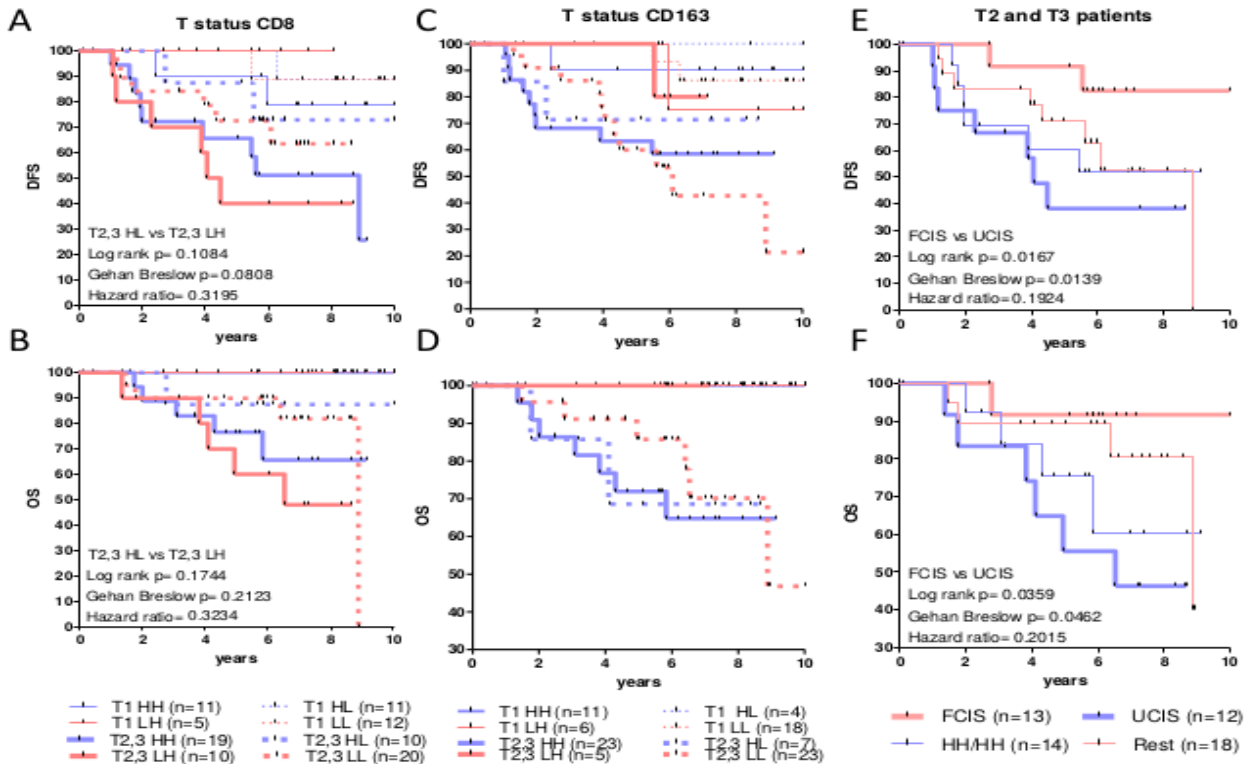
CD8+ και CD163+ ενδονεοπλασματικές πυκνότητες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και η συσχέτισή τους με κλινική πορεία της νόσου στρωματοποιημένες από κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες

Υποθέτοντας ότι οι διαφορετικές πυκνότητες των CD8+ και CD163+ κυττάρων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου αντιπροσωπεύουν διαφορετικά επίπεδα αντινεοπλασματικής/ογκοκατασταλτικής δραστηριότητας, ερευνήθηκε περαιτέρω εάν η ευνοϊκή ανοσολογική υπογραφή έχει προγνωστική αξία και σε υποομάδες ασθενών που παρουσίασαν υψηλό ή χαμηλό ρίσκο υποτροπής ανάλογα με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων τους. Γι’ αυτό και αξιολογήθηκε η προγνωστική αξία των ευνοϊκών CD8+ HL και CD163+

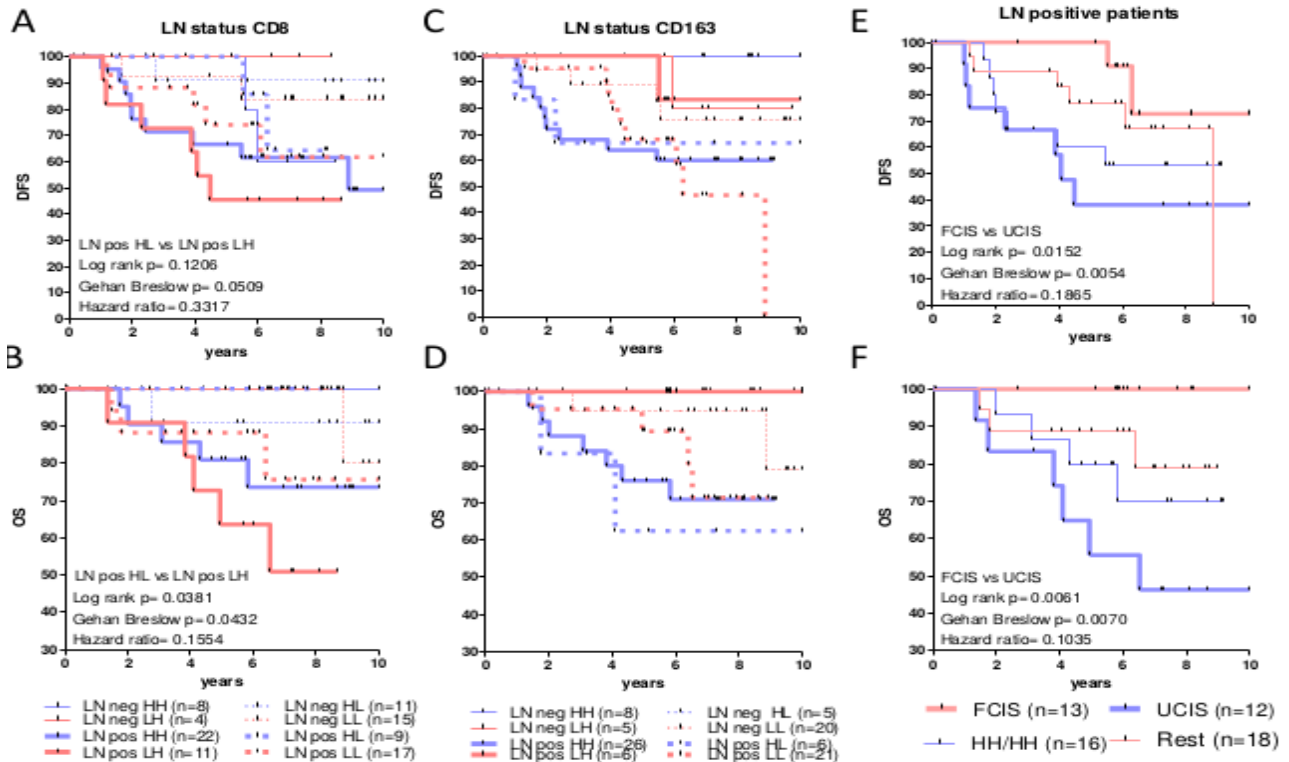


Εικόνα 10: Γραφήματα Kaplan-Meier που παρουσιάζουν το DFS και το OS στρωματοποιημένα κατά grade και αναλυμένα σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα CD8+ (A, B) ή CD163+ (C, D) στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου ή στις συνδυασμένες ανοσολογικές υπογραφές (E, F).

LH ανοσολογικών υπογραφών στρωματοποιημένη από το νεοπλασματικό grade (εικόνες 10A-D), το μέγεθος του όγκου -T (εικόνες 11A-D), τη λεμφαδενική επέκταση -N (εικόνες 12A-D) και το συνολικό στάδιο TNM (εικόνες 13 A-D).

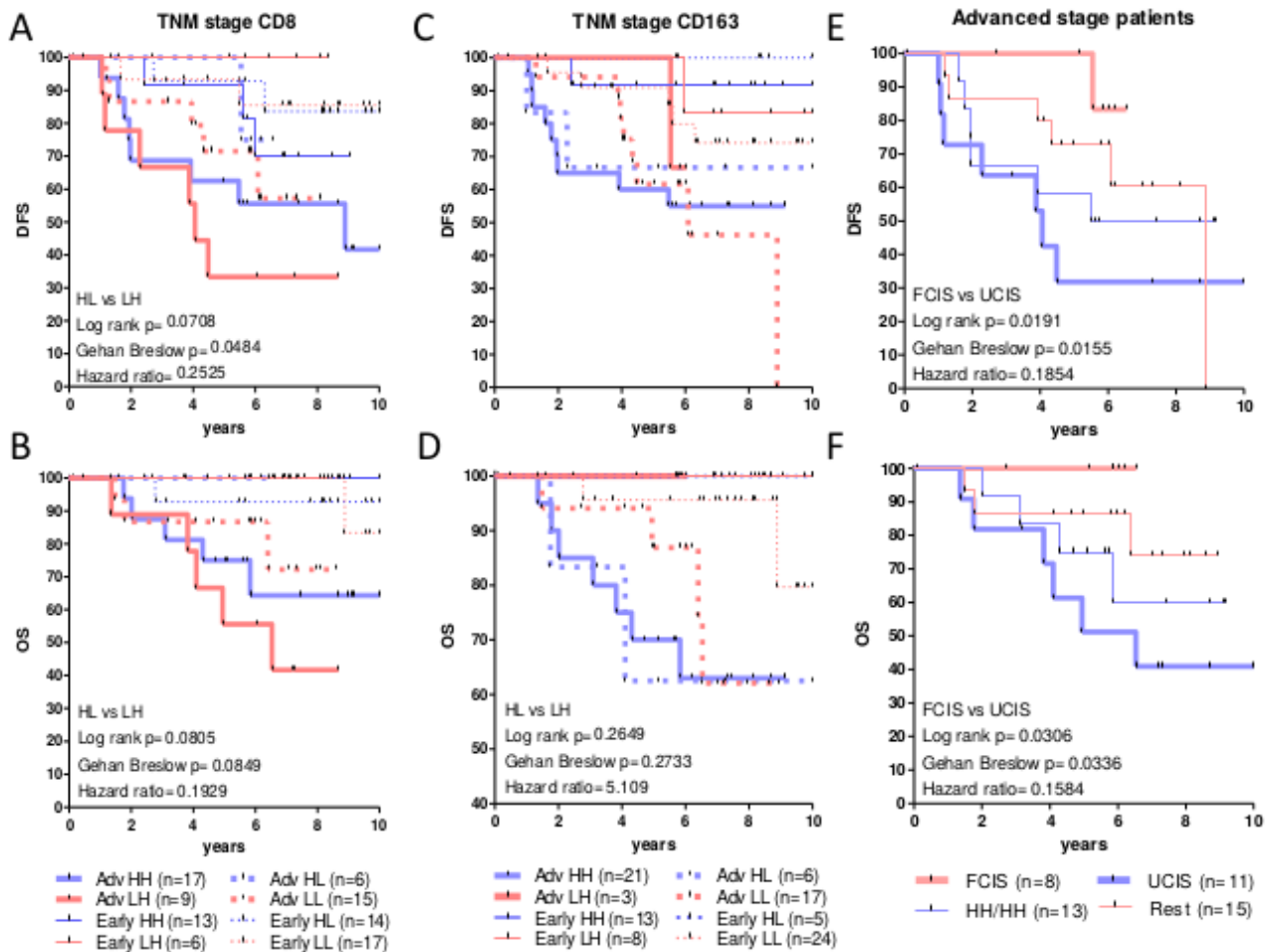


Εικόνα 11: Γραφήματα Kaplan-Meier που παρουσιάζουν το DFS και το OS στρωματοποιημένα κατά T και αναλυμένα σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα CD8+ (A, B) ή CD163+ (C, D) στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου ή στις συνδυασμένες ανοσολογικές υπογραφές (E, F).



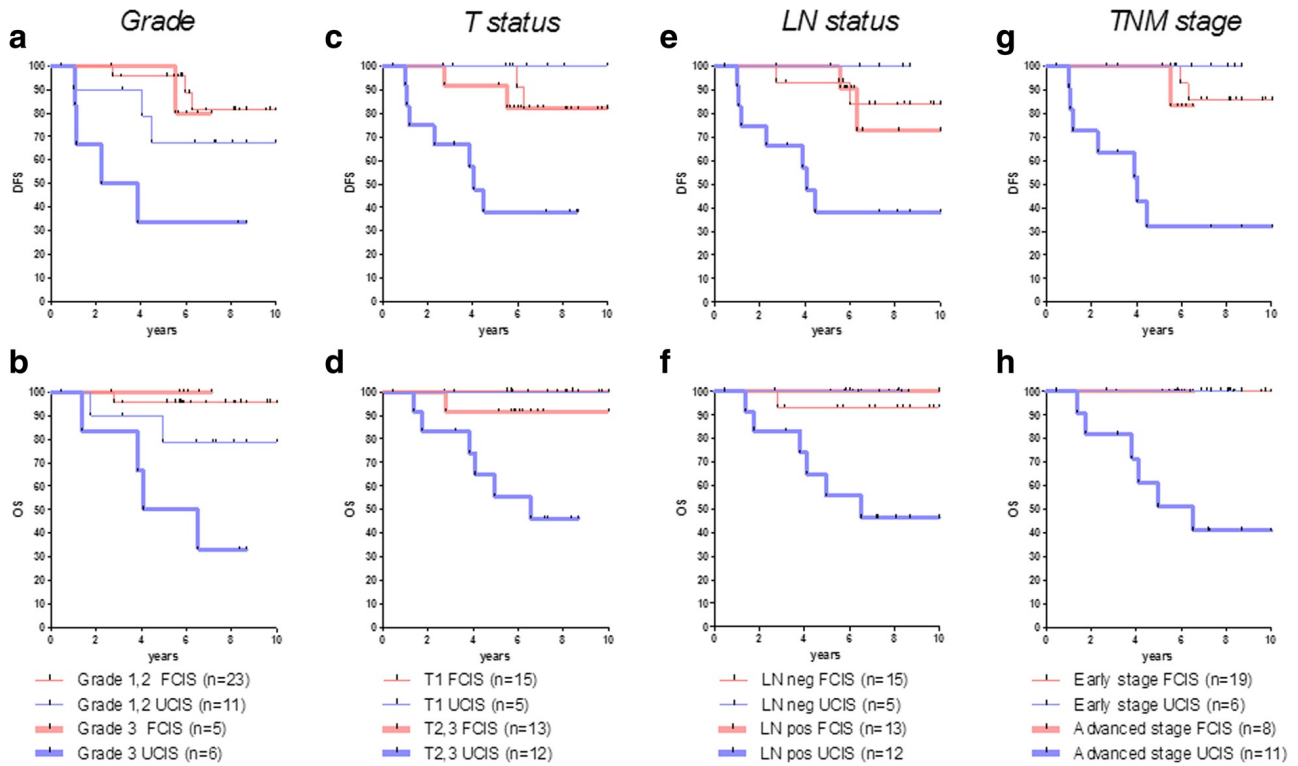
Εικόνα 12: Γραφήματα Kaplan-Meier που παρουσιάζουν το DFS και το OS στρωματοποιημένα κατά N και αναλυμένα σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα CD8+ (A, B) ή CD163+ (C, D) στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου ή στις συνδυασμένες ανοσολογικές υπογραφές (E, F).

Τα αποτελέσματα αναδειχθήκαν όμοια με ό,τι είχε παρατηρηθεί και στο γενικό πληθυσμό· σε όλες τις στρωματοποιημένες ομάδες ασθενών εκείνοι με CD8+ HL και CD163+ LH υπογραφή εμφάνισαν καλύτερο DFS και OS.



Εικόνα 13: Γραφήματα Kaplan-Meier που παρουσιάζουν το DFS και το OS στρωματοποιημένα κατά TNM και αναλυμένα σε σχέση με την κυτταρική πυκνότητα CD8+ (A, B) ή CD163+ (C, D) στα συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου ή στις συνδυασμένες ανοσολογικές υπογραφές (E, F).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναδεικνύουν μια έντονη συσχέτιση ανάμεσα στις συνδυασμένες διαφορετικές πυκνότητες των CD8+ και CD163+ κυττάρων σε συνδυασμένα διαμερίσματα του όγκου (FCIS, UCIS) και την κλινική πορεία των ασθενών (εικόνα 9e, f). Έχοντας αυτό υπ' όψιν αξιολογήθηκε η προγνωστική αξία αυτών των ανοσολογικών υπογραφών (FCIS, UCIS) στους ίδιους ασθενείς σωματοποιημένους από τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων τους. Παρατηρήθηκε ότι η υπογραφή FCIS σχετιζόταν έντονα με ευνοϊκή πρόγνωση ανεξαρτήτως πτωχών κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (εικόνες 14a-h). Στον αντίποδα η υπογραφή UCIS πάντα σχετιζόταν με δυσμενή πρόγνωση στις ίδιες ομάδες ασθενών (εικόνες 14a-h και πίνακας 1). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η κλινική πορεία (DFS και OS) σε ασθενείς με υπογραφή όγκου FCIS και δυσμενείς κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες δεν ξεχωρίζει από εκείνη ασθενών με ευνοϊκούς χαρακτήρες (λ.χ. grade 3 έναντι 1,2· T2,3 έναντι T1· N+ έναντι N· προχωρημένο σε σχέση με πρώιμο στάδιο νόσου). Επιπλέον αναλύσεις εντός των υποομάδων των ασθενών με δυσμενείς κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά όγκων ανέδειξε πως η υποομάδα “REST” (LL/LL, LL/HH, HH/LL και HH/HH) ανοσολογικών υπογραφών δεν παρουσίασαν σημαντική προγνωστική αξία στην κλινική πορεία της νόσου (εικόνες 10e-f, 11e-f, 12e-f και 13e-f).



Εικόνα 14: Γραφήματα Kaplan-Meier που συγκρίνουν DFS και OS ασθενών με ευνοϊκές και δυσμενείς ανοσολογικές υπογραφές στρωματοποιημένα ως προς grade (a, b), T (c, d), N (e, f) και TNM (g, h).

Ομάδες προς σύγκριση	DFS				OS			
	HR	95%CI (HR)	Log rank p	Gehan Breslow p	HR	95%CI (HR)	Log rank p	Gehan Breslow p
Grade 3 FCIS με UCIS	0.2095	0.03457 έως 1.270	0.0891	0.0719	0.1438	0.01995 έως 1.036	0.0543	0.0589
FCIS Grade 3 με Grade 1,2	1.604	0.1247 έως 20.63	0.717	0.6238	0.2931	0.001887 έως 45.53	0.6336	0.6336
T2,3 status FCIS με UCIS	0.1924	0.04993 έως 0.7417	0.0167	0.0139	0.2015	0.04510 έως 0.9000	0.0359	0.0462
FCIS T2,3 με T1	1.684	0.2194 έως 12.92	0.6162	0.3775	9.488	0.1837 έως 490.0	0.2636	0.2636
LN pos FCIS με UCIS	0.1865	0.04807 έως 0.7233	0.0152	0.0054	0.1035	0.02048 έως 0.5231	0.0061	0.0070
FCIS LN pos με LN neg	1.375	0.1876 έως 10.08	0.754	0.9229	0.1653	0.003201 έως 8.537	0.3711	0.3711
Adv.stage FCIS με UCIS	0.1854	0.04531 έως 0.7587	0.0191	0.0155	0.1584	0.02981 έως 0.8417	0.0306	0.0336
FCIS Adv. stage με Early stage	3.369	0.1545 έως 73.43	0.4399	0.2995	0	0 έως 0	1	1

Πίνακας 1: Σύγκριση DFS και OS σε στρωματοποιημένες ομάδες ασθενών με ευνοϊκές και δυσμενείς υπογραφές.

Ανάστροφη σχέση ανάμεσα σε FCIS και κατάσταση νόσου

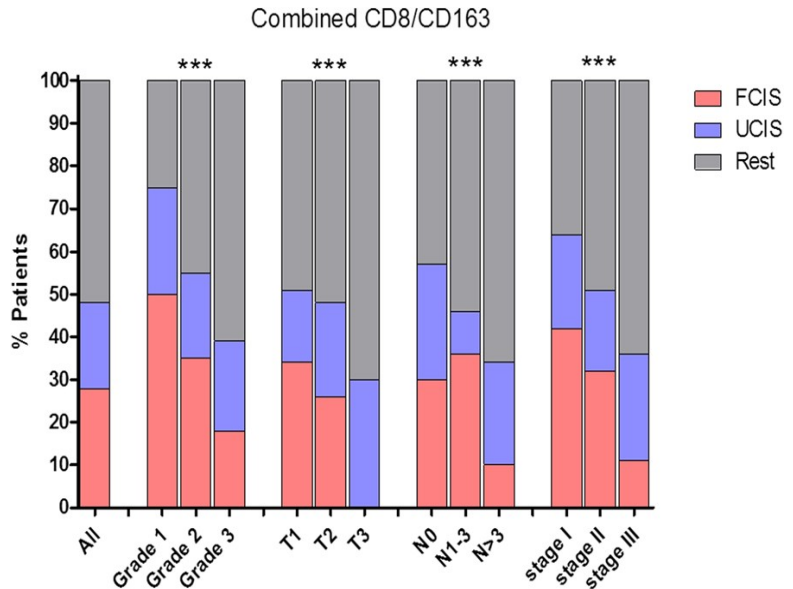
Για την περαιτέρω κατανόηση της σχέσης ανάμεσα στην τοπική ανοσολογική αντίδραση εκπροσωπούμενη από τις υπογραφές FCIS και UCIS και τις διάφορες παθολογοανατομικές παραμέτρους αναλύθηκαν τα ποσοστά των ασθενών οι όγκοι των οποίων εκφράζουν αυτές τις υπογραφές σε κάθε παθολογο-ανατομικό στάδιο. Σε αυτή την ανάλυση συμπεριλήφθηκαν όλοι οι ασθενείς (n=162).

Παρατηρήθηκε ανεστραμμένη

συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των ασθενών που εκφράζανε FCIS και το grade, μέγεθος (T), λεμφαδενική επέκταση (N) και TNM στάδιο του όγκου (εικόνα 15). Επιπρόσθετα υπήρξε σταδιακή μείωση του αριθμού FCIS - θετικών ασθενών όσο οι παθολογοανατομικοί χαρακτήρες των όγκων γίνονταν δυσμενέστεροι (grade 1 προς grade 3, T1 προς T3 κ.λπ. - εικόνα 15).

Πολυπαραγοντική ανάλυση του διαστήματος ελευθέρου νόσου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών σχετιζόμενα με κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και συνδυασμένη ανοσοϋπογραφή

Τα αποτελέσματα από την πολυπαραγοντική ανάλυση παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε συμπεριλαμβάνοντας αρχικά τους γνωστούς καθιερωμένους βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στον καρκίνο του μαστού (ηλικία, T, N, grade), την ενίσχυση HER2+, την κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων, και τις ανοσολογικές υπογραφές που προκύπτουν από αυτήν τη μελέτη. Το μέγεθος του όγκου και η κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων παρέμειναν ισχυρά συσχετισμένοι με DFS και OS (πίνακας 2). Το grade του όγκου και η ενίσχυση του HER2 σχετίζονταν μόνο με τη συνολική επιβίωση. Το γεγονός ότι το HER2 δεν σχετίστηκε με το DFS μπορεί να βρει εξήγηση από το ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών είχαν διαγνωστεί στο χρονικό διάστημα 2000-2006 στο οποίο το Trastuzumab δεν αποτελούσε καθιερωμένη επιλογή θεραπείας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά το μικρό μέγεθος του δείγματος οι ανοσολογικές υπογραφές σχετίζονταν σημαντικά με DFS και OS (p=0.041 και p=0.014 αντίστοιχα). Προς τη δημιουργία ενός νέου προγνωστικού μοντέλου αποκλείστηκαν οι λιγότερο σημαντικές συμμεταβλητές, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο προοδευτικής βηματικής επιλογής (forward stepwise selection). Ως αποτέλεσμα αυτού η έκταση του όγκου (T), η



Εικόνα 15: Ποσοστά στο σύνολο των ασθενών (n=162) σε ασθενείς ανά: ιστολογικό grade (G1·n=4, G2· n = 86, G3· n = 72), T (T1·n = 70, T2· n = 81, T3· n = 10), N (N0· n = 64, N1-2·n = 56, N3· n = 42) και stage (stage I· n = 45, stage II· n = 72, stage III· n = 45) ως προς την έκφραση FCIS, UCIS και "REST".

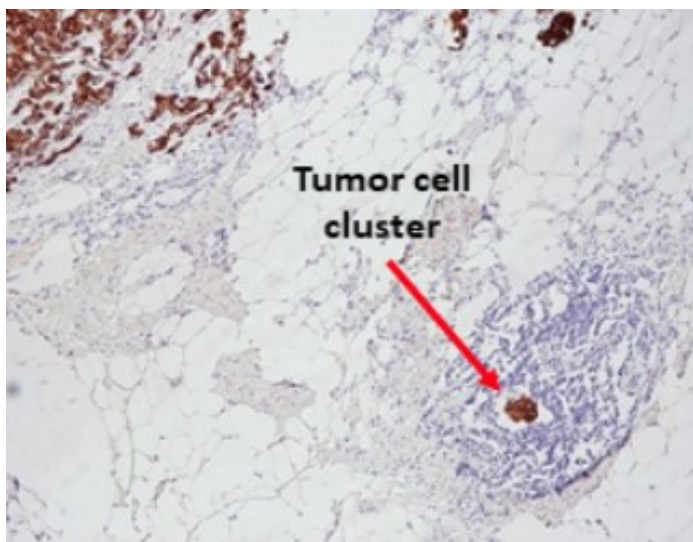
κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων και οι ανοσολογικές υπογραφές κρίθηκαν ως σημαντικότεροι παράμετροι για το διάστημα ελεύθερου νόσου και τη συνολική επιβίωση.

	DFS			OS		
	HR	p	95%CI (HR)	HR	p	95%CI (HR)
Στάδιο TNM	2.180	0.009	1.219–3.898	3.937	0.006	1.494–10.371
Ανοσ.Υπογραφή	1.560	0.138	0.866–2.810	2.085	0.091	0.889–4.890
Μοντέλο πριν τη βηματική επιλογή						
Ηλικία	1.031	0.948	0.411–2.589	4.391	0.188	0.486–39.703
Έκταση όγκου (T)	2.613	0.010	1.255–5.439	3.679	0.028	1.148–11.793
Λεμφ. Διασπορά (N)	1.222	0.512	0.671–2.225	1.125	0.815	0.420–3.010
Grade	1.142	0.750	0.504–2.585	4.189	0.027	1.180–14.867
HER2+	0.928	0.884	0.342–2.520	0.066	0.016	0.007–0.066
Ορμονικοί υποδοχείς	0.277	0.004	0.277–0.669	0.618	0.007	0.046–0.621
Ανοσ.Υπογραφή	2.063	0.041	1.031–4.126	4.850	0.014	1.374–17.122
Μοντέλο μετά τη βηματική επιλογή						
Έκταση όγκου (T)	2.999	0.001	1.602–5.615	3.522	0.005	1.477–8.398
Ορμονικοί υποδοχείς	0.269	0.002	0.116–0.621	0.231	0.014	0.072–0.742
Ανοσ.Υπογραφή	2.146	0.027	1.091–4.219	4.273	0.006	1.521–11.999

Πίνακας 2: Πολυπαραγοντική ανάλυση για DFS και OS.

Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των επαπτόμενων και απομακρυσμένων TLS και η συσχέτισή τους με κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες και την κλινική πορεία της νόσου

Τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των 167 ασθενών που αξιολογήθηκαν αναφέρονται περιληπτικά στον πίνακα 3. Καταμετρήθηκε ο αριθμός των περινεοπλασματικών aTLS και dTLS (εικόνα 3 - Υλικά και μέθοδοι) και ερευνήθηκε η σχέση τους με τους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες των ασθενών (εικόνες 17A και B). Άξια επισήμανσης είναι η παρουσία νεοπλασματικών βλαστών εντός κάποιων aTLS και dTLS (εικόνα 16) ως και το



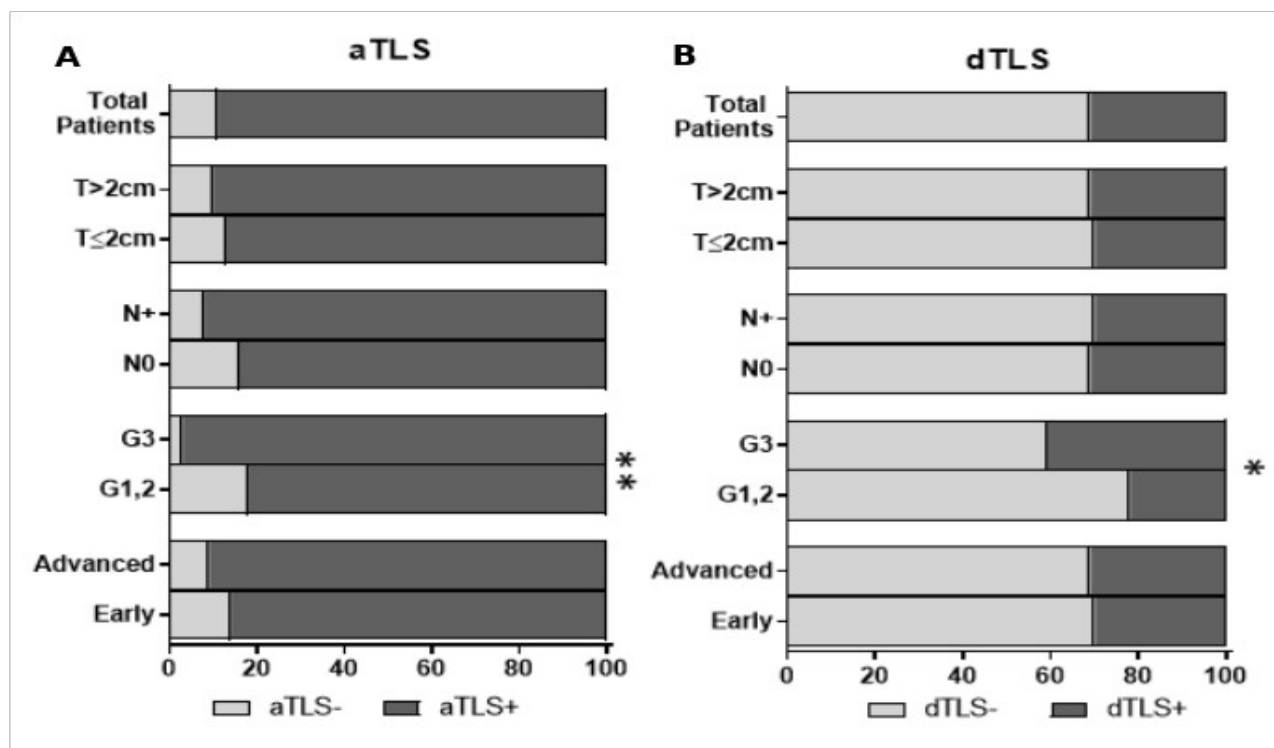
Εικόνα 16: Η παρουσία νεοπλασματικών βλαστών εντός των TLS αναδεικνύεται με την CK7 (X100).

γεγονός ότι η παρουσία των aTLS ανευρέθηκε στην πλειονότητα των ασθενών (εικόνα 17A).

Οι περισσότεροι ασθενείς στερούμενοι TLS ανευρέθηκαν ανάμεσα σε αυτούς με τους ευνοϊκότερους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες λ.χ. νεοπλάσματα χαμηλού νεοπλασματικού grade, χαμηλό TNM στάδιο, απουσία λεμφαδενικής επέκτασης νόσου και μικρό μέγεθος όγκου.

Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών					
Ηλικία (n=167)	Εύρος			Μέση τιμή	
	26-78			53	
Μέγεθος όγκου (T)	T0,Tx	T1	T2	T3	
	1 (0.6%)	69 (41%)	84 (50.4%)	13 (8%)	
Λεμφαδενική Επέκταση (N)	N0	N1	N2	N3	
	68 (41%)	59 (35%)	30 (18%)	10 (6%)	
AJCC σταδιοποίηση	Πρώιμο		Προχωρημένο		
	87 (52%)		80 (48%)		
	I	IIA	IIIB	IIIA	IIIC
	45 (27%)	42 (25%)	36 (21%)	33 (20%)	11 (7%)
Grade	G1	G2		G3	Gx
	4 (2%)	86 (51,4%)		76 (46%)	1 (0,6%)
Ορμονικοί υποδοχείς	Αρνητικοί		Θετικοί		
	36 (22%)		131 (78%)		
Ενίσχυση HER2	Χωρίς ενίσχυση		Με ενίσχυση		
	119 (71%)		48 (29%)		

Πινάκας 3: Σύνοψη των κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών.



Εικόνα 17: Ποσοστιαία σχηματική απόδοση των νεοπλασματικών όγκων με παρουσία (A) aTLS και (B) dTLS στρωματοποιημένη από κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Ωστόσο στατιστικά, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο για το νεοπλασματικό grade (εικόνα 17A). Η παρουσία των dTLS παρατηρήθηκε στη μειονότητα των ασθενών (εικόνα 17B). Σε αυτούς οι ασθενείς με νεοπλάσματα grade 3 είχαν στατιστικά περισσότερα dTLS από εκείνους με χαμηλότερο grade (εικόνα 17B).

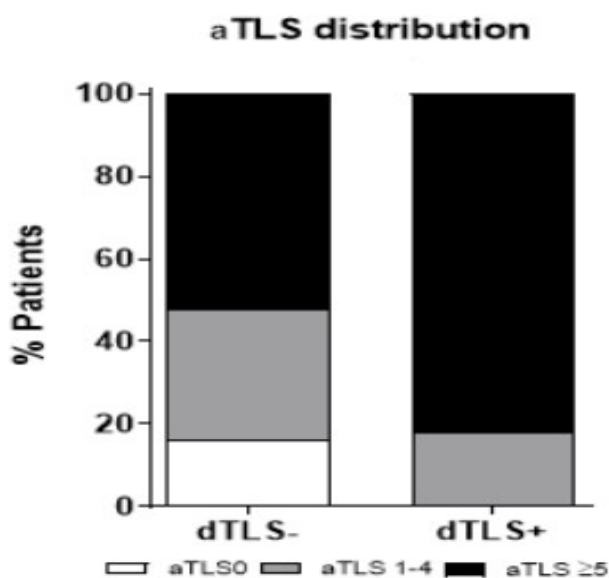
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε όλους τους ασθενείς με HER2+ μοριακό υπότυπο (είτε HER2+ ή LumB/Her2+) ανιχνεύτηκε η παρουσία aTLS, ενώ τα dTLS εντοπίζονταν

συχνότερα σε ασθενείς με μη προσαύλιους μοριακούς υποτύπους (είτε TNBC ή HER2+) όπως αναδεικνύεται και στον πίνακα 4.

Μοριακός υποτύπος	aTLS		dTLS	
	aTLS-	aTLS+	dTLS-	dTLS +
Προσαύλια A	9 (22%)	32 (78%)	33 (80.5%)	8 (19.5%)
Προσαύλια B	7 (13%)	48 (87%)	41 (74%)	14 (26%)
Προσαύλια B/HER2+	0 (0%)	32 (100%)	23 (72%)	9 (28%)
HER2+	0 (0%)	16 (100%)	8 (50%)	8 (50%)
TNBC	2 (10%)	18 (90%)	8 (40%)	12 (60%)
Αταξινόμητα	1 (33,3%)	2 (67,7%)	3 (100%)	0 (0%)

Πίνακας 4: Η παρουσία και κατανομή των TLS στρωματοποιημένη ανά μοριακό υπότυπο.

Μελετήθηκε η παρουσία των dTLS σε σχέση με τον αριθμό των aTLS. Όπως γίνεται εμφανές στην εικόνα 18 η συντριπτική πλειονότητα (95%) των dTLS+ όγκων εμπεριέχουν αυξημένο αριθμό aTLS (≥ 5), οι εναπομείναντες είχαν μικρό αριθμό aTLS (1-4), ενώ αξιοσημείωτο είναι ότι δεν ανευρέθηκε κανένας dTLS όγκος στερούμενος aTLS. Το τελευταίο εύρημα επιβεβαιώνεται εκ νέου και από το γεγονός πως όλοι οι ασθενείς άνευ παρουσίας aTLS στερούνται dTLS (εικόνα 18).

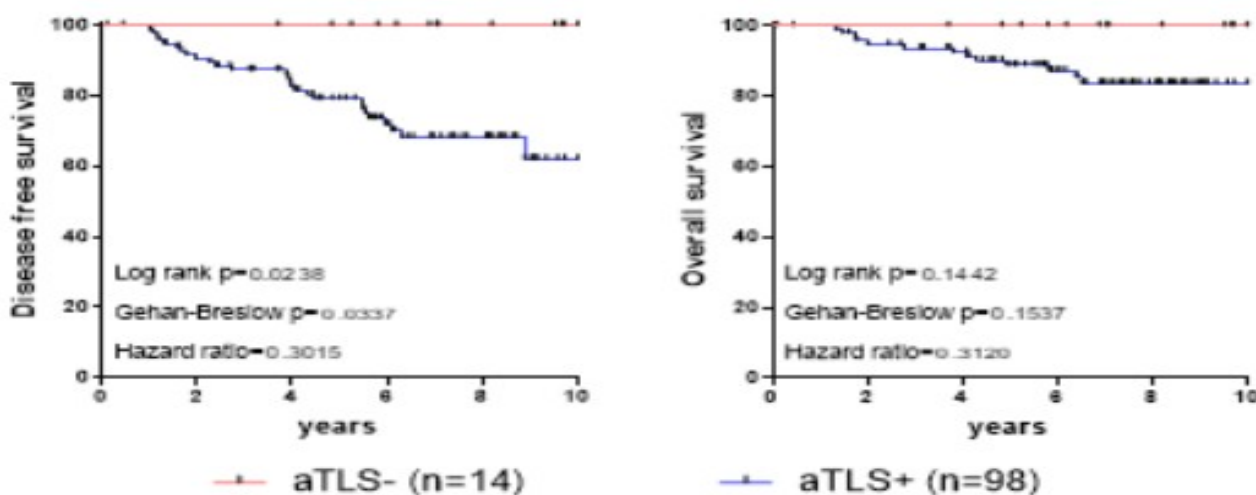


Εικόνα 18: Η παρουσία των aTLS ασθενών εντός της ομάδας ασθενών dTLS- και dTLS+ ($p < 0.0001$).

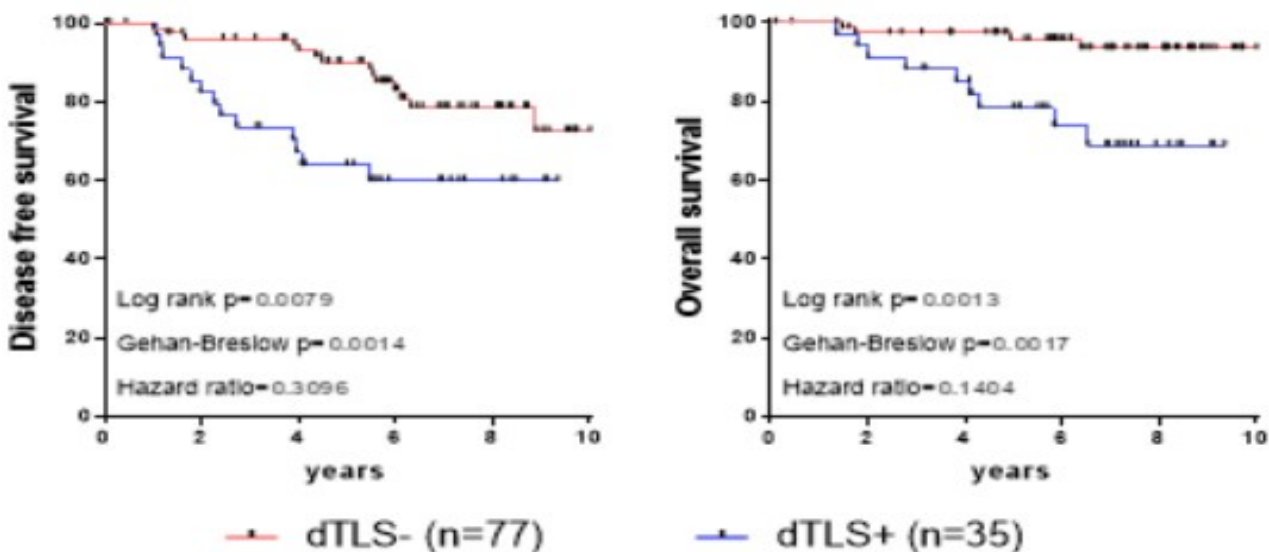
Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών (n=112) με follow-up	
Ηλικία	ΜΟ: 53 χρόνια
Στάδιο T	T1:46 (41,1 %), T2:58 (51,8 %), T3:8 (7,1 %)
Στάδιο N	N0:47 (41,9 %), N1:42 (37,5 %), N2:17 (15,2 %), N3:6 (5,4 %)
AJCC Στάδιο	Πρώιμο: I 29 (25,9 %), IIA 32 (28,6 %)
Grade	Προχωρημένο: IIB 25 (22,3 %), IIIA 19 (16,9 %) IIIC 7 (6,3 %)
Grade	G1: 4 (3,6 %), G2: 58 (51,8 %), G3: 49 (43,7 %), Gx: 1 (0,9 %)
Ενίσχυση HER-2	Όχι:82 (73,2 %), Ναι:30 (26,8 %)
ER υποδοχείς	Αρνητικοί: 30 (26,8 %), Θετικοί: 82 (73,2 %)
PR υποδοχείς	Αρνητικοί: 45 (40,2%), Θετικοί: 67 (59,8 %)
Θεραπεία	
Χειρουργική	
Μαστεκτομή (απλή και TPM)	54 (48,2 %)
Ουγκεκτομή	1 (0,9 %)
Ουγκεκτομή και λεμφαδενικός καθαρισμός	57 (50,9 %)
Νεοεπιχειρητική χημειοθεραπεία	
Ναι: 106 (94,6 %)	Όχι: 6 (5,4 %)
Ακτινοθεραπεία	
Ναι: 71 (63,4 %)	Όχι: 41 (36,6 %)

Ορμονοθεραπεία	
Ναι: 85 (75,9 %)	Όχι: 27 (24,1 %)
Trastuzumab	
Ναι: 26 (23,2 %)	Όχι*: 86 (76,8 %)
Μοριακοί υπότυποι	
Προσαύλια Α	29 (25,9%)
Προσαύλια Β	35 (31,2 %)
Προσαύλια Β/HER2+	19 (17,0 %)
HER2+	11 (9,8 %)
TNBC	16 (14,3 %)
Αταξινόμητα	2 (1,8 %)

Πίνακας 5: Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, θεραπεία και μοριακός υπότυπος των ασθενών με follow-up.* 5 από τους HER2+ ασθενείς δεν έλαβαν Trastuzumab γιατί είχαν διαγνωστεί πριν από το 2007.



Εικόνα 19: Συσχέτιση aTLS- (aTLS0) και aTLS+ όγκων με διάστημα ελευθέρου νόσου και συνολική επιβίωση.



Εικόνα 20: Συσχέτιση dTLS- (aTLS0) και dTLS+ όγκων με διάστημα ελευθέρου νόσου και συνολική επιβίωση.

Στην ομάδα των 112 ασθενών όπου υπήρχε και κλινική παρακολούθηση (κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και θεραπευτικό σχήμα αναφέρονται περιληπτικά στον πίνακα 5), μελετήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στα περινεοπλασματικά TLS με την ελευθέρου νόσου και τη συνολική επιβίωση (DFS και OS αντίστοιχα).

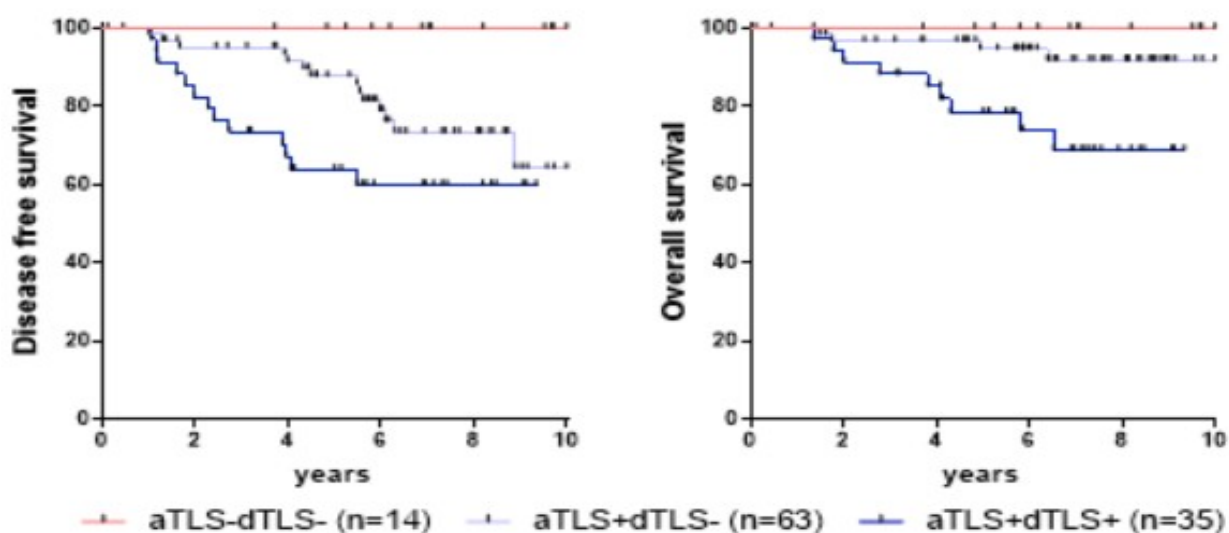
Οι ασθενείς με παρουσία aTLS παρουσίασαν σαφώς μικρότερο χρονικό διάστημα ελεύθερο, νόσου απ' ό,τι εκείνοι που στερούνταν aTLS· η συνολική επιβίωση είναι επίσης χαμηλότερη σε ασθενείς με aTLS, ωστόσο στην παρούσα μελέτη παρότι διακρίνεται μια τάση δεν αποδεικνύεται η στατιστική σημασία (εικόνα 19). Αναλόγως ασθενείς με dTLS παρουσίασαν στατιστικά μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου και συνολικής επιβίωσης απ' όσους στερούνταν dTLS (εικόνα 20).

Επιπρόσθετα η συνολική παρουσία αμφοτέρων aTLS και dTLS (aTLS+dTLS+) καθορίζει την ομάδα ασθενών με τη χειρότερη κλινική έκβαση όσον αφορά το διάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση (εικόνα 21).

Οι ασθενείς που έχουν aTLS+dTLS- όγκους είχαν μικρότερο ρίσκο υποτροπής και θανάτου από εκείνους με διπλά θετικούς όγκους (aTLS+dTLS+). Ως αναμενόμενο οι ασθενείς που στερούνταν aTLS και dTLS παρουσίασαν εξαιρετική πρόγνωση (εικόνα 21). Όλα τα στατιστικά στοιχεία και οι συσχετίσεις ανάμεσα στις προαναφερθείσες ομάδες ασθενών αναγράφονται στον πίνακα 6.

	Συγκρίσεις	Log Rank p	Gehan Breslow p	Hazard Ratio
Διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS)	aTLS-dTLS- / aTLS+ dTLS-	0.0423	0.0611	0.2702
	aTLS- dTLS- / aTLS+ dTLS-	0.0098	0.0112	0.2190
	aTLS- dTLS- / aTLS+ dTLS+	0.0471	0.0094	0.4354
Συνολική επιβίωση (OS)	aTLS-dTLS- / aTLS+ dTLS-	0.3206	0.3319	0.2873
	aTLS- dTLS- / aTLS+ dTLS-	0.0357	0.0419	0.2245
	aTLS- dTLS- / aTLS+ dTLS+	0.0066	0.0079	0.2028

Πίνακας 6: Στατιστικές συγκρίσεις ανάμεσα στις συνδυασμένες ομάδες ασθενών με DFS και OS. Με bold γραμματοσειρά οι στατιστικά σημαντικές τιμές.



Εικόνα 21: Συσχέτιση συνδυασμένων ομάδων ασθενών με το διάστημα ελεύθερου νόσου και τη συνολική επιβίωση.

Η μελέτη του διαστήματος ελεύθερου νόσου αλλά και εκείνη της συνολικής επιβίωσης στρωματοποιημένες κατά τον αριθμό των aTLS ανέδειξαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε πως στους aTLS+ όγκους ο αριθμός των aTLS (1-4 ή πάνω από 5) δεν επηρέασε σε

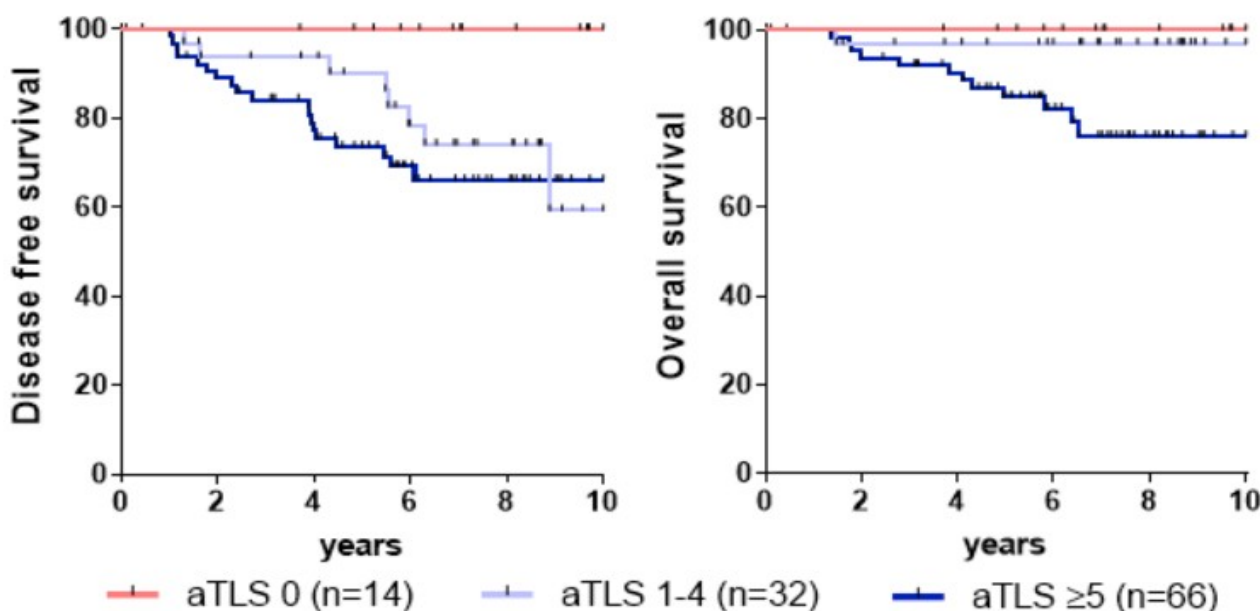
μεγάλο βαθμό το ελεύθερο νόσου, ενώ εκείνοι οι όγκοι που στερούνταν aTLS παρουσίασαν σαφώς καλύτερη πρόγνωση (εικόνα 22).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω η συνολική επιβίωση των ασθενών που παρουσίασαν πάνω από 5 aTLS (aTLS \geq 5) ήταν στατιστικά μικρότερη σε σχέση με εκείνους που είχαν χαμηλότερο αριθμό aTLS (aTLS1-4). Η τελευταία ομάδα ασθενών παρουσίασε προσδόκιμο επιβίωσης παρόμοιο με την ομάδα ασθενών στερούμενη aTLS (εικόνα 22 και πίνακας 7).

	Συγκρίσεις	Log Rank p	Gehan Breslow p	Hazard Ratio
Διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS)	aTLS0/aTLS1-4	0.0385	0.0582	0.2120
	aTLS0/aTLS \geq 5	0.0222	0.0265	0.2777
	aTLS1-4/aTLS \geq 5	0.3795	0.1710	0.7045
Συνολική επιβίωση (OS)	aTLS0/aTLS1-4	0.5083	0.5083	0.2375
	aTLS0/aTLS \geq 5	0.0750	0.0877	0.2813
	aTLS1-4/aTLS \geq 5	0.0302	0.0515	0.2852

Πίνακας 7: Στατιστικές συγκρίσεις ανάμεσα σε ομάδες ασθενών διαχωρισμένες με βάση τον αριθμό των aTLS σε σχέση με DFS και OS. Με bold γραμματοσειρά οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η απουσία των aTLS αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα, ενώ ταυτόχρονα υποδηλώνει ότι ο αριθμός των aTLS στους aTLS+



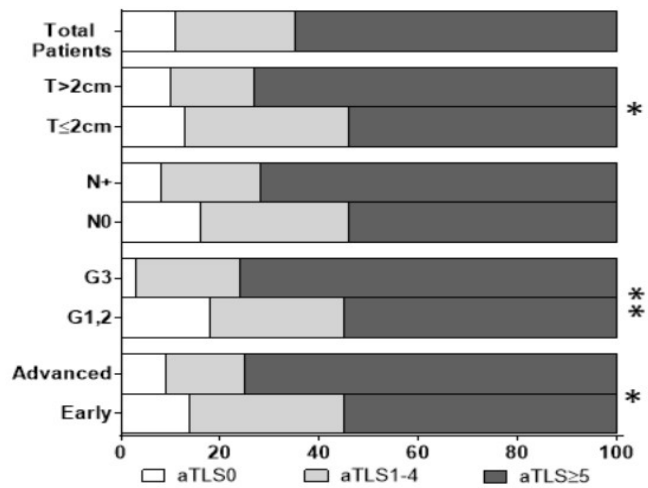
Εικόνα 22: Διαστήματα ελεύθερα νόσου και συνολικής επιβίωσης στρωματοποιημένα ως προς τον αριθμό των aTLS.

όγκους επηρεάζει διαφορετικά το διάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η κατατομή των προαναφερθέντων 3 ομάδων στους μοριακούς υποτύπους, με τους HER2+ όγκους να εκπροσωπούνται στην ομάδα στερούμενη aTLS (aTLS0), όπως έχει ήδη επισημανθεί και νωρίτερα στον πίνακα 4.

Μοριακοί υπότυποι	aTLS		
	aTLS0	aTLS1-4	aTLS \geq 5
Προσαύλια Α	9 (22%)	8 (20%)	24 (58%)
Προσαύλια Β	7 (13%)	17 (31%)	31 (56%)
Προσαύλια Β/HER2+	0 (0%)	6 (21%)	26 (79%)
HER2+	0 (0%)	3 (19%)	13 (81%)
TNBC	2 (10%)	5 (25%)	13 (65%)

Πίνακας 8: Ομάδες ασθενών διαχωρισμένες με βάση τον αριθμό των aTLS και η εκπροσώπησή τους σε κάθε μοριακό υπότυπο.

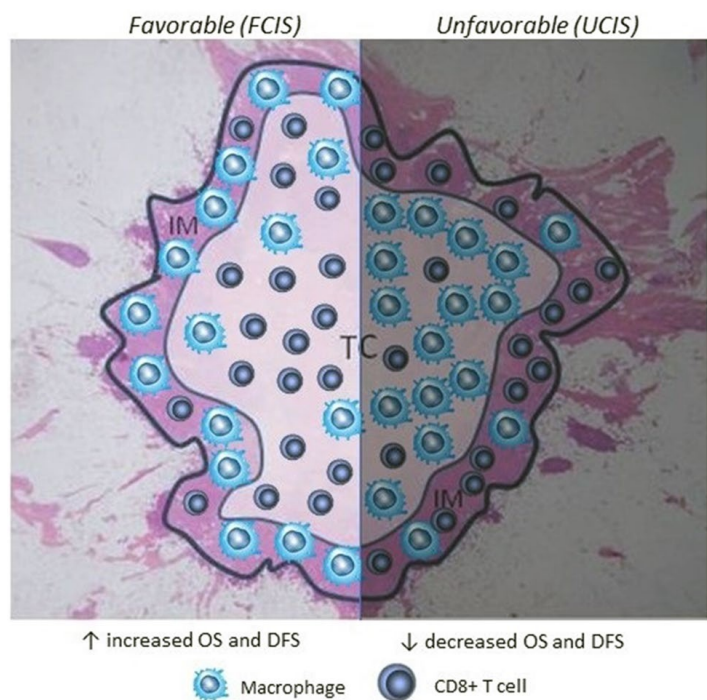
Ως αναμενόμενο η συχνότητα των ασθενών με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού που περιβάλλεται από υψηλό αριθμό aTLS παρουσιάζεται ενισχυμένη στις ομάδες εκείνων με δυσμενείς κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες κυρίως όσον αφορά το νεοπλασματικό grade, το μέγεθος του όγκου και τη νόσο προχωρημένου σταδίου (εικόνα 23) στα οποία και παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση.



Εικόνα 23: Η κατανομή των διαφόρων ομάδων aTLS στρωματοποιημένη ως προς τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Ενδονεοπλασματική ανοσολογική διήθηση και περινεοπλασματικά TLS· ένα βελτιωμένο ανοσολογικό προφίλ όγκου

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναδείχθηκε εμπειριστατωμένα η σημασία της διαφορικής τοπογραφικής κατανομής των CD8+ και CD163+ στο κέντρο και την περιφέρεια των νεοπλασματικών όγκων. Αναδείχθηκε μια ευνοϊκή συνδυασμένη ανοσολογική υπογραφή (Favourable Combined Immune Signature – FCIS εικόνα 24), αποτελούμενη από υψηλές συγκεντρώσεις CD8+ κυττάρων στο κέντρο του όγκου και χαμηλές κατά το διηθητικό μέτωπο του όγκου (CD8HL) σε συνδυασμό με αντίστροφες συγκεντρώσεις CD163+ κυττάρων στις



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση των FCIS και UCIS. Ανατύπωση από {Baxevanis CN et al}.

ίδιες περιοχές (CD163LH). Αντιθέτως, οι νεοπλασματικοί όγκοι με τους ανοσοφαινότυπους CD8LH και CD163HL αναδεικνύουν μια δυσμενή συνδυασμένη ανοσολογική υπογραφή (Unfavourable Combined Immune Signature – UCIS). Ωστόσο το άθροισμα αυτών των δύο υπογραφών αφορά περίπου το 50% των ασθενών της μελέτης.

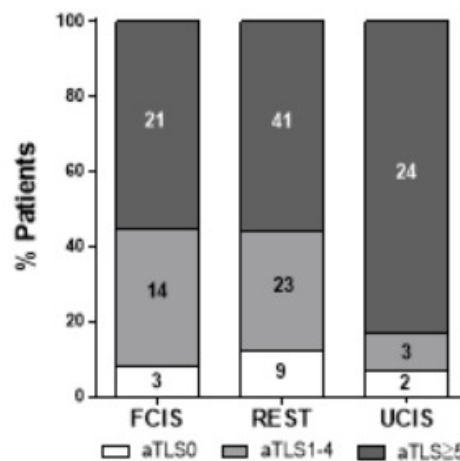
Το υπόλοιπο 50% (το οποίο αναφέρεται και ως REST group) αφορούσε συνδυασμούς ανοσολογικών υπογραφών οι οποίες δεν έβγαζαν σαφή στατιστικά αποτελέσματα. Αυτές περιελάμβαναν όγκους με ομογενοποιημένη κατανομή των CD8+ και CD163+ στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου.

Ονομαστικά αυτοί οι συνδυασμοί είναι CD8LL / CD163LL, CD8HH / CD163HH, CD8HH / CD163LL και CD8LL / CD163HH. Εξετάζοντας λοιπόν στην παρούσα μελέτη τις κατανομές των aTLS και dTLS στις ομάδες ασθενών με τις παραπάνω ανοσολογικές υπογραφές (FCIS, UCIS, REST) παρατηρήθηκε ότι σε αυτή την ομάδα με τη δυσμενή ανοσολογική υπογραφή (UCIS) η μεγάλη πλειονότητα των νεοπλασματικών όγκων είχε υψηλό αριθμό aTLS (aTLS \geq 5 που παρατηρήθηκαν σε 24 από τους 29 όγκους· 83%) σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών με ευνοϊκή (21 στους 38 όγκους· 55%) και τη μη ταξινομούμενη - “REST” (41 στους 73 όγκους· 56%) υπογραφή (FCIS έναντι UCIS $p=0.0403$ και “REST” έναντι UCIS $p=0.0384$ – εικόνα 25).

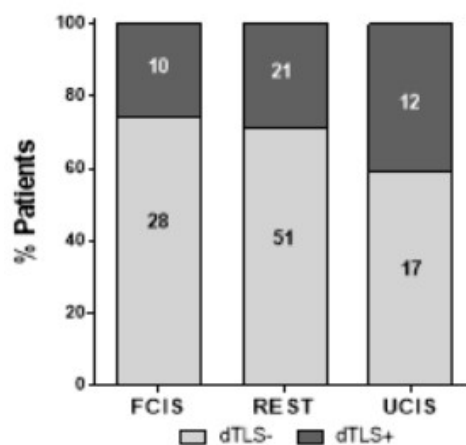
Επιπρόσθετα ένα αυξημένο ποσοστό ασθενών με UCIS παρουσίασε απομακρυσμένα TLS (dTLS) σε σύγκριση με τις άλλες 2 ομάδες ασθενών υποδεικνύοντας μια τάση χωρίς, όμως, αυτό να αναδεικνύεται στατιστικά σημαντικό (εικόνα 26).

Επιμέρους αναλύσεις στην ομάδα ασθενών με REST υπογραφή ανέδειξαν ουσιώδεις διαφορές όσον αφορά την παρουσία των aTLS και τους προαναφερθέντες 4 ανοσολογικούς συνδυασμούς που την αποτελούν. Η ομάδα CD8LL/CD163LL παρουσίασε τους περισσότερους aTLS0 ασθενείς (33%) και μόνο 17% των ασθενών εντός αυτής με υψηλό αριθμό TLS.

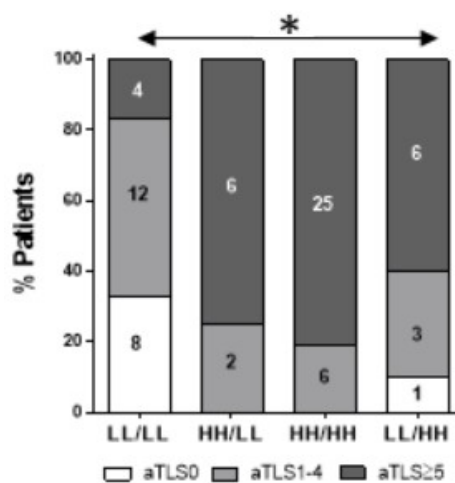
Αυτή η κατανομή είναι στατιστικά σημαντική και φαίνεται να την ξεχωρίζει από τις λοιπές τρεις ομάδες. Αυτές παρουσίασαν υψηλά ποσοστά aTLS \geq 5 και χαμηλά aTLS1-4/aTLS0 (60-80% και 0-10% αντίστοιχα - εικόνα 27). Όσον αφορά την κατανομή των aTLS στην ομάδα REST παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με aTLS0 σχετιζόνταν με ευνοϊκότερη πρόγνωση (ελευθέρου νόσου και συνολικής επιβίωσης) σε σχέση με τους όγκους με παρουσία aTLS (είτε aTLS1-4 ή aTLS \geq 5 – πίνακας 9, εικόνα 28).



Εικόνα 25: Κατανομή των aTLS/ομάδα συνδυασμένης ανοσολογικής υπογραφής (FCIS,UCIS,REST).



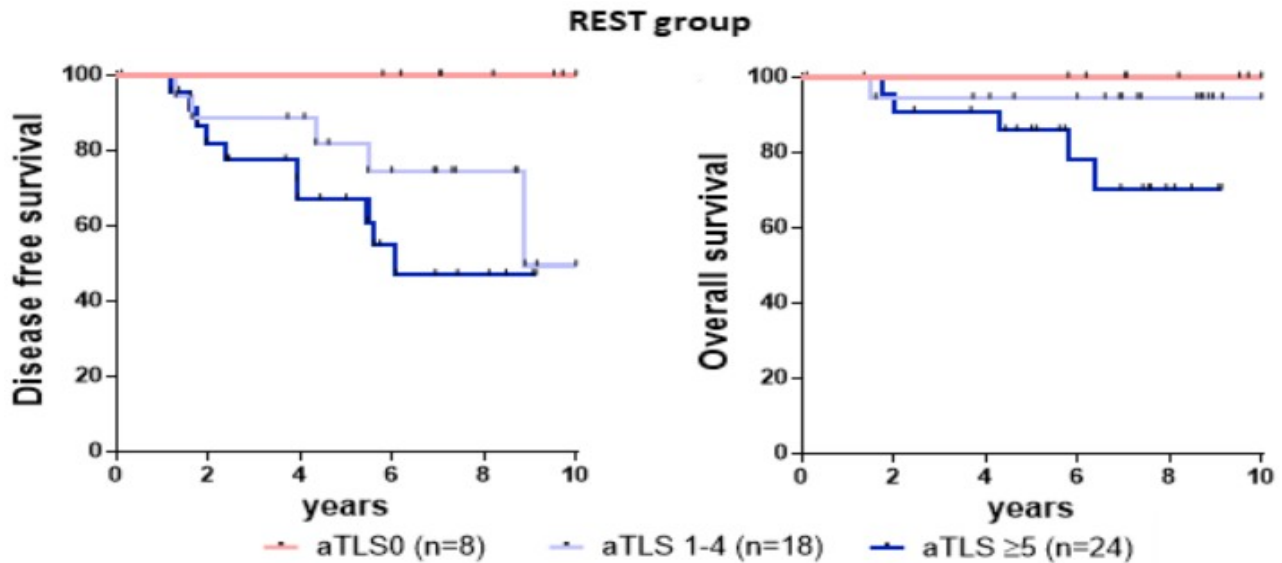
Εικόνα 26: Κατανομή των aTLS ανά ομάδα συνδυασμένης ανοσολογικής υπογραφής (FCIS, UCIS, REST).



Εικόνα 27: Η κατανομή των aTLS εντός της ομάδος REST.* $p\leq 0.0001$.

Σύγκριση Υπογραφές	Διάστημα ελεύθερο νόσου			Συνολική επιβίωση		
	aTLS0 / aTLS 1-4	aTLS0 / aTLS≥5	aTLS1-4 / aTLS≥5	aTLS0 / aTLS 1-4	aTLS0 / aTLS≥5	aTLS1-4 / aTLS≥5
Log rank p	0.0718	0.0187	0.2379	0.5050	0.1204	0.1338
Gehan Breslow p	0.1076	0.0259	0.2177	0.5050	0.1389	0.2204
Hazard Ratio	0.1886	0.2060	0.5420	0.2245	0.2245	0.2905

Πίνακας 9: Στατιστικές συγκρίσεις ανάμεσα στις ομάδες aTLS εντός REST group και OS σε σχέση με DFS και OS. Με bold γραμματοσειρά οι στατιστικά σημαντικές τιμές.

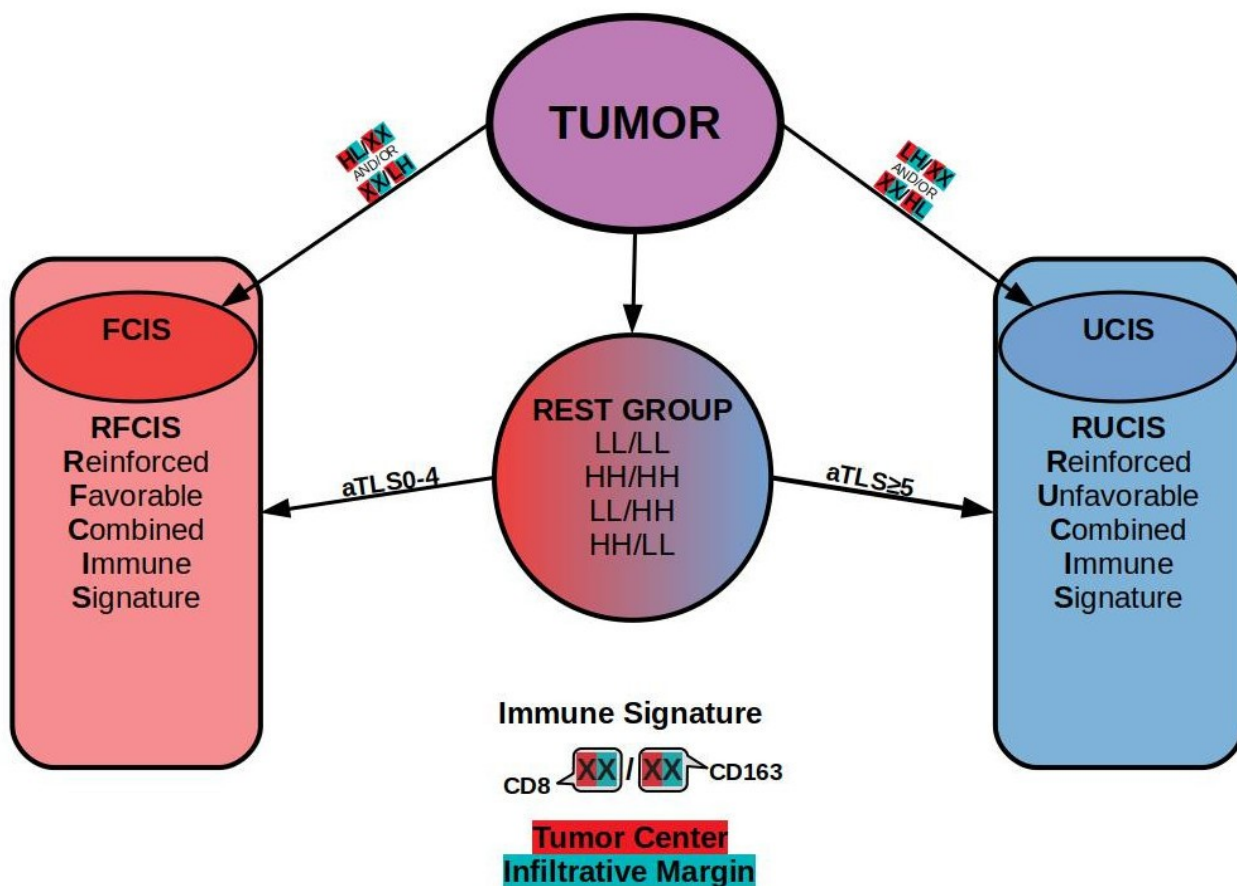


Εικόνα 28: DFS και OS ανά ομάδα aTLS εντός REST group.

Οι ενισχυμένες ανοσολογικές υπογραφές: Ένα τρίτο επίπεδο αξιολόγησης του ανοσολογικού προφίλ στο νεοπλασματικό μικροπεριβάλλον

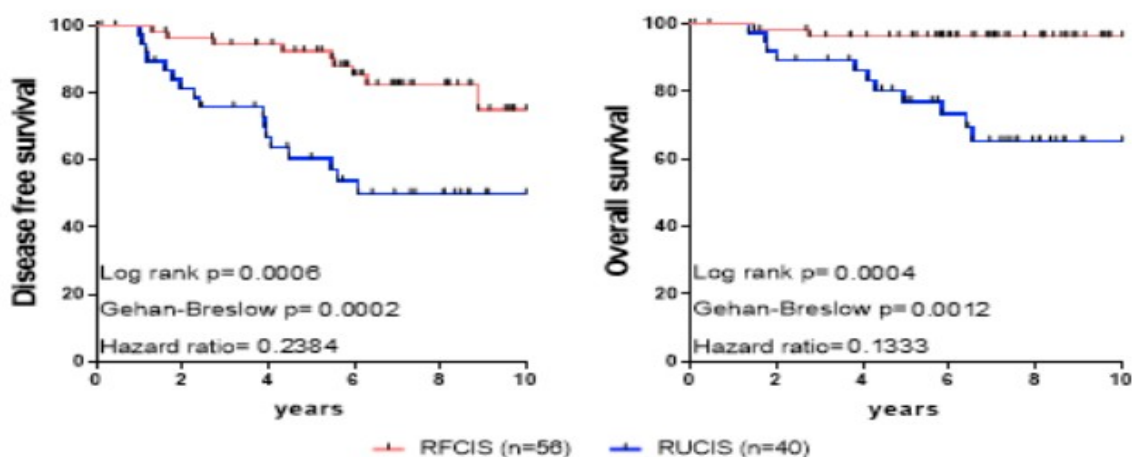
Σε μια προσπάθεια βελτίωσης των προαναφερθέντων (και αναλυμένων εκτενώς προηγουμένως) συνδυασμένων ανοσολογικών υπογραφών (FCIS - UCIS) με σκοπό να αυξηθεί η προγνωστική τους αξία αλλά και το πληθυσμιακό φάσμα ασθενών που καλύπτουν, επανεκτιμήθηκαν λαμβάνοντας υπ' όψιν και την ποσοτική αξιολόγηση της παρουσίας των aTLS (aTLS0, aTLS1-4 και aTLS≥5). Έτσι καθοριστήκαν δύο νέες, σαφώς διακριτές, «ενισχυμένες» ευνοϊκές ή δυσμενείς ανοσολογικές υπογραφές (Reinforced Favorable ή Unfavorable Combined Immune Signatures-RFCIS/RUCIS).

Δεδομένου του περιορισμένου αριθμού ασθενών με όγκους aTLS0 στην ομάδα REST (μόνο 8 ασθενείς με follow-up - εικόνα 28) και του ότι η κλινική συμπεριφορά των aTLS0 και aTLS1-4 νεοπλασμάτων δεν διέφερε σημαντικά, οι δύο αυτές ομάδες συνδυάστηκαν σε μία για περαιτέρω ανάλυση (aTLS0-4). Συνεπώς οι ασθενείς που ανήκουν στην ομάδα RFCIS είναι είτε CD8 HL και/ή CD163 LH (πρώην FCIS ομάδα) ή aTLS0-4 και αυτοί που ανήκουν στην RUCIS (οι εναπομείναντες δηλαδή) είναι CD8 LH και/ή CD163 HL (πρώην UCIS) και/ή aTLS≥5 (εικόνα 29).



Εικόνα 29: Αλγόριθμος απόδοσης «ενισχυμένης» ανοσολογικής υπογραφής.

Στατιστικές αναλύσεις αναδεικνύουν πως ο συνδυασμός της νέας αυτής «ενισχυμένης» ανοσοϋπογραφής με τα aTLS αυξάνει την προγνωστική τους αξία (εικόνα 30). Οι ασθενείς που είχαν όγκους με RFCIS (ενισχυμένη ευνοϊκή συνδυαστική ανοσολογική υπογραφή) παρουσίασαν σαφώς καλύτερο κλινικό αποτέλεσμα από εκείνους με τη RUCIS (ενισχυμένη δυσμενής συνδυαστική ανοσολογική υπογραφή). Αυτό αφορούσε τόσο σε διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) όσο και σε προσδόκιμο επιβίωσης (OS), ενώ η διαφορά από ανάλογες συγκρίσεις μεταξύ των FCIS έναντι UCIS (όπως αναδείχθηκε και νωρίτερα) και aTLS0 / aTLS1-4 έναντι aTLS≥5 υπερτονίζεται (εικόνα 22, πίνακας 7).

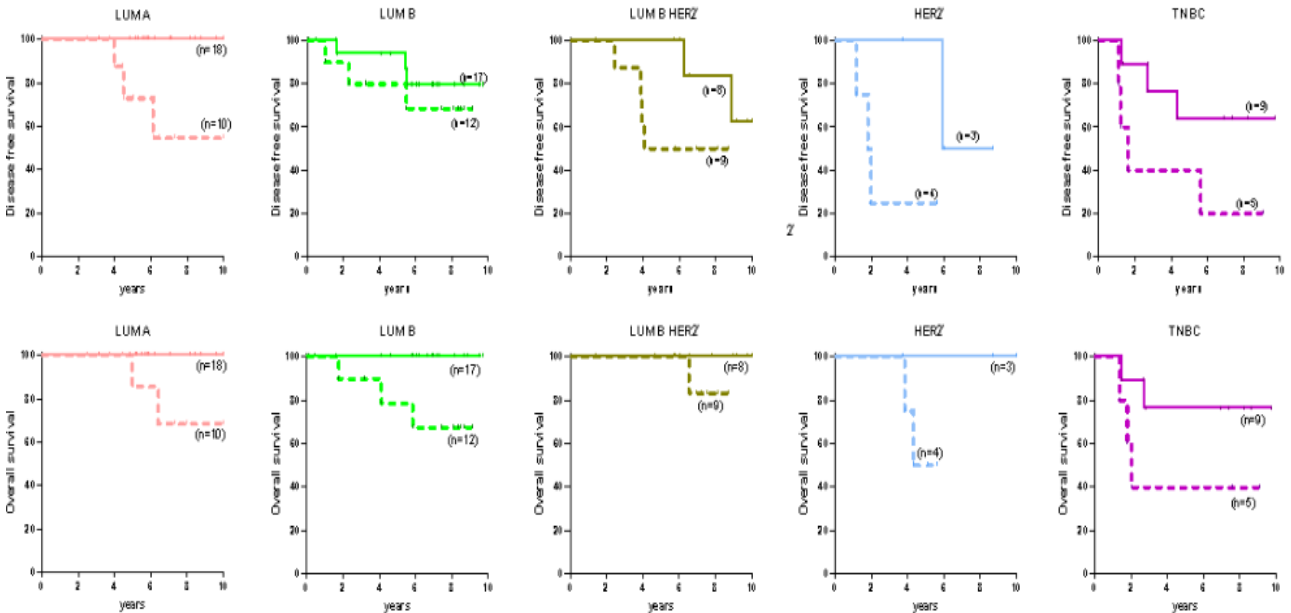


Εικόνα 30: RFCIS και RUCIS και κλινικό αποτέλεσμα.

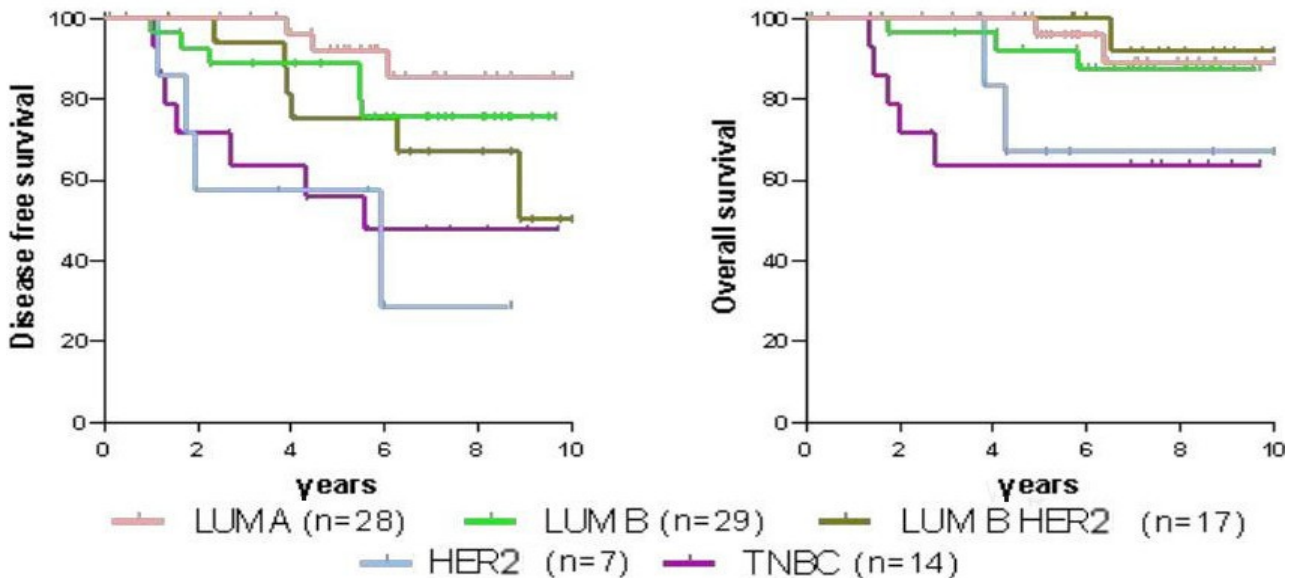
Το πενταετές προσδόκιμο ελεύθερου νόσου υπολογίστηκε 93% σε ασθενείς με όγκους RFCIS έναντι 61% σε ασθενείς με RUCIS. Ομοίως η συνολική πενταετής επιβίωση σε 97% έναντι 77% αντίστοιχα (πίνακας 10).

5ετής	Υπογραφή	Πιθανότητα	Ρίσκο
Διάστημα ελεύθερο νόσου	RFCIS	93	45
	RUCIS	61	19
Συνολική επιβίωση	RFCIS	96	47
	RUCIS	77	24

Πίνακας 10: 5ετής επιβίωση και διάστημα ελεύθερο νόσου ανά υπογραφή.



Εικόνα 31: Οι ανοσολογικές υπογραφές σε σχέση με DFS και OS ανά μοριακό υπότυπο. Συνεχής γραμμή RFCIS, διακεκομμένη RUCIS.

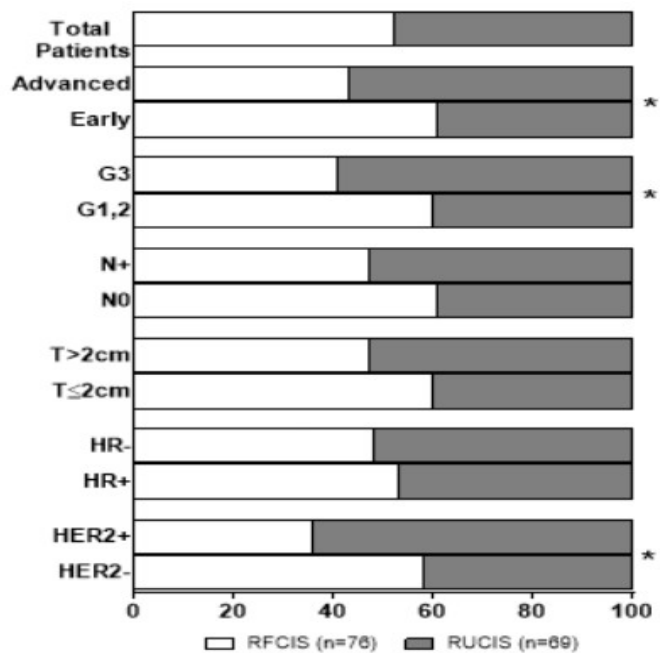


Εικόνα 32: Οι ίδιοι όγκοι κατά μοριακό υπότυπο

Σε γράφημα Kaplan-Meier στρωματοποιημένο κατά το σύστοιχο μοριακό υπότυπο καρκινώματος μαστού παρατηρείται ότι οι όγκοι RFCIS παρουσιάζουν ευνοϊκότερη συμπεριφορά έναντι των RUCIS ανεξαρτήτως μοριακού υποτύπου (εικόνα 31). Για σύγκριση παρατίθενται οι καμπύλες επιβίωσης των ίδιων όγκων στρωματοποιημένα κατά μοριακό υπότυπο (εικόνα 32).

Παρατηρήθηκε μια τάση για μεγαλύτερη συχνότητα RUCIS νεοπλασμάτων έναντι RFCIS σε ομάδες ασθενών με δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, η οποία γίνεται και στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνονται χαμηλόβαθμα έναντι υψηλόβαθμων καρκινωμάτων και πρώιμου σταδίου (I, IIA) έναντι προχωρημένου σταδίου νόσου (IIB, IIIA, IIIC) ή HER2- έναντι HER2+ όγκοι (εικόνα 33).

Αυξημένη συχνότητα RUCIS παρατηρήθηκε και στους HER2+ μοριακούς υποτύπους (με ή χωρίς έκφραση ER) όπως αναδεικνύεται στον πίνακα 11.



Εικόνα 33: RFCIS, RUCIS σε κλινικοπαθολογοανατομικά κριτήρια. * p<0.05.

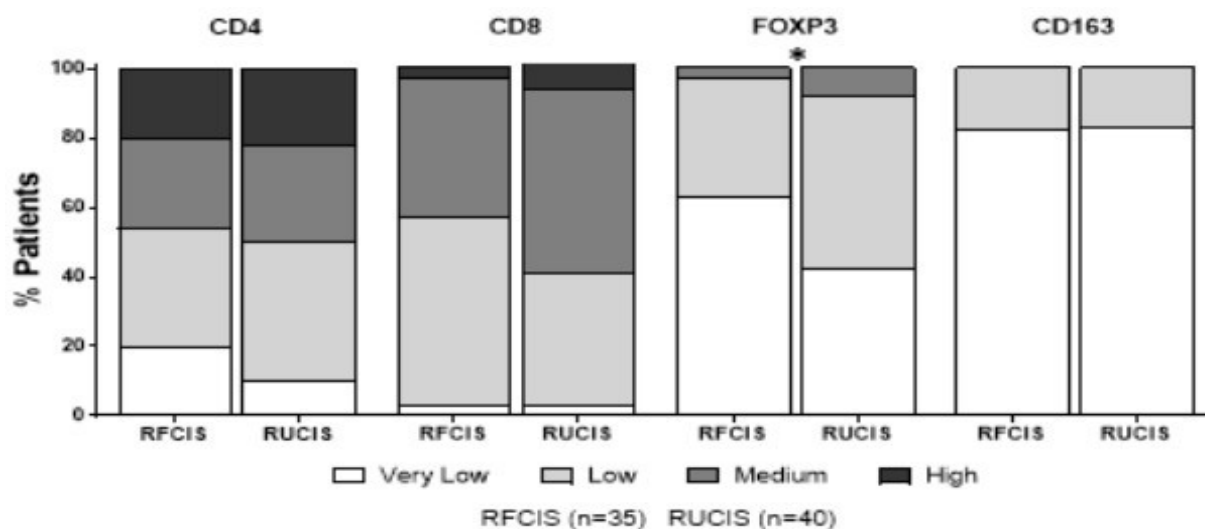
Μοριακός υπότυπος	«Ενισχυμένη» ανοσολογική υπογραφή	
	RFCIS	RUCIS
Προσαύλια Α	21 (52,5%)	19 (47,5%)
Προσαύλια Β	29 (63%)	17 (37%)
Προσαύλια Β/HER2+	11 (38%)	18 (62%)
HER2+	3 (33%)	6 (67%)
TNBC	10 (56%)	8 (44%)

Πίνακας 11: Η κατανομή των RFCIS και RUCIS ανά μοριακό υπότυπο.

Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη παρουσία CD4+, CD8+, CD163+ ανοσοκυττάρων εντός των TLS ανάμεσα σε όγκους με RFCIS και RUCIS. Ωστόσο παρατηρήθηκε η αυξημένη παρουσία FOXP3 λεμφοκυττάρων σε όγκους με RUCIS έναντι των RFCIS (εικόνα 34).

Μονοπαραγοντική	DFS			OS		
	P	Hazard Ratio	95.0% CI for Exp(B) (Range)	P	Hazard Ratio	95.0% CI for Exp(B) (Range)
Μοριακοί υπότυποι	0.001	1.555	1.197-2.019	0.008	1.650	1.130-2.409
Πρώμο-προχωρημένο στάδιο	0.001	4.332	1.837-10.212	0.006	17.564	2.293-134.540
Μέγεθος όγκου (T)	0.000	2.988	1.771-5.038	0.000	4.041	2.003-8.153
Λεμφαδενική διασπορά (N)	0.000	2.168	1.467-3.205	0.000	3.229	1.844-5.654
Grade	0.188	1.559	0.805-3.019	0.036	3.317	1.083-10.160
Ορμονικοί Υποδοχείς	0.003	0.323	0.152-0.689	0.010	0.249	0.086-0.719
Ενίσχυση HER-2	0.591	1.247	0.564-2.758	0.539	0.670	0.187-2.403
«Ενισχυμένες» υπογραφές	0.001	3.773	1.675-8.496	0.004	9.206	2.039-41.567
Πολυπαραγοντική	DFS			OS		
	P	Hazard Ratio	95.0% CI for Exp(B) (Range)	P	Hazard Ratio	95.0% CI for Exp(B) (Range)
Πριν από την προοδευτική προσθήκη μεταβλητών						
Μοριακοί υπότυποι	0.022	2.092	1.115-3.924	0.196	2.038	0.692-5.998
Πρώμο-προχωρημένο στάδιο	0.415	1.984	0.382-10.299	0.033	20.878	1.280-340.628
Μέγεθος όγκου (T)	0.049	2.475	1.004-6.101	0.662	1.331	0.369-4.802
Λεμφαδενική διασπορά (N)	0.654	1.162	0.602-2.44	0.743	1.152	0.495-2.78
Grade	0.387	0.693	0.302-1.591	0.706	1.378	0.261-7.276
Ορμονικοί Υποδοχείς	0.562	1.684	0.290-9.789	0.815	0.698	0.035-14.106
Ενίσχυση HER-2	0.756	0.847	0.298-2.407	0.016	0.140	0.028-0.690
«Ενισχυμένες» υπογραφές	0.009	3.450	1.366-8.708	0.014	11.026	1.631-74.533
Μετά την προοδευτική προσθήκη μεταβλητών						
Μοριακοί υπότυποι	0.000	1.685	1.268-2.241	0.000	2.432	1.528-3.871
Πρώμο-προχωρημένο στάδιο	-	-	-	0.002	37.148	3.808-362.371
Μέγεθος όγκου (T)	0.000	3.522	1.774-6.993	-	-	-
Ενίσχυση HER-2	-	-	-	0.012	0.158	0.037-0.666
«Ενισχυμένες» υπογραφές	0.009	2.981	1.307-6.802	0.003	12.583	2.362-67.024

Πίνακας 12: Όλες οι συµμεταβλητές µεταεπίτηκαν σε αριθµητικές αξίες µε βάση τα ακόλουθα: Μοριακοί υπότυποι (Lum A:1, Lum B:2, Luminal B/HER2+:3, HER2+:4, TNBC: 5, Πρώµο-προχωρηµένο στάδιο (I-IIA:1, IIB, IIIA, IIIC:2, Μέγεθος όγκου (T1:1, T2:2, T3:3), Λεµφαδενική διασπορά (N0:0 N1:1 N2:2 N3:3), Grade (G1:1, G2:2, G3:3), Ορµονικοί υποδοχείς (αρνητικοί:0, θετικοί:1), Ενίσχυση HER2 (OXI 0, NAI 1), «ενισχυµένες» υπογραφές (RFCIS:1, RUCIS:2)



Εικόνα 34: Κυτταρική πυκνότητα των CD4, CD8, CD163, FoxP3 στα TLS σε ασθενείς µε RFCIS και RUCIS όγκους. *p<0.01.

Για την περαιτέρω διερεύνηση των ενισχυµένων συνδυαστικών ανοσολογικών υπογραφών πραγµατοποιήθηκαν µονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις (πίνακας 12). Στη µονοπαραγοντική ανάλυση µε µοριακού υπότυπους, σύγκριση αρχόµενου έναντι

προχωρημένου σταδίου, μέγεθος όγκου (T), λεμφαδενική επέκταση (N), ορμονική έκφραση και ενίσχυση HER2 η προγνωστική αξία των ενισχυμένων ανοσοϋπογραφών είναι συγκρίσιμη εκείνης του μοριακού υποτύπου, σταδίου, μεγέθους (T), λεμφαδενικής διασποράς (N) και ορμονοθετικότητας, τόσο για το προσδόκιμο επιβίωσης όσο και για το διάστημα ελεύθερου νόσου. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση με τη σταδιακή επιλογή των προαναφερθέντων παραμέτρων, η ενισχυμένη ανοσολογική υπογραφή αναδεικνύεται ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας σε ό,τι αφορά το διάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνδυασμένη αξιολόγηση των CD8+ ή CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο του όγκου και το διηθητικό μέτωπο επιτρέπει καλύτερη στρωματοποίηση των ασθενών με καρκίνο του μαστού και βελτιώνει την προγνωστική αξία σταδιοποίησης του TNM για το διάστημα ελεύθερου νόσου αλλά και τη συνολική επιβίωση. Με αρχική εστίαση στον πιο συχνό λεμφοκυτταρικό πληθυσμό στα διηθούντα τον όγκο λεμφοκύτταρα (TILs), τα CD8+, παρατηρήθηκαν ευνοϊκότερα DFS και OS όταν οι συγκεντρώσεις των CD8+ κυττάρων ήταν υψηλές στο κέντρο του όγκου και χαμηλές στο διηθητικό μέτωπο (CD8+ HL). Στον αντίποδα αυτού ο αντίστροφος συνδυασμός (CD8+ LH) σχετίζεται με σαφώς δυσμενέστερη πρόγνωση έχοντας συχνότερες υποτροπές και μειωμένη συνολική επιβίωση. Αυτό το εύρημα είναι αρκετά ενδιαφέρον δεδομένου ότι η πιο ισχυρή ανοσολογική υπογραφή στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνδυάζει υψηλές πυκνότητες, τόσο στο κέντρο του όγκου όσο και στο διηθητικό μέτωπο {Galon J, et al}{Pages F, et al}. Η αξιολόγηση της εντόπισης αλλά και της κυτταρικής πυκνότητας των M2 μακροφάγων (CD163+) στα διάφορα διαμερίσματα του όγκου αναδεικνύει επίσης κλινικώς σημαντικά αποτελέσματα. Το CD163 είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη εκφραζόμενη κυρίως από τον M2 υπότυπο (αντιφλεγμονώδη) μακροφάγων {Tang X 2013}. Εντοπίστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις CD163+ απ' ό,τι CD8+ σε αμφότερα τα διαμερίσματά του (TC και IM), εύρημα συμβατό με την αυξημένη εισροή των ενεργοποιημένων από τον όγκο μακροφάγων (TAMs – Tumor Associated Macrophages) που παρατηρείται στον καρκίνο του μαστού {Tang X 2013}. Σε σύμπνοια με πρόσφατες μελέτες διαπιστώνεται πως η παρουσία CD163+ μακροφάγων στο κέντρο του όγκου σχετίζεται με δυσμενέστερους κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες {Medrek C et al}. Ωστόσο η αξιολόγηση των CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων σε μεμονωμένα διαμερίσματα του όγκου δεν εμφάνισε ικανή στατιστική συσχέτιση με το DFS ή την OS. Παρ' όλα αυτά οι συνδυαστικές αναλύσεις των CD163+ κυτταρικών πυκνοτήτων στα δύο διαμερίσματα του όγκου (TC, IM) ανέδειξαν πως οι όγκοι με χαμηλή συγκέντρωση στο κέντρο και υψηλή κατά το διηθητικό μέτωπο έχουν ευνοϊκή πρόγνωση (CD163+ LH), ενώ όσοι έχουν την αντίστροφη κατανομή παρουσιάζουν δυσμενή (CD163+ HL).

Δεν είναι ξεκάθαρο πού μπορεί να οφείλεται η παρουσία διαφορετικών κυτταρικών συγκεντρώσεων ανάμεσα στα διαμερίσματα του όγκου. Δεδομένης της διάδρασης ανάμεσα στα νεοπλασματικά κύτταρα και τις ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούν μπορεί να υποτεθεί πως η κατανομή των κυτταρικών συγκεντρώσεων εξαρτάται από τα τοπικώς εκκρινόμενα, εκ των νεοπλασματικών κυττάρων, φλεγμονώδη μόρια τα οποία και επιστρατεύουν ανοσολογικά κύτταρα σε διαφορετικές περιοχές του νεοπλάσματος. Αυτή η διαμερισματοποίηση είναι ικανή να επηρεάσει τη λειτουργική κατάσταση αυτών των ανοσολογικών κυττάρων όπως εξάλλου έχει ήδη αναδειχθεί για τα ενδονεοπλασματικά δενδριτικά κύτταρα που παρουσιάζουν κατασταλτικές και διεγερτικές λειτουργίες κατά περίπτωση {Figel AM et al}{Giraldo NA et al 2015}{Middel P et al

2010}. Με έναν ανάλογο τρόπο, οι χημειοκίνες έχει αποδειχθεί πως προσελκύουν επιλεκτικά CD8+ στα διάφορα διαμερίσματα του όγκου. Το τελευταίο είναι ένδειξη ότι οι τοπογραφικές συγκεντρώσεις των διαφόρων πληθυσμών TILs αποτελούν μια ρευστή, δυναμική διεργασία με ογκοκατασταλτική ή ογκοδιεγερτική δράση εξαρτώμενη από τη βιολογία του όγκου {Becht E, et al 2016}{Dannenmann SR, et al 2013}{Elsasser-Beile U, et al 2003}{Fridman WH, et al 2012}{Oldham KA, et al}{Polimeno M, et al 2013}{Sharpe K, et al 2013} και σχετιζόμενη με την κλινική πορεία της νόσου στα διάφορα νεοπλασμάτα, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού {Miyan M, et al 2016} {Figel AM et al}. Σε σύμπνοια με τα παραπάνω παρατηρήθηκε ότι η παρουσία ανοσολογικών κυττάρων με διαφορετικές λειτουργίες (CD8+ και CD163+) σε ξεχωριστά νεοπλασματικά διαμερίσματα και σε διαφορετικές κυτταρικές συγκεντρώσεις έχει προγνωστική αξία· ωστόσο μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό εάν η εντόπισή τους στο κάθε διαμέρισμα του όγκου είναι σχετιζόμενη με κυτταρομεταναστευτικές διεργασίες επαγόμενες από τοπικά εκκρινόμενους παράγοντες ή λόγω αρχιτεκτονικών φραγμών που κατά κάποιον τρόπο «αιχμαλωτίζουν» τα κύτταρα αυτά σε συγκεκριμένα ογκολογικά διαμερίσματα {Salgado R, et al. 2015}.

Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε επίσης πως οι όγκοι με ευνοϊκού τύπου ανοσολογικές κυτταρικές συγκεντρώσεις (CD8+ HL, CD163+ LH) σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση ακόμα και σε ασθενείς οι όγκοι των οποίων έχουν δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (προχωρημένη νόσος, μεγάλο μέγεθος, θετικοί λεμφαδένες, υψηλό grade). Το τελευταίο γίνεται σε τέτοιο βαθμό που η κλινική πορεία αυτών των ασθενών είναι στατιστικά συγκρίσιμη με εκείνους οι νεοπλασματικοί όγκοι των οποίων παρουσιάζουν ευνοϊκούς κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες.

Σε θεωρητικό επίπεδο τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποδεικνύουν ότι ώσπου να γίνει κλινικά αντιληπτό ένα καρκίνωμα του μαστού, η προσαρμοστική ανοσολογική αντίδραση εξακολουθεί να είναι ενεργή, συμβάλλοντας έτσι καθοριστικά στην καθυστέρηση της ανάπτυξης του όγκου. Αυτό δεν συμπλέει ακριβώς με τη θεωρία της ανοσοδιαμόρφωσης (ανοσοεκτύπωσης) {Schreiber RD, et al} δεδομένου ότι η επίδραση της προσαρμοστικής ανοσολογικής αντίδρασης μπορεί να παραμείνει σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου, όπως άλλωστε έχει αναδειχθεί και στην παρούσα μελέτη που ασθενείς με καρκίνους προχωρημένου σταδίου που εμφάνιζαν όμοια κλινική πορεία (DFS και OS) με ασθενείς πρώιμου σταδίου, αρκεί οι όγκοι τους να παρουσίαζαν την ευνοϊκή ανοσολογική υπογραφή. Φαίνεται λοιπόν ότι αυτή η ευνοϊκή ανοσολογική υπογραφή καθυστερεί την ανάπτυξη των όγκων, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της συνολικής επιβίωσης. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η προϋπάρχουσα ανοσία μπορεί, ως έναν βαθμό, να κατευθυνθεί εναντίον των νεοαντιγόνων που εκφράζονται από τους όγκους που δημιουργούνται διαμέσου της έκφρασης μη συνωνύμων σωματικών μεταλλάξεων {Schumacher TN, et al}. Εναλλακτικά η FCIS υπογραφή μπορεί να συμβάλει στη διαμόρφωση του νεοπλασματικού

στρώματος αλλά και των καρκινικών κυττάρων δυσχεραίνοντας τη διαδικασία της αγγειογένεσης, γεγονός που εμποδίζει την ανάπτυξη του νεοπλάσματος. Οι μεταβολές στις κυτταρικές συγκεντρώσεις και τη λειτουργία των ανοσολογικών κυττάρων, που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της νόσου, μπορεί να συμβάλουν στη διαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων από την ανοσολογική επιτήρηση. Οι βασικοί μηχανισμοί της επίκτητης ανοσολογικής αντίστασης των νεοπλασματικών όγκων αποδίδονται κυρίως σε επιγενετικές μεταβολές {Zaretsky JM, et al} {Shukla SA, et al}{Koyama S, et al}, στην υπερδραστηριοποίηση (upregulation) εναλλακτικών ανοσολογικών σημείων ελέγχου αλλά και στην απώλεια των μη συνώνυμων σωματικών μεταλλάξεων που με τη σειρά της οδηγεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή και πλήρη απώλεια των νεοαντιγόνων{Anagnostou V, et al}. Ωστόσο ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις η ωφέλιμη ογκοκατασταλτική δράση της ενδονεοπλασματικής αντινεοπλασματικής ανοσίας, μπορεί να εξακολουθήσει να υφίσταται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου, γεγονός που εξασθενεί το μεταστατικό δυναμικό αυτού, συμβάλλοντας έτσι σε ευνοϊκότερη κλινική πορεία της νόσου.

Επειδή στην παρούσα μελέτη ο νεοπλασματικός όγκος έχει αφαιρεθεί χειρουργικά, η σχετιζόμενη με την ενδονεοπλασματική ανοσολογική αντίδραση προγνωστική αξία μπορεί να αντικατοπτρίζει την ποσότητα και την ποιότητα των κυκλοφορούντων κυτταροτοξικών ουσιών και των θραυσμάτων από τη λύση των νεοπλασματικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, σε λεμφικούς ιστούς ή σε οποιοδήποτε άλλο ανατομικό διαμέρισμα. Είναι ωστόσο μέχρι στιγμής άγνωστο εάν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον ανοσοφαινότυπο των νεοπλασματικών όγκων και στην αποκριτικότητα των περιφερικών ανοσολογικών κυττάρων σε ανοσολογική διέγερση. Έχει παρατηρηθεί {Mortarini R, et al} πως η παρουσία των Treg κυττάρων στην περιοχή του όγκου σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της κυτταροκίνης TGFβ και μειωμένη ανταπόκριση έναντι στην IL-2 από τα περιφερικά T κύτταρα. Σε σύμπλευση με τα παραπάνω σε μια δεύτερη μελέτη έχει αποδειχθεί ο αντίστροφος συσχετισμός ανάμεσα στα επίπεδα της κυτταροκίνης TGFβ στον ορό και την ανοσολογική αντίδραση σε ένα υβριδικό πεπτιδίο HER2/neu που έχει χρησιμοποιηθεί σε εμβολιασμό ασθενών με καρκίνο του προστάτη {Perez SA, et al}.

Αναδείχθηκε επίσης ότι η συχνότητα των ασθενών που παρουσιάζουν ευνοϊκή συνδυασμένη ανοσολογική υπογραφή (FCIS) εμφανιζόταν μειωμένη στις ομάδες με δυσμενείς κλινικοπαθολογοανατομικούς χαρακτήρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ευνοϊκές κυτταρικές συγκεντρώσεις των CD8+ και CD163+ είναι αντιστρόφως σχετιζόμενες με το στάδιο TNM της νόσου. Ίσως λοιπόν να σχετίζεται η πρόοδος της νόσου με την επιδείνωση αυτής της ανοσολογικής αντίδρασης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακά αυξανόμενη διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση. Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, ακόμα και σε προχωρημένο στάδιο νόσου η ισχύς της ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό παράγοντα ελέγχου της ανάπτυξης του όγκου. Αναδείχθηκε, επίσης πως οι διαφορετικές πυκνότητες και διαμερισματική κατανομή

των CD8⁺ και CD163⁺ κυτταρικών πυκνοτήτων όπως περιγράφονται στην ανοσολογική υπογραφή FCIS μπορούν να ξεχωρίσουν τους ασθενείς με υψηλότερο DFS ή μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ανεξαρτήτως του προχωρημένου σταδίου της νόσου (κατά TNM). Αυτό αναδεικνύει την FCIS, όπως καθορίζεται σε αυτήν τη μελέτη, ως έναν προγνωστικό δείκτη που θα μπορούσε να βελτιώσει, πέραν του TNM, την πρόβλεψη της πρόγνωσης σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του μαστού.

Όσον αφορά τα περινεοπλασματικά TLS εξετάστηκε η παρουσία, η ποσότητα και οι ανοσολογικοί χαρακτήρες αυτών, μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες ανοσολογικές υπογραφές. Οι τελευταίες προκύπτουν βασιζόμενες στις συγκεντρώσεις CD8⁺, CD163⁺ ανοσοκυττάρων στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου, όπως έχει αναφερθεί εκτενώς προηγουμένως. Αυτού του τύπου οι αναλύσεις ανέδειξαν σημαντικές πληροφορίες για την τοπική προσαρμοστική ανοσολογική κατάσταση με την εισαγωγή βελτιωμένων ανοσολογικών βιοϋπογραφών για την πρόγνωση στα καρκινώματα του μαστού. Μέχρι στιγμής αυτή είναι η πρώτη μελέτη που επιδεικνύει ότι η παρουσία αλλά και ο μεγάλος αριθμός των περινεοπλασματικών TLS σχετίζεται με δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και χειρότερη πρόγνωση στο διηθητικό καρκίνο του μαστού.

Τα TLS περιλαμβάνουν δομές ποικίλης οργάνωσης που κυμαίνονται από απλές λεμφοκυτταρικές αθροίσεις σε σύνθετες δομές με μορφολογικούς, κυτταρικούς και μοριακούς χαρακτήρες όμοιους με τα δευτερογενή λεμφοκυτταρικά όργανα και κυρίως τους λεμφαδένες {Colbeck EJ et al 2017}{Engelhard VH et al 2018}. Ως συνέπεια αυτού η παρουσία των φλεβιδίων με υψηλό επιθήλιο (High Endothelial Venules – HEV), κοινό δομικό χαρακτηριστικό ανάμεσα σε SLO και TLS, μπορεί να διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην επιστράτευση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στα ενδονεοπλασματικά TLS {Goc J et al 2014}{Nerviani A et al 2018}. Η συμβολή των TLS στον ανοσολογικό έλεγχο των νεοπλασματικών όγκων παραμένει σε επίπεδο πιθανολογίας. Τα TLS έχουν βρεθεί στο στρώμα και/ή το διηθητικό μέτωπο των όγκων σε όλους τους καρκίνους και η παρουσία τους σχετίζεται συνήθως με ευνοϊκή πρόγνωση {Sautes-Fridman C et al 2016}{Di Caro G et al 2014}{Ladanyi A et al 2014}{Schweiger T et al 2016}. Η παρουσία των TLS ενδονεοπλασματικά έχει συσχετιστεί με αντινεοπλασματική ανοσολογική δράση η οποία πιθανώς να σχετίζεται με την ενίσχυση της δράσης των λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο (TILs) {Colbeck EJ et al 2017}{Goc J et al 2014}. Τα σχετιζόμενα με TLS δενδριτικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως προς την εκκίνηση της T λεμφοκυτταρικής τοπικής αντινεοπλασματικής αντίδρασης, παρουσιάζοντας τα αντιγονικά πεπτίδια στα T-λεμφοκύτταρα εντοπιζόμενα στις T περιοχές των TLS {Goc J et al 2014}. Επιπρόσθετα η παρουσία CD4⁺ T κυττάρων εντός των TLS ενισχύει περαιτέρω την έννοια του ενός υποστηρικτικού ρόλου των TLS για τη διαφοροποίηση των CD8⁺ δραστικών (effector) TILs {de Chaisemartin L et al 2011}. Ωστόσο τα TLS μπορεί να έχουν και αρνητική επίπτωση στην έκβαση

του καρκίνου. Η παρουσία των Tregs εντός των TLS μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ενεργοποίηση των CD4+ και CD8+ ανοσολογικών διηθημάτων, συντελώντας έτσι στη διαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων από την ανοσολογική επιτήρηση {Joshi NS et al 2015}. Επιπρόσθετα, ανοσοκατασταλτικά B κύτταρα, παρακείμενα σε CD8+ T λεμφοκύτταρα έχουν παρατηρηθεί σε λεμφοειδείς δομές στο καρκίνο του προστάτη {Shalarour S et al}.

Ο ρόλος των περινεοπλασματικών TLS, των ευρισκόμενων δηλαδή πέραν του διηθητικού μέτωπου, έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο όσον αφορά την προγνωστική τους αξία. Ιδιαίτερα δε στον καρκίνο του μαστού οι μελέτες είναι ελάχιστες (πίνακας 1, σελίδα 62). Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας αποδεικνύουν ότι η παρουσία των περινεοπλασματικών TLS σχετίζεται με υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους (grade 3), αποτέλεσμα που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες που αφορούν τον καρκίνο του μαστού {Liu X et al 2017} και το ουροθηλιακό καρκίνωμα {Koti M et al 2017}. Επιπλέον αναδείχθηκε ότι οι ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (ανεξαρτήτως μοριακού υποτύπου) και παρουσία περινεοπλασματικών TLS παρουσιάζουν δυσμενέστερα DFS και OS από εκείνους που τα στερούνται. Αυτό εξαρτάται από την τοποθεσία των TLS (περινεοπλασματικά ή/και απομακρυσμένα) και την αριθμητική τους παρουσία (0,1-4 και ≥ 5). Σε μια πρόσφατη έρευνα {Liu X et al 2017} αναφέρεται πως η παρουσία των TLS κατά το διηθητικό μέτωπο ή/και περινεοπλασματικά σχετίζεται με ευνοϊκότερο (μεγαλύτερο) διάστημα ελεύθερου νόσου αλλά όχι και στη συνολική επιβίωση. Αυτό το εύρημα παρατηρήθηκε μόνο στους HER2+ όγκους (είτε LumB-Her2+ ή ορμονοαρνητικούς HER2+), ενώ δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές που να αφορούν τη συνολική επιβίωση ή το διάστημα ελεύθερου νόσου στους HER2- ασθενείς. Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε κανένας HER2+ στερούμενος TLS στην παρούσα μελέτη το συγκεκριμένο εύρημα δεν μπορεί ούτε να διαψευστεί ούτε ή επιβεβαιωθεί. Η απουσία ασθενών με όγκους HER2+ στερούμενους TLS μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η παρούσα μελέτη περιελάμβανε μόνο NST καρκινώματα, χωρίς προηγηθείσα νεοεπικουρική θεραπεία και έως σταδίου IIIA, ενώ η έρευνα των Liu X et al δεν είχε περιορισμούς για τον ιστολογικό τύπο του καρκινώματος.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η αυξημένη συγκέντρωση CD8+ κυττάρων στο διηθητικό μέτωπο του όγκου αλλά όχι στο κέντρο αυτού προλέγει δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού. Συνδυάζοντας αυτά τα αποτελέσματα με τη δυσμενή πρόγνωση των περινεοπλασματικών TLS που προκύπτει από την παρούσα μελέτη, μπορεί να υποτεθεί πως τα ανοσολογικά στοιχεία εντοπιζόμενα είτε περινεοπλασματικά ή στο διηθητικό μέτωπο του όγκου μπορεί να αντικατοπτρίζουν τη σταδιακή μετανάστευση νεοπλασματικών κυττάρων από το κέντρο του όγκου σε περιφερικές θέσεις σχετιζόμενες με διήθηση ή μετάσταση. Αυτή η υπόθεση μπορεί να επαληθευτεί δεδομένου ότι τόσο σε αυτήν τη μελέτη αλλά και σε άλλες {Liu X et al 2017} ανευρέθηκαν περινεοπλασματικά TLS με παρουσία καρκινικών βλαστών. Επιπρόσθετα τα εξωνεοπλασματικά TLS φαίνεται να σχετίζονται με προηγμένου σταδίου νόσο στο καρκίνωμα του

παχέος εντέρου {Bento DC et al 2015}. Εναρμονισμένο με αυτό σε μια διαφορετική μελέτη {Finkin S et al 2015} αναφέρεται πως τα TLS σχετιζόμενα με φλεγμονή δρουν ως φωλεές για την εναπόθεση κυττάρων πρόδρομων των νεοπλασματικών όγκων στο καρκίνωμα του ήπατος. Η εν λόγω υπόθεση όχι μόνο σχετίζει τα περινεοπλασματικά TLS με πιθανές υποτροπές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος αλλά και υποδηλώνει τον δυσμενή προγνωστικό ρόλο τους. Ωστόσο αυτό φαίνεται να αφορά πάλι και μόνο τα περινεοπλασματικά TLS καθότι σε άλλη μελέτη {Calderaro J et al 2019} τα ενδονεοπλασματικά TLS σχετίζονται με ευνοϊκότερη πρόγνωση στα ηπατώματα. Συνεπώς τα περινεοπλασματικά TLS μπορεί να συμβάλουν στη δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος είτε περιορίζοντας την αντινεοπλασματική ανοσολογική αντίδραση ή ενισχύοντας τη νεοπλασματική ανάπτυξη {Butterfield LH 2017}.

Εκτός όμως της τοπογραφικής κατανομής των TLS (ενδο/περινεοπλασματικά) ένας επιπλέον παράγοντας που πρέπει ληφθεί υπ' όψιν είναι τα ποιοτικά χαρακτηριστικά αυτών. Ο σχηματισμός του TLS ακολουθείται από μια σειρά σταδίων ωρίμανσης τα οποία πιθανώς να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μορφές λειτουργικότητας {Colbeck EJ et al 2017} {Posch F et al 2018} (εικόνα 6, σελίδα 60). Στοχευμένες μελέτες που αφορούσαν τη διήθηση των TLS αποδίδουν την ανοσοκατασταλτική τους δράση στα διηθούντα ανοσολογικά κύτταρα {Joshi NS et al 2015} {Shalarour S et al 2015}. Στον καρκίνο του μαστού τα Tregs που ανευρίσκονται εντός της περινεοπλασματικής φλεγμονής έχουν συσχετιστεί με αυξημένο ρίσκο υποτροπής και θανάτου {Gobert M et al}. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ότι σε ασθενείς με όγκους RUCIS η παρουσία των FoxP3+ κυττάρων εντός των περινεοπλασματικών TLS είναι αυξημένη σε αντίθεση με τους RFCIS όγκους. Τέτοια TLS που εμπεριέχουν αυξημένο αριθμό FoxP3+ μπορεί να προάγουν τη δημιουργία ενός ανοσοκατασταλτικού μικροπεριβάλλοντος το οποίο με τη σειρά του να ευθύνεται για τη μειωμένη επιβίωση. Λαμβάνοντας όλα τα παραπάνω υπ' όψιν θα μπορούσε να θεωρηθεί πως ο σχηματισμός, η παρουσία και η ποιότητα των TLS συμβάλουν ουσιαστικά στη διαμόρφωση της ετερογένειας του μικροπεριβάλλοντος, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές ανάμεσα στα ενδονεοπλασματικά και τα περινεοπλασματικά TLS. Η εν λόγω υπόθεση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στην παρούσα μελέτη η παρουσία και η πυκνότητα των TLS δεν είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για το διάστημα ελευθέρου νόσου (DFS) και τη συνολική επιβίωση (OS). Γι' αυτόν το λόγο συνδυάζοντας την τοπογραφική κατανομή (κέντρο όγκου, διηθητικό μέτωπο) των CD8+ και CD163+ κυττάρων μαζί με τον αριθμό των περινεοπλασματικών TLS σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού δημιουργήθηκαν πιο ισχυρές, «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές. Αυτές για να καθιερωθούν στην κλινική πράξη θα πρέπει πρώτα να δοκιμαστούν σε μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Η διαφορετική τοπογραφική κατανομή των CD163+ και CD8+ όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για DFS και OS. Ωστόσο

κάλυπτε μόνο ένα $\approx 50\%$ των ασθενών καθότι οι υπόλοιποι, δεδομένου ότι δεν ταξινομούνταν ούτε ως FCIS ούτε ως UCIS, ανήκαν σε μια ομάδα «γκρίζας ζώνη» (REST group). Ο συνδυασμός στοιχείων του ενδοεπιπλασματικού και περιεπιπλασματικού μικροπεριβάλλοντος (από κέντρο, διηθητικό μέτωπο, aTLS) στρωματοποίησε με περισσότερη ακρίβεια τους ασθενείς δημιουργώντας 2 υπογραφές: RUCIS και RFCIS. Αυτές αποτελούν από μόνες τους έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για το DFS και το OS.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά τη μελέτη των κυτταρικών πυκνοτήτων CD8+ και CD163+ που διηθούν το νεοπλασματικό όγκο στον καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε ότι οι διαφορετικές πυκνότητες των ίδιων ανοσολογικών κυτταρικών πληθυσμών εντοπισμένες στο κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου, μπορεί να διαχωρίζουν τους ασθενείς σε ομάδες με διαφορετική πρόγνωση. Η FCIS υπογραφή όπως αυτή ορίστηκε προηγουμένως προβλέπει ευνοϊκότερη εξέλιξη της νόσου (DFS και OS) ανάμεσα σε ετερογενείς ομάδες ασθενών με δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. Συνεπώς η συσχέτιση της TNM ταξινόμησης και των συνδυασμένων ανοσολογικών υπογραφών μπορούν να διακρίνουν υποομάδες ασθενών με ξεχωριστή πρόγνωση.

Επίσης στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε για πρώτη φορά η συσχέτιση ανάμεσα στη διαφορετική τοπογραφική κατανομή των φλεγμονωδών διηθημάτων σε σχέση με τα περινεοπλασματικά TLS και την κλινική συμπεριφορά των καρκινωμάτων του μαστού. Τα ευρήματα που παρατηρήθηκαν στηρίζουν επιπρόσθετα την παρουσία μιας δυναμικής διάδρασης ανάμεσα στα ανοσολογικά κύτταρα ευρισκόμενα εντός του νεοπλασματικού και εντός του αντίστοιχου περινεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος. Παρ' όλους τους περιορισμούς της εν λόγω μελέτης (μικρό δείγμα ασθενών και βιβλιογραφική ασάφεια όσον αφορά τα στάδια ωρίμανσης των TLS) παρουσιάστηκαν ισχυρές ενδείξεις που υποστηρίζουν τον θεμελιώδη ρόλο της σχέσης ανάμεσα στα διάφορα στοιχεία που αποτελούν το μικροπεριβάλλον του όγκου και της κλινικής συμπεριφοράς. Επιβάλλεται να γίνουν επιπρόσθετες μελέτες στοχευμένες στα κύτταρα και τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στο σχηματισμό των TLS, διαχειρίζονται τη λειτουργικότητά τους και τα διαχωρίζουν σε TLS με αντινεοπλασματική ή με ανοσοκατασταλτική δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Allen M, Louise Jones J, Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer, 2011.*J Pathol*,223(2):162–176. doi: 10.1002/path.2803.
- Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K., Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer., 2004.,6(1):17-32. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.010.
- Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, Niknafs N, Bhattacharya R, White J, Zhang T, Adleff V, Phallen J, Wali N, Hruban C, Guthrie VB, Rodgers K, Naidoo J, Kang H, Sharfman W, Georgiades C, Verde F, Illei P, Li QK, Gabrielson E, Brock MV, Zahnow CA, Baylin SB, Scharpf RB, Brahmer JR, Karchin R, Pardoll DM, Velculescu VE., Evolution of neoantigen landscape during immunecheckpoint blockade in non-small cell lung cancer., 2017.*Cancer Discov.*,7(3):264–76. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0828.
- Andrew E Place,Sung Jin Huh,Kornelia Polyak, The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment, 2011.*Breast Cancer Res*,13(6). doi:10.1186/bcr2912.
- Baxevanis CN, Sofopoulos M, Fortis SP, Perez SA, The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer, 2019. *Cancer Immunol Immunother*,1-10. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02327-7>.
- Becht E, Giraldo NA, Germain C, de Reyniès A, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J, Dieu-Nosjean MC, Sautès-Fridman C, Fridman WH., Chapter Four - Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers, 2016.*Adv Immunol.*,130:95-190. doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.002.
- Bento DC, Jones E, Junaid S, Tull J, Williams GT, Godkin A, Ager A, Gallimore A , High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression, .*Oncoimmunology*,4(3):e974374. doi:10.4161/2162402X.2014.974374.
- Bollyky PL, Wu RP, Falk BA, Lord JD, Long SA, Preisinger A, Teng B, Holt GE, Standifer NE, Braun KR, Xie CF, Samuels PL, Vernon RB, Gebe JA, Wight TN, Nepom GT, ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors, 2011.*Proc Natl Acad Sci U S A*,108(19):7938-43. doi: 10.1073/pnas.1017360108.
- Buisseret L, Desmedt C, Garaud S, Fornili M, Wang X, Van den Eyden G, de Wind A, Duquenne S, Boisson A, Naveaux C, Rothe F, Rorive S, Decaestecker C, Larsimont D, Piccart-Gebhart M, Biganzoli E, Sotiriou C, Willard-Gallo K, Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer., 2017.*Mod Pathol*,30(9):1204-1212. doi:10.1038/modpathol.2017.43.
- Butterfield LH 2017: Butterfield LH, Kaufman HL, Marincola FM, *Cancer Immunotherapy Principles and Practice*, 2017
- Calderaro J, Petitprez F, Becht E, Laurent A, Hirsch TZ, Rousseau B, Luciani A, Amaddeo G, Derman J, Charpy C, Zucman-Rossi J, Fridman WH, Sautès-Fridman C , Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma, . *J Hepatol*,70(1):58-65. doi:10.1016/j.jhep.2018.09.003.
- Chen LC, Tu SH, Huang CS, Chen CS, Ho CT,Lin HW, Lee CH, Chang HW, Chang CH, WuCH, Lee WS, Ho YS, Human breast cancer cellmetastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesionkinase and the paxillin-signaling pathway., 2012.*Breast Cancer Res Treat*,134(3):989–1004.. doi: 10.1007/s10549-012-1986-8.
- Choi YP, Lee JH, Gao MQ, Kim BG, Kang S,Kim SH, Cho NH, ancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models, 2014.*Int J Cancer*,135(9):2024–2033. doi: 10.1002/ijc.28848.

- Colbeck, E. J., Ager, A., Gallimore, A., & Jones, G. W, *Tertiary Lymphoid Structures in Cancer: Drivers of Antitumor Immunity, Immunosuppression, or Bystander Sentinels in Disease?*, 2017.*Front. Immunol*,8(1830):. doi: 10.3389/fimmu.2017.01830.
- Coleman RE, Gregory W, Marshall H, Wilson C, Holen I., *The metastatic microenvironment of breast cancer: clinical implications*, 2013. *The Breast* ,22 (Sup2):S55-56. doi :10.1016/j.breast.2013.07.010.
- Curiel TJ, *Regulatory T cells and treatment of cancer.*, 2008.*Curr Opin Immunol*,20(2):241–246.
- da Cunha A, Michelin MA, Murta EF, *Patternresponse of dendritic cells in the tumor mi-croenvironment and breast cancer.*, 2014.*World J Clin Oncol*,5(3):495–502. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.495.
- Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, Matter C, von Boehmer L, Cecconi V, Hermanns T, Hefermehl L, Schraml P, Moch H, Knuth A, van den Broek M. , *Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma*, 2013.*Oncoimmunology*,2(3):e23562. doi:10.4161/onci.23562.
- de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Dieu-Nosjean MC, *Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer*, 2011.*Cancer Res*,71(20):6391-6399. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0952.
- Del Valle PR, Milani C, Brentani MM, Kata-yama ML, de Lyra EC, Carraro DM, BrentaniH, Puga R, Lima LA, Rozenchan PB, NunesBdos S, Goes JC, Azevedo Koike FolgueiraMA, *Transcriptional profile of fibroblasts ob-tained from the primary site, lymph node and bone marrow of breast cancer patients*, 2014.*GenetMol Biol*,37(3):480–489. PMID: 25249769.
- Delalogue S, Wolp-Diniz R, Byrski T, Blum JL, Goncalves A, Campone M, Lardelli P, KahattC, Nieto A, Culllell-Young M, Lubinski J, *Activity of trabectedin in germline BRCA1/2-mutated metastatic breast cancer: results of aninternational first-in-class phase II study*, 2014.*Ann Oncol*,25(6):1152–1158. doi: 10.1093/annonc/mdu134.
- DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, GallagherWM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA, RugoHS, Hwang ES, Jirstrom K, West BL, Coussens, *Leukocyte complexity predictsbreast cancer survival and functionally regu-lates response to chemotherapy*, 2011.*Cancer Discov*,1(1):54–67. 10.1158/2159-8274.CD-10-0028.
- Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Diemel M, von Minckwitz G., *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.*, 2010.*J Clin Oncol*.,28(1):105-113. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
- Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, Budczies J, Huober J, Klauschen F, Furlanetto J, Schmitt WD, Blohmer JU, Karn T, Pfitzner BM, Kümmel S, Engels K, Schneeweiss A, Hartmann A, Noske A, Fasching PA, Jackisch C, van Mackelenbergh M, Sinn P, Schem C, Hanusch C, Untch M, Loibl S., *Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy.*, 2018.*Lancet Oncol*,19(1):40-50. doi:10.1016/S1470-2045(17)30904-X.
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M., *A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas*, .*J Clin Pathol*,48(9):876-8. doi:10.1136/jcp.48.9.876.
- Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F, *Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers*, 2014.*Clin Cancer Res*,20():2147-2158. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2590.
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA, *Bone marrow contribution to tu-mor-associated myofibroblasts and fibro-blasts*, 2004.*Cancer Res*,64(23):8492–8495. .
- Direkze NC, Jeffery R, Hodivala-Dilke K, Hunt T, Playford RJ, Elia G, Poulson R, Wright NA, Alison MR, *Stromal fibro-blasts present in invasive human breast carci-nomas promote tumor growth and angiogen-*

esis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, 2005.*Cell*,121(3):335–348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034.

Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Howell T, Houghton J, Baum M., Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study, 2005.*J Clin Oncol*,23(30):7512-7. doi:10.1200/JCO.2005.01.4829.

Elsässer-Beile U, Gierschner D, Welchner T, Wetterauer U., Different expression of Fas and Fas ligand in tumorinfiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cellcarcinomas, 2003.*Anticancer Res*,23(1A):433–7.

Emad A Rakha, Sarah E Pinder, John M S Bartlett, Merdol Ibrahim, Jane Starczynski, Pauline J Carder, Elena Provenzano, Andrew Hanby, Sally Hales, Andrew H S Lee, Ian O Ellis, Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer, 2015.*J Clin Pathol*,68(2):93-99. doi:10.1136/jclinpath-2014-202571.

Emad A. Rakha, Stewart Martin, Andrew H. S. Lee, David Morgan, Paul D. P. Pharoah, Zsolt Hodi, Douglas MacMillan, Ian O. Ellis, The Prognostic Significance of Lymphovascular Invasion in InvasiveBreast Carcinoma, 2012.*Cancer*,118(15):3670-80. doi:10.1002/cncr.26711.

Engelhard VH, Rodriguez AB, Mauldin IS, Woods AN, Peske JD, Slingluff CL, Jr., Immune Cell Infiltration and Tertiary Lymphoid Structures as Determinants of Antitumor Immunity., 2018.*J Immunol*,200(2):432-442. doi:10.4049/jimmunol.1701269.

Fainaru O, Almog N, Yung CW, Nakai K, Montoya-Zavala M, Abdollahi A, D'Amato R, Ingber DE, Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells, 2010.*FASEB J*,24(5):1411–1418. doi:10.1096/fj.09-147025.

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, Andre S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M, A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer., 2009.,15(0):68–74. doi:10.1038/nm.1908.

Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Muller-Holzner E, Marth C, Laird PW, Widschwendter M, Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer, 2006.*Cancer Res*,66(1):29-33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2508.

Figel AM, Brech D, Prinz PU, Lettenmeyer UK, Eckl J, Turqueti-Neves A, Mysliwicz J, Anz D, Rieth N, Muenchmeier N, Buchner A, Porubsky S, Siegert SI, Segerer S, Nelson PJ, Noessner E., Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations, 2011. *Am J Pathol*,179(1):436–451. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.011.

Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, Fenton C, Mortensen ES, Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients., 2015.*BMC cancer*,15(101):1. doi:10.1186/s12885-015-1116-1.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Sou-leimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M, , 2008.*Nat Med*,14(0):518–527. doi: 10.1038/nm1764.

Finkin S, Yuan D, Stein I, Taniguchi K, Weber A, Unger K, Browning JL, Goossens N, Nakagawa S, Gunasekaran G, Schwartz ME, Kobayashi M, Kumada H, Berger M, Pappo O, Rajewsky K, Hoshida Y, Karin M, Heikenwalder M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E , Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma, 2015.*Nat Immunol* ,16(12):1235-1244. doi:10.1038/ni.3290.

Folgueira MA, Maistro S, Katayama ML, Roela RA, Mundim FG, Nanogaki S, de Bock GH, Brentani MM, Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series., 2013.*Biosci Rep*,33(6):e00085. doi: 10.1042/BSR20130060.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J., 2012.*Nat Rev Cancer*,12(4):298-306. 10.1038/nrc3245.

- Hortobagyi G.N.: Gabriel N. Hortobagyi, *Physician to Physician* AJCC 8th Edition, 2017, https://cancerstaging.org/CSE/Physician/Documents/AJCC_PPT%20-Breast%20Webinar%2011-8-17v2.pdf
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome, 2006. *Science*, 313(5795):1960–4. doi: 10.1126/science.1129139.
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F, Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours., 2014. *J Pathol*, 232(2):199-209. doi: 10.1002/path.4287.
- Gibson J, Anti-PD-L1 for metastatic triplenegative breast cancer, 2015. *Lancet Oncol*, 16(3):264. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70208-1.
- Giraldo NA, Becht E, Pagès F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, Mejean A, Saint-Aubert N, Lacroix L, Natario I, Lupo A, Alifano M, Damotte D, Cazes A, Triebel F, Freeman GJ, Dieu-Nosjean MC, Oudard S, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer, 2015. *Clin Cancer Res*, 21(13):3031-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2926.
- Gobert M1, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Ménétrier-Caux C., Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome, 2009. *Cancer Res.*, 69(5):2000-9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2360.
- Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, de Chaisemartin L, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC, Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ T cells, 2014. *Cancer Res*, 74(3):705-175. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1342.
- Gøril Knutsvik, Ingunn M. Stefansson, Sura Aziz, Jarle Arnes, Johan Eide, Karin Collett, Lars A. Akslen, Evaluation of Ki67 Expression across Distinct Categories of Breast Cancer Specimens: A Population-Based Study of Matched Surgical Specimens, Core Needle Biopsies and Tissue Microarrays, 2015. *PLoS One*, 9(11):. doi:10.1371/journal.pone.0112121.
- Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, Ravoet M, Le Buanec H, Sibille C, Manfouo-Foutsop G, Veys I, Haibe-Kains B, Singhal SK, Michiels S, Rothé F, Salgado R, Duvillier H, Ignatiadis M, Desmedt C, Bron D, Larsimont D, Piccart M, Sotiriou C, Willard-Gallo K, CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival, 2013. *J Clin Invest*, 123(7):2873–2892. doi: 10.1172/JCI67428.
- Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S., American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer., 2010. *J Oncol Pract*, 6(4):. doi:10.1200/JOP.777003.
- Hannesdottir L, Tymoszek P, Parajuli N, Wasmer MH, Philipp S, Daschil N, Datta S, Koller JB, Tripp CH, Stoitzner P, Muller-Holzner E, Wieggers GJ, Sexl V, Villunger A, Doppler W, Lapatinib and doxorubicin enhance the Stat1-dependent antitumor immuneresponse, 2013. *Eur J Immunol*, 43(10):2718–2729. doi: 10.1002/eji.201242505.
- Harold F. Dvorak, Tumors: Wounds That Do Not Heal, 1986. *N Engl J Med.*, 315(26):1650-9. doi:10.1056/NEJM198612253152606.

- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC., Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer., 1999.*J Clin Oncol*,17(5):1474-81. doi:10.1200/JCO.1999.17.5.1474.
- Hicks D: Hicks D, Lester S, *Diagnostic Pathology: Breast*, 2016
- Jiang X, Harnessing the immune system for the treatment of breast cancer, 2014.*Journal of Zhejiang University. Science. B*,15(1):1-15. doi:10.1631/jzus.B1300264.
- Jiang X, Shapiro DJ., The immune system and inflammation in breast cancer., 2014.*Mol Cell Endocrinol*,382(1):673-682. doi:10.1016/j.mce.2013.06.003.
- Joshi NS, Akama-Garren EH, Lu Y, Lee DY, Chang GP, Li A, DuPage M, Tammela T, Kerper NR, Farago AF, Robbins R, Crowley DM, Bronson RT, Jacks T , Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses., 2015.*Immunity*,43(3):579-590. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.006.
- Jung YI, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, Berry JE, McGee S, Lee E, Sun H, Wang J, Jin T, Zhang H, Dai J, Krebsbach PH, Keller ET, Pienta KJ, Taichman RS., Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis, 2013.*Nat Commun*,4():. doi:10.1038/ncomms2766.
- Käkönen SM, Mundy GR., Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma., 2003.*Cancer*,97(S3):834-9. doi:10.1002/cncr.11132.
- Korkaya H, Liu S, Wicha MS, Breast cancer stem cells, cytokine , 2011.*J Clin Invest*,121(10):3804–3809.
- .
- Koti M, Xu AS, Ren KYM, Visram K, Ren R, Berman DM, Siemens DR (2017), Tertiary Lymphoid Structures Associate with Tumour Stage in Urothelial Bladder Cancer, 2017.*Bladder Cancer*,3(4):259-267. doi:10.3233/BLC-170120.
- Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, Gandhi L, Redig AJ, Rodig SJ, Asahina H, Jones RE, Kulkarni MM, Kuraguchi M, Palakurthi S, Fecci PE, Johnson BE, Janne PA, Engelman JA, Gangadharan SP, Costa DB, Freeman GJ, Bueno R, Hodi FS, Dranoff G, Wong KK, Hamerman PS., Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints, 2016.*Nat Commun*,7(10501):. doi: 10.1038/ncomms10501.
- Kristic R.V: Kristic R.V, *Human Microscopic Anatomy* , 1997
- Ladanyi A, Sebestyen T, Mohos A, Liskay G, Somlai B, Toth E, Timar J (2014) Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma, Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma, 2014.*Pathol Oncol Res*,20(4):981-985. doi:10.1007/s12253-014-9784-8.
- WHO Classification of Tumours of the Breast: Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J, *WHO Classification of Tumours of the Breast*, 2012
- Lee HJ, Park IA, Song IH, Shin SJ, Kim JY, Yu JH, Gong G, Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer., 2016.*J Clin Pathol*,69(5):422-430. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203089.
- Diagnostic Pathology: Breast: Lester S, Hicks D, Diagnostic Pathology: Breast*, 2016
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM, Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling, 2009.*Cell*,139(5):891–906. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
- Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X, Tumor-educated CD11b^{high}Ia^{low} regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I, 2009.*J Immunol*,182(10):6207-16. doi: 10.4049/jimmunol.0803926 .
- Liu X, Tsang JYS, Hlaing T, Hu J, Ni YB, Chan SK, Cheung SY, Tse GM, Distinct Tertiary Lymphoid Structure Associations and Their Prognostic Relevance in HER2 Positive and Negative Breast Cancers, 2017.*Oncologist*,22(11):1316-1324. doi:10.1634/theoncologist.2017-0029.
- Lotze MT, Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer, 1997.*Ann Surg*,226(1):1-5. PMC: 1190900.

- Lu P, Weaver VM, Werb Z, *The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression*, 2012.*J Cell Biol*,196(3):395–406. doi: 10.1083/jcb.201102147.
- Ludovic Martinet, Thomas Filleron, Sophie Le Guellec, Philippe Rochaix, Ignacio Garrido, Jean-Philippe Girard, , 2013.*J Immunol*,191(4):2001-2008. doi: 10.4049/jimmunol.1300872 .
- Ma XJ, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC, *Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression*, 2009.*Breast Cancer Res*,11(1):. .
- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainger MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR, *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer*, 2011.*J Clin Oncol*,29(15):1949–1955. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5037.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F, *Cancer-related inflammation*, 2008.*Nature*,454(7206):436–444. doi: 10.1038/nature07205.
- Mantovani A, Locati M, *Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions.*, 2013.*Arterioscler Thromb Vasc Biol*,33(7):1478–1483. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.300168.
- Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgiu F, *Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth*, 2014.*Semin Cancer Biol*,25(1):47-60. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.01.005.
- Medrek C, Pontén F, Jirstrom K, Leandersson K., *The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients*, 2012.,12(306):. doi: 10.1186/1471-2407-12-306.
- Middel P, Brauneck S, Meyer W, Radzun HJ, , 2010.,10(578):. doi:10.1186/1471-2407-10-578.
- Min Hu, Jun Yao, Danielle K. Carroll, Stanislaw Weremowicz, Haiyan Chen, Daniel Carrasco, Andrea Richardson, Shelia Violette, Tatiana Nikolskaya, Yuri Nikolsky, Erica L. Bauerlein, William C. Hahn, Rebecca S. Gelman, Craig Allred, Mina J. Bissell, Stuart Schnitt, Kornelia Polyak, *Regulation of In Situ to Invasive Breast Carcinoma Transition*, 2008.,13(5):394–406. doi:10.1016/j.ccr.2008.03.007.
- Min Hu, Kornelia Polyak, *Microenvironmental regulation of cancer development*, 2009.,18(1):27-34. doi: 10.1016/j.gde.2007.12.006.
- Miyama M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, de Boniface J., *Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer*, 2016.*J Transl Med*,14(1):227. doi:10.1186/s12967-016-0983-9.
- Mortarini R, Vegetti C, Molla A, Arienti F, Ravagnani F, Maurichi A, Patuzzo R, Santinami M, Anichini A., *Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage*, 2009.*Clin Cancer Res*,15(12):4085–94.. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3323.
- Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Drosner RA, Muraro MG, Zajac P, Zanetti R, Gillanders WE, Weber WP, Soysal SD, *Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer*, 2014.*Breast Cancer Res Treat*,146(1):15-24. doi:10.1007/s10549-014-2988-5.
- Muenst S, Soysal SD, Tzankov A, Hoeller S, *The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy*, 2014.*Expert Opin Ther Targets*,19(2):1–11. doi: 10.1517/14728222.2014.980235.
- Nerviani A, Pitzalis C, *Role of chemokines in ectopic lymphoid structures formation in autoimmunity and cancer.*, 2018.*J Leukoc Biol* ,104(2):333-341. doi:10.1002/JLB.3MR0218-062R.
- Ningqiang Ma, Hailin Pang, Weiwei Shen, Feng Zhang, Zaoxun Cui, Junyan Wang, Jianlin Wang, Lili Liu, Helong Zhang, *Downregulation of CXCR4 by SDF-KDEL in SBC-5 cells inhibits their migration in vitro and organ metastasis in vivo*, 2015.*Int J Mol Med*,35(2):425-432. doi:10.3892/ijmm.2014.2033.
- Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M, *Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer.*, 2009.*Cancer Immunol Immunother*,58(3):441-447. .

Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, Adams DH, Lee SP, *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298–306.32. Oldham KA, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6., 2012.*Eur Urol*,61(2):385–94.. doi: 10.1016/j.eururo.2011.10.035.

Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.*, 2005.*Cell*,121(5):335-348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.

Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*, 2009.*J Clin Oncol*,27(35):5944–51. doi: 10.1200/JCO.2008.19.6147.

Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Petruzalka L, Konopasek B, Dundr P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Muşină AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J, *International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study.*, 2018.*Lancet*,391(10135):2128–2139. doi:10.1016/S0140-6736(18)30789-X.

Palazzo J.: Palazzo J., *Practical Surgical Pathology of the Breast*, 2018

Pedersen L, Gunnarsdottir KA, Rasmussen BB, Moeller S, Lannig C , *The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients*, 2004.*Breast*,13(3):188-193. doi: 10.1016/j.breast.2003.11.004.

Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A, *Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity*, 2014.*Clin Immunol*,153(1):145–152. doi: 10.1016/j.clim.2014.04.010.

Perez SA, Kallinteris NL, Bisias S, Tzonis PK, Georgakopoulou K, Varla-Leftherioti M, Papamichail M, Thanos A, von Hofe E, Baxevanis CN., *Results from a phase I clinical study of the novel Ii-Key/HER-2/neu(776–790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer.*, 2010.*Clin Cancer Res.*,16(13):3495–506.. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0085.

Polimeno M, Napolitano M, Costantini S, Portella L, Esposito A, Capone F, Guerriero E, Trotta A, Zanotta S, Pucci L, Longo N, Perdonà S, Pignata S, Castello G, Scala S., *Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor*, 2013.*BJU Int*,112(5):686–96.. doi: 10.1111/bju.12068.

Posch F, Silina K, Leibl S, Mundlein A, Moch H, Siebenhuner A, Samaras P, Riedl J, Stotz M, Szkandera J, Stoger H, Pichler M, Stupp R, van den Broek M, Schraml P, Gerger A, Petrausch U, Winder T , *Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer.*, 2018. *Oncoimmunology*,7(2):e1378844. doi:10.1080/2162402X.2017.1378844.

Ramsey DM, McAlpine SR, *Halting metastasis through CXCR4 inhibition.*, 2013.*Bioorg Med Chem Lett*,23(1):20-25. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.10.138.

Ranpura V, Hapani S, Wu S, *Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*, 2011.*JAMA*,305(5):487–494. doi: 10.1001/jama.2011.51..

Rosen P.P.: Rosen P.P., *Rosen's Breast Pathology*, 2014

Roy DM, Walsh LA, *Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors*, 2014.*Breast Cancer*,6(0):81-91. doi: 10.2147/BCTT.S46020.

Schnitt and Collins: S. Schnitt, L. Collins, *Biopsy Interpretation of the Breast*, 2018

- Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, Wienert S, Van den Eynden G, Baehner FL, Penault-Llorca F, Perez EA, Thompson EA, Symmans WF, Richardson AL, Brock J, Criscitiello C, Bailey H, Ignatiadis M, Floris G, Sparano J, Kos Z, Nielsen T, Rimm DL, Allison KH, Reis-Filho JS, Loibl S, Sotiriou C, Viale G, Badve S, Adams S, Willard-Gallo K, Loi S, The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group, 2015. *Ann Oncol.*,26(2):259–71. doi: 10.1093/annonc/mdu450.
- Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Dieu-Nosjean MC, Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention, 2016. *Front Immunol*,7(407):. doi:10.3389/fimmu.2016.00407.
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im SA, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Trial Investigators., Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer., 2018. *N Engl J Med*,379(22):2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ, Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, 2011. *Science*,331(6024):1565–1570. doi: 10.1126/science.1203486.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ., Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion, 2011. *Science*,331(6024):1565–70. doi: 10.1126/science.1203486 .
- Schumacher TN, Schreiber RD, Neoantigens in cancer immunotherapy., 2015. *Science*,348(6230):69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971 .
- Schweiger T, Berghoff AS, Glogner C, Glueck O, Rajky O, Traxler D, Birner P, Preusser M, Klepetko W, Hoetzenecker K, Tumor-infiltrating lymphocyte subsets and tertiary lymphoid structures in pulmonary metastases from colorectal cancer., 2016. *Clin Exp Metastasis*,33(7):727-739. doi:10.1007/s10585-016-9813-y.
- Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, Willimsky G, Ammirante M, Strasner A, Hansel DE, Jamieson C, Kane CJ, Klatter T, Birner P, Kenner L, Karin M , Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy., 2015. *Nature*,521(7550):94-98. doi:10.1038/nature14395.
- Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, Willimsky G, Ammirante M, Strasner A, Hansel DE, Jamieson C, Kane CJ, Klatter T, Birner P, Kenner L, Karin M , Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy., 2015. *Nature*,521(7550):94-98. doi:10.1038/nature14395.
- Sharpe K, Stewart GD, Mackay A, Van Neste C, Rofe C, Berney D, Kayani I, Bex A, Wan E, O'Mahony FC, O'Donnell M, Chowdhury S, Doshi R, Ho-Yen C, Gerlinger M, Baker D, Smith N, Davies B, Sahdev A, Boleti E, De Meyer T, Van Criekinge W, Beltran L, Lu YJ, Harrison DJ, Reynolds AR, Powles T., The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer, 2013. *Clin Cancer Res*,19(24):6924–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1631.
- Shukla SA, Rooney MS, Rajasagi M, Tiao G, Dixon PM, Lawrence MS, Stevens J, Lane WJ, Dellagatta JL, Steelman S, Sougnez C, Cibulskis K, Kiezun A, Hacohen N, Brusic V, Wu CJ, Getz G, Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes, 2015. *Nat Biotechnol*,33(11):1152-58. doi: 10.1038/nbt.3344.
- Sloan EK, Ciocca DR, Pouliot N, Natoli A, Re-stall C, Henderson MA, Fanelli MA, Cuello-Carrion FD, Gago FE, Anderson RL, Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer, 2009. *Am J Pathol*,174(6):2035–2043. doi:10.2353/ajpath.2009.080924.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P., Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation., 2009. *J Leukoc Biol.*,86(5):1065-73. doi: 10.1189/jlb.0609385.

- Setting of Triple-Negative Breast Cancer, 2017. *Cancer Res Treat*,49(2):399–407. doi: 10.4143/crt.2016.215.
- Soysal SD, TZankov A, Muenst S.E, Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer, 2015. *Pathobiology*,82(3-4):142-152. doi: 10.1159/000430499.
- Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M, Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling, 2011. *Nature*,470():548–553. doi: 10.1038/nature09707.
- Tang X, Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer., 2013. *Cancer Lett*,332(1):3-10. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.024.
- Tanjore H, Kalluri R, The role of type IV col-lagen and basement membranes in cancer progression and metastasis, 2006. *Am J Pathol*,168():715-717. doi: 10.2353/ajpath.2006.051321.
- Testut L: Testut L, Jacob O.1967 *Seconda Edizione*
- Vingiani A, Viale G (2017): Vingiani A, Viale G , *The Pathology Report*, 2017
- Vorherr H.: Vorherr Helmuth, *The Breast. Morphology, physiology and lactation*, 1974
- Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH, Liu C, Kovatich AJ, Schwartz GF, Pestell RG, Sotgia F, Rui H, Lisanti MP, Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer, 2009. *Cancer Biol Ther*,8(11):1071–1079. doi:10.4161/cbt.8.11.8874.
- Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet Moreno B, Mezzadra R, Chmielowski B, Ruchalski K, Shintaku IP, Sanchez PJ, Puig-Saus C, Cherry G, Seja E, Kong X, Pang J, Berent-Maoz B, Comin-Anduix B, Graeber TG, Tumeh PC, Schumacher TN, Lo RS, Ribas A. , Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma, 2016. *N Engl J Med*,375(9):819–29. doi: 10.1056/NEJMoa1604958.
- Zhang Y, Cheng S, Zhang M, Zhen L, Pang D, Zhang Q, Li Z, High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer, 2013. *PLoS One*,8():e76147. doi: 10.1189/jlb.0609385.
- Zhang Z, Ni C, Chen W, Wu P, Wang Z, Yin J, Huang J, Qiu F, Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis, 2014. *BMC Cancer*,14(49)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigen-Presenting Cell
aTLS	Adjacent tertiary lymphoid structure
BCa	Breast Cancer
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
CRC	Colorectal Cancer
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4
CTLs	Cytotoxic T Cell
DAP	Diaminobenzidine
DCs	Dendritic Cell
DFS	Disease-Free Survival
dTLS	Distal Tertiary Lymphoid Structure
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ER	Estrogen Receptors
FCIS	Favorable Combined Immune Signatures
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HH	High/High
HL	High/Low
HEV	High Endothelial Venule
HR	Hazard Ratio
IBCa	Infiltrative Breast Cancer
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IM	Invasive Margin
LH	Low/High
LL	Low/Low
LN	Lymph Node
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
mRNA	Messenger RNA
NK	Natural Killer
OS	Overall Survival
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PD-L1	Programmed cell Death-Ligand 1
PR	Progesteron Receptors
RFCIS	Reinforced Favorable Combined Immune Signature
RNA	Ribonucleic Acid
RUCIS	Reinforced Unfavorable Combined Immune Signature
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
SLO	Secondary lymphoid organ
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TC	Tumor Center
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TILs	Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TLS	Tertiary Lymphoid Structures
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
Treg	T Regulatory cells
UCIS	Unfavorable Combined Immune Signatures
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΣΚΟΠΟΣ: Οι νεοπλασματικοί όγκοι και το μικροπεριβάλλον τους αντιπροσωπεύουν οργανωμένα «οικοσυστήματα», όπου κύτταρα του όγκου και του ανοσοποιητικού συστήματος των διαφορετικών χωροταξικών διαμερισμάτων (κέντρο όγκου - TC & διηθητικό μέτωπο - IM) βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση που είναι καθοριστική για την εξέλιξη του και την κλινική έκβαση των ασθενών. Στον καρκίνο του μαστού έχουν πλημμυρώς μελετηθεί η χωροταξική κατανομή των διαφόρων ανοσολογικών κυττάρων και η σημασία της παρουσίας και του αριθμού των περινεοπλασματικών Τριτογενών Λεμφοειδών Δομών σε σχέση με την πρόοδο της νόσου. Οι τελευταίες δομές, ορίζονται ως λεμφοειδείς αθροίσεις με μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά Δευτερογενών Λεμφοειδών Οργάνων. Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας των κυτταρικών πυκνοτήτων των CD8⁺ και CD163⁺ ανοσολογικών κυττάρων στα διαμερίσματα του όγκου αλλά και των περινεοπλασματικών TLS, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τα παραπάνω.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Κατά την ιστολογική αξιολόγηση 167 ασθενών με επιβεβαιωμένο διηθητικό BCa, πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με (CD4, CD8, CD163, FoxP3) σε κεντρική τομή του όγκου και ελήφθησαν μικροφωτογραφίες από το κέντρο και το διηθητικό μέτωπο του όγκου από κάθε ανοσοϊστοχημικώς κεχρωσμένο πλακίδιο. Επίσης πραγματοποιήθηκε η καταμέτρηση των TLS κατά την περιφέρεια των νεοπλασματικών όγκων (σε απόσταση έως 5 χιλιοστά από το IM). Η κλινική παρακολούθηση ήταν διαθέσιμη για 112 από τους ασθενείς αυτούς. Η κυτταρική πυκνότητα των CD8⁺ και CD163⁺ υπολογίστηκε με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικού ελέγχου, μικροφωτογραφιών και λογισμικού (particle analysis του ImageJ). Η παρουσία και ο αριθμός των TLS στις τομές A&H με επικουρική χρήση ανοσοϊστοχημείας στις αμφίσημες περιπτώσεις. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το IBM SPSS Statistics 24.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Τα αποτελέσματα των μετρήσεων υπέδειξαν πως η συνδυασμένη αξιολόγηση των κυτταρικών πυκνοτήτων των CD8⁺ και CD163⁺ ανοσολογικών κυττάρων που διηθούν τα διαμερίσματα του όγκου (TC και IM) μπορούν να βελτιώσουν την ακρίβεια της πρόβλεψης στην πρόοδο της νόσου (OS και DFS). Η παρουσία CD8⁺ αυξημένων κυτταρικών πυκνοτήτων στο κέντρο του όγκου και μειωμένων στο διηθητικό μέτωπο ή/και χαμηλών CD163⁺ συγκεντρώσεων στο κέντρο του όγκου και υψηλών στο κυτταρικό μέτωπο σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση ενώ, μια αντίστροφη ανοσολογική κυτταρική κατανομή με δυσμενή. Όσον αφορά την παρουσία και τον αριθμό των περινεοπλασματικών TLS η απουσία των τελευταίων συσχετίστηκε με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερου νόσου (DFS) και συνολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με ασθενείς στους οποίους ανευρέθηκαν TLS, και αυτή η αρνητική συσχέτιση παρατηρείται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα, πέραν της παρουσίας, πολύ σημαντικός είναι κι ο αριθμός των TLS για την πρόγνωση δεδομένου ότι οι ασθενείς με περισσότερα TLS παρουσίασαν

δυσμενέστερη πρόγνωση. Συνδυάζοντας τις ποσοτικές μετρήσεις των TLS με τις ανοσολογικές υπογραφές (όπως αυτές προέκυψαν από την κατανομή των CD8+ & CD163+ υποπληθυσμών στο TC και στο IM) δημιουργήθηκαν δυο συνδυαστικές ανοσολογικές υπογραφές με βελτιωμένη προγνωστική αξία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Τα αποτελέσματα που απορρέουν από αυτήν τη διατριβή επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μιας δυναμικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους ανοσολογικούς κυτταρικούς υποπληθυσμούς (CD8+ και CD163+) των διαφορετικών διαμερισμάτων του όγκου και των περινεοπλασματικών - TLS, η οποία φαίνεται να επηρεάζει την κλινική έκβαση ασθενών με BCa.

SUMMARY

Background: Tumors and their surrounding area represent spatially organized “ecosystems”, where tumor cells and the immune contextures of the different compartments are in a dynamic interplay. Tumor immune-cell infiltration is progressively becoming an important aspect for tumor characterization and clinical outcome prediction of cancer patients. Little has been done to evaluate the importance of diverse compartmental immune cell distribution in breast cancer (BCa) nor to assess the presence and number of Tertiary Lymphoid Structures that may surround each tumor. The latter are lymph-node-like structures sharing architectural and functional characteristics with secondary lymphoid organs and are often detected in the tumor microenvironment. Their presence has been associated with controversial clinical outcomes. The scope of this thesis is to clarify their relation with prognosis in BCa patients alone and in combination with tumoral immune infiltrates.

Methods: Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue samples from 167 BCa patients, with invasive ductal, non-metastatic BCa, not treated with neoadjuvant chemotherapy, have been used to detect and quantify the presence immune cell infiltrates in the diverse tumor compartments (Tumor center-TC, Infiltrative margin -IM). Tumor tissue was stained with (CD4, CD8, CD163, FoxP3) immunostains and photographed in multiple locations inside the tumor center and along its infiltrative margin. TLS assessment was also performed. The latter were identified morphologically as ovoid lymphocytic aggregates presenting a germinal center and/or high endothelial venules. Subsequently those were counted and furthermore characterized as adjacent (aTLS, within the tumor IM) or as distal (dTLS, ≤ 5 mm from the IM within the non-neoplastic tissue). Clinical follow-up was available for 112 of these patients. The cellular densities of CD8⁺ and CD163⁺ were calculated by means of immunohistochemical stains, microphotographs and image analysis software (ImageJ - particle analysis). The presence and number of TLS was performed mainly in H&E slides with the occasional auxiliary use of immunohistochemical stains in ambiguous cases. Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 24.

Results: The results indicated that the combined assessment of CD8⁺ and CD163⁺ immune cell densities infiltrating diverse tumor compartments (TC and IM) may enhance the prognostic accuracy of disease progress (DFS and OS). The presence of increased CD8⁺ cellular densities inside the tumor center and decreased along the infiltrative border and/or the decreased cellular densities of CD163⁺ in tumor center and increased in periphery seem to be related with favorable prognosis whilst the opposite immune cell distributions with unfavorable prognosis. Regarding the assessment of peritumoral TLS, their absence was associated with longer DFS and OS. Moreover, not only the presence of peritumoral TLS, but also their density has been proven to be prognostically crucial, since patients with numerous peritumoral TLS exhibited worst DFS and OS.

By combining quantitative peritumoral TLS measurements with the differential combined immunological cellular densities of CD8+ and CD163+ in the diverse cellular compartments (TC and IM), two immunological signatures with reinforced prognostic significance (RFCIS&RUCIS) were created which offered increased prognostic significance.

Conclusions: The results of the current thesis demonstrate for the first time an association between spatial differential densities of intratumoral immune infiltrates with peritumoral TLS and clinical outcomes which seems to influence DFS and OS. The observations further support the existence and importance of a dynamic interplay between the immune cells within the tumor microenvironment (TC,IM) and its surrounding counterpart (TLS).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer



Sotirios P. Fortis^{1†}, Michael Sofopoulos^{2†}, Nectaria N. Sotiriadou², Christoforos Haritos¹, Christoforos K. Vaxevanis¹, Eleftheria A. Anastasopoulou¹, Nicole Janssen³, Niki Arnogiannaki², Alexandros Ardavanis⁴, Graham Pawelec³, Sonia A. Perez^{1†*} and Constantin N. Baxevanis^{1†}

Abstract

Background: Tumor immune cell infiltrates are essential in hindering cancer progression and may complement the TNM classification. CD8+ and CD163+ cells have prognostic impact in breast cancer but their spatial heterogeneity has not been extensively explored in this type of cancer. Here, their potential as prognostic biomarkers was evaluated, depending on their combined densities in the tumor center (TC) and the tumor invasive margin (IM).

Methods: CD8+ and CD163+ cells were quantified by immunohistochemistry of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples from a cohort totaling 162 patients with histologically-confirmed primary invasive non-metastatic ductal breast cancer diagnosed between 2000 and 2015. Clinical follow-up (median 6.9 years) was available for 97 of these patients.

Results: Differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the combined TC and IM compartments (i.e., high(H)/low(L), respectively for CD8+ cells and the reverse L/H combination for CD163+ cells) were found to have significant prognostic value for survival, and allowed better patient stratification than TNM stage, tumor size, lymph node invasion and histological grade. The combined evaluation of CD8+ and CD163+ cell densities jointly in TC and IM further improves prediction of clinical outcomes based on disease-free and overall survival. Patients having the favorable immune signatures had favorable clinical outcomes despite poor clinicopathological parameters.

Conclusions: Given the important roles of CD8+ and CD163+ cells in regulating opposing immune circuits, adding an assessment of their differential densities to the prognostic biomarker armamentarium in breast cancer would be valuable. Larger validation studies are necessary to confirm these findings.

Trial registrations: Study code: IRB-ID 6079/448/10-6-13

Date of approval: 10/06/2013

Retrospective study (2000–2010)

First patient prospectively enrolled 14/2/2014

Keywords: Breast cancer, Tumor infiltration, CD8, CD163, Immunoscoring, Prognostic signature

* Correspondence: perez@cic.gr

[†]Equal contributors

¹Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Breast cancer (BCa) is the most common malignancy in women worldwide and is the second leading cause of female cancer deaths [1]. Although systemic therapies have increased survival rates for BCa patients, still there is considerable variation in response rates among patients with distinct clinicopathological parameters which encourages the search for novel prognostic factors contributing to the development of novel treatment options across the different molecular subtypes of BCa. Recent advances in the field of oncoimmunology imply that patients' pre-existing tumor-specific immunity in the form of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) has a substantial effect on disease progression, thus functioning as potential prognostic biomarkers [2]. Particularly, in colorectal cancer, the type, density and location of TILs (i.e., the "immunoscore") has been proposed as a more reliable prognostic biomarker than the standard AJCC/UICC TNM-classification [3]. Moreover, results from clinical trials have reported that a robust "immunoscore" predicts responses to therapies, which suggests that the adaptive immune response intratumorally may also function as a predictive biomarker [4].

CD8⁺ T cells comprise an essential component of the cellular immune system and are indispensable for cell-mediated antitumor immune responses. The presence of CD8⁺ T-cells in the tumor microenvironment of BCa patients is associated with favorable outcomes in certain molecular subtypes [5]. CD8 is also expressed on a subset of NK cells [6] and a small subpopulation of iNKT cells [7], although their possible presence among CD8⁺ TILs has not been evaluated. CD163 is a scavenger receptor upregulated by tumor-associated M2 macrophages in an anti-inflammatory tumor microenvironment. CD163 has also been detected in some cancer cells; however these cells are considered as the result of fusion between macrophages and cancer cells [8, 9]. In human malignancies [10], also including BCa [11], the presence of CD163⁺ M2 macrophages in the tumor stroma correlated with poor overall survival, while contrasting data have been reported for colorectal cancer [12]. In a recent study, localization of CD163⁺ cells in the tumor stroma, but not the tumor nest was shown to be of clinical relevance for patients with BCa [13]. In contrast, there are studies of BCa patients with different molecular subtypes showing that both stromal as well as intratumoral TILs are equally predictive for clinical outcome [14, 15].

Notwithstanding the general consensus that TILs have a prognostic value in BCa, there remain several issues which hinder their broad application as biomarkers in the routine setting. These include the identification of

immune cell populations with the most clinical relevance, their distribution in specific tumor regions and the mode of their evaluation (separate or combined) [16, 17]. Spatial distribution of immune cells in the tumor microenvironment is clinically important, as not only their densities and functions, but also their localization in the different tumor compartments has been associated with clinical outcome [18–21]. Moreover, tumor infiltration by immune cells is a dynamic process with TILs migrating to distinct tumor areas depending on tumor growth properties and factors released by the tumor and cells of the tumor stroma. This heterogeneity suggests that their separate and combined evaluation in well-defined tumor regions would be valuable [14, 20]. To this end, Pagès et al. [22] reported that a combined assessment of the memory (CD45RO⁺) and cytotoxic phenotypes in TC and IM could increase the accuracy of prediction of clinical outcome for different patient groups in colorectal cancer. However, in evaluations of immune infiltration in BCa, to the best of our knowledge there have been no reports on the differential distribution of immune cells in these tumor compartments and their combined evaluation as reliable prognostic/predictive biomarkers. Most recently, Miyan et al. [23] developed a scoring system based on the differential densities of CD3⁺ and CD8⁺ in the TC and IM with the aim of distinguishing between different molecular subtypes of BCa, but they did not address the clinical relevance of such an immunoscore.

In the present study, we aimed to evaluate whether assessment of CD8⁺ and CD163⁺ cell densities in single or combined tumor regions (TC and IM) improves the prognostic value of immunoscore in BCa and allows refinement of conventional prognostic parameters.

Methods

Patient selection and characteristics

A total of 162 tissue samples were available from women with histologically-confirmed invasive BCa, diagnosed between 2000 and 2015. Patients with invasive ductal carcinoma were enrolled; patients with tumors directly extending to the chest wall and/or to the skin (ulceration or skin nodules), metastatic disease or bilateral BCa at diagnosis, prior history of any kind of malignant tumor, treatment with any type of neoadjuvant therapy, were excluded from the study. The study was approved by the Institutional Review Board of St. Savas Cancer Hospital (IRB-ID 6079/448/10-6-13).

Assessment of tumor-infiltrating leukocytes

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks were obtained from the archives of the St. Savas

Pathology Department. Hematoxylin-Eosin (HE)-stained slides were reviewed by two independent breast pathologists in order to select the most representative slide for each tumor. Sections (4–5 μm) were stained with either CD8 (SP16, 1:80; Thermo Scientific, USA), or CD163 (10D6, 1:400; Biocare). Staining by the antibodies was initially optimized on tonsil tissues (hyperplastic tonsil from tonsillectomy). Immunostaining was performed using the Leica Bond III automation (Leica Biosystems, Germany) and Leica detection kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). The protocol included 30-min high-pH epitope retrieval in the case of CD163 and a low-pH retrieval in the case of CD8, followed by 30 min incubation with the primary antibodies. Reactions were developed with the use of diaminobenzidine (DAB) and sections were counterstained with HE.

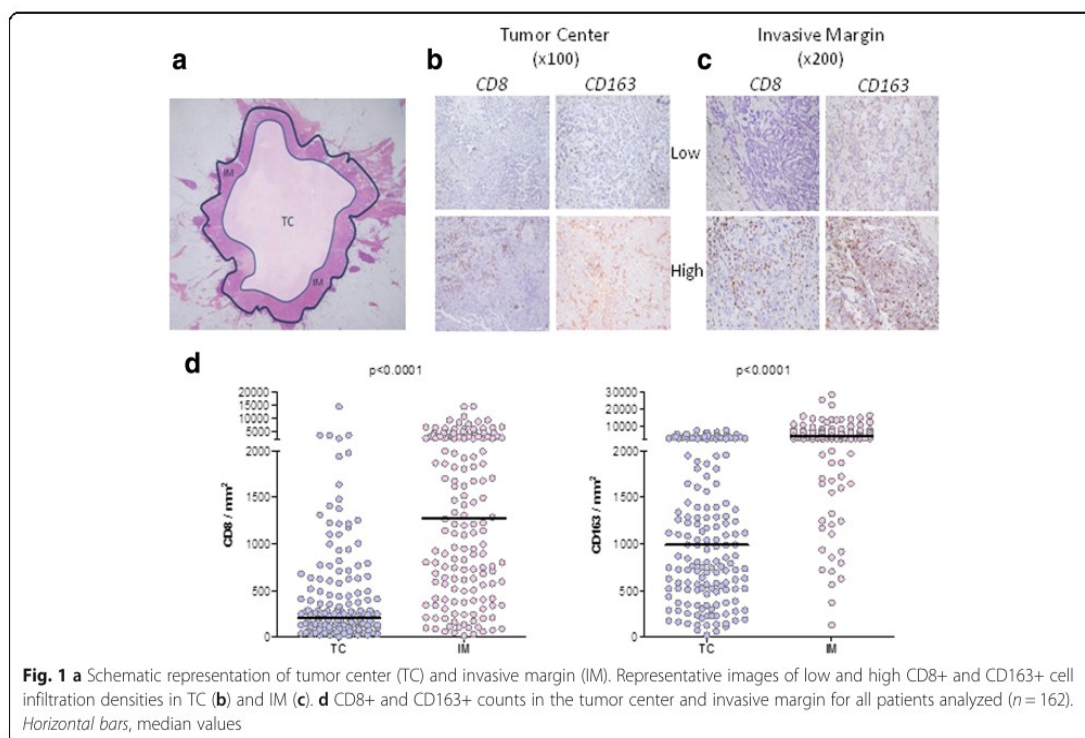
Microphotographs from each slide stained with CD8 and CD163 were captured at 12 M resolution (3840 × 3072 pixels) with a Nikon DXM-1200 Digital Eclipse Camera on a Nikon Eclipse E800 microscope with E Plan Achromat Objectives. The software used was Automatic Camera Tamer (ACT-1) Version 2. White balance was calibrated before image capture. The images were saved as JPG at 95% quality without any kind of image processing. Three photographs were captured from the central part (TC) of each tumor at ×100 magnification and three to six at higher magnification (×200), from the

tumor infiltrative margins (IM) (Fig. 1a). Representative images are presented in Fig. 1b and c).

The analysis of images and quantification of infiltrating cells was performed using Adobe Photoshop CS6 and ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Using Adobe Photoshop CS6 we picked the exact color(s) of positive cells for each marker and then converted the image to black-and-white. The images were analyzed with ImageJ software as the percentage of the surface covered by the specifically stained cells. For each infiltrating subpopulation, visual enumeration in ten representative samples was performed by two independent researchers. Finally, the surface coverage was converted to absolute numbers of infiltrating cells per mm². Median values of infiltrating cells obtained from all TC or IM photos for each patient were recorded and evaluated in further analyses.

Statistical analysis

Chi-square or Fisher’s exact test and Mann Whitney *t* test statistical analyses were performed by GraphPad Prism v.5.0 software. The same software was used for cumulative survival probabilities testing by Kaplan-Meier analysis with 95% confidence intervals (95%-CIs) and comparison using log rank and Gehan Breslow tests. Hazard ratios were determined using the Cox proportional hazards model. Forward stepwise selection was



used in order to exclude less significant covariates, leading to our final model. Multivariate analysis was performed using IBM SPSS statistics 22 software. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient characteristics

The clinicopathological characteristics of the 162 patients are presented in Table 1. Clinical follow-up data were available for 97 patients (diagnosed from 2000 to 2010), with a median follow-up period of 6.88 years (range: 0.11-10 years). Patients developing loco-regional recurrence or a second primary cancer were excluded from the clinical outcome analyses.

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients

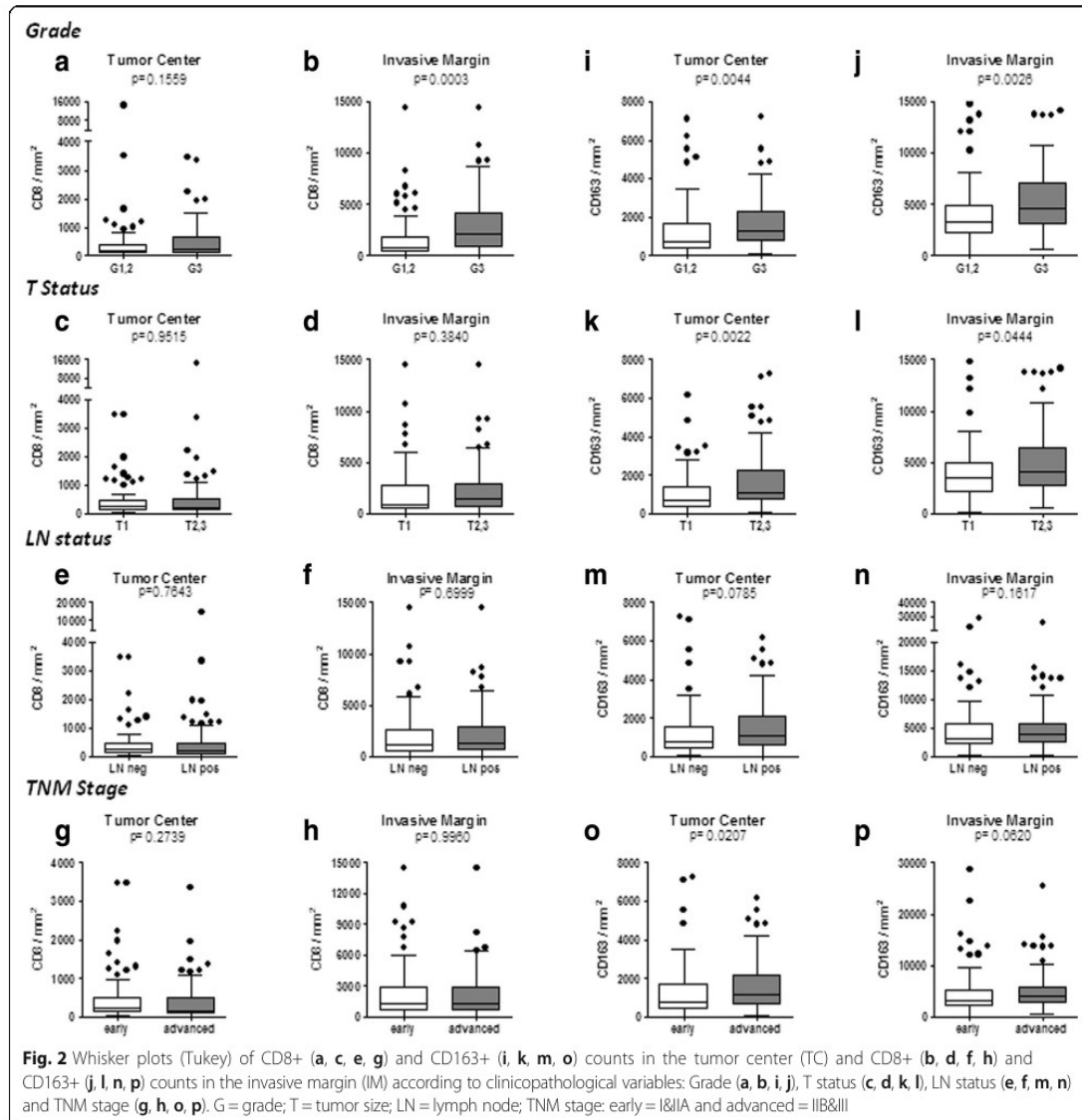
Total Number of Patients	
<i>n</i> = 162	
Median age (years)	Range
54	27–78
Tumor size	<i>n</i>
Tx	1
T1	70
T2	81
T3	10
LN status	<i>n</i>
N0	64
N1	56
N2	32
N3	10
AJCC stage (TNM)	<i>n</i>
I	45
IIA	38
IIB	34
IIIA	34
IIIB	χ ^a
IIIC	11
Grade	<i>n</i>
1	4
2	86
3	72
Hormone receptor	<i>n</i>
positive	127
negative	35
HER-2/neu	<i>n</i>
positive	41
negative	121

^aStage IIIB patients were not eligible

Density and intratumoral distribution of CD8+ and CD163+ immune cells in defined tumor regions in BCa patients: correlations with clinicopathological features and clinical outcome

Initially, we have counted separately CD8+ and CD163+ cells for both the TC and IM and found significant differences in their absolute numbers distributed within these compartments. On average, the IM contained higher numbers of both cell types than the TC. This was shown for the total patient population (Fig. 1d) as well as for patient subgroups stratified by grade (Fig. 2a, b, i, j), T status (Fig. 2c, d, k, l), node status (Fig. 2e, f, m, n) and TNM pathological stage (Fig. 2g, h, o, p). We also evaluated associations between absolute counts of CD8+ and CD163+ cells in TC and IM regions with the patients' histological grade, tumor size, lymph node status and pathological stage. The prevalence of CD8+ TILs was higher in poorly-differentiated (histological grade 3) vs grade 1,2 tumors both in TC (trend) and IM (highly significant) (Fig. 2a, b). No correlation was found between CD8+ infiltration and T, LN status or disease stage (Fig. 2c-h). Intratumoral CD163+ cell counts in TC and IM were also higher in patients with grade 3 tumors (Fig. 2i, j), with T2,3 stage (Fig. 2k, l) or with positive lymph nodes (Fig. 2m, n) and also in patients with more advanced disease (stages IIB, III) (Fig. 2o, p). These data indicate an association of high absolute numbers of CD163+ cells with a worse patient prognosis.

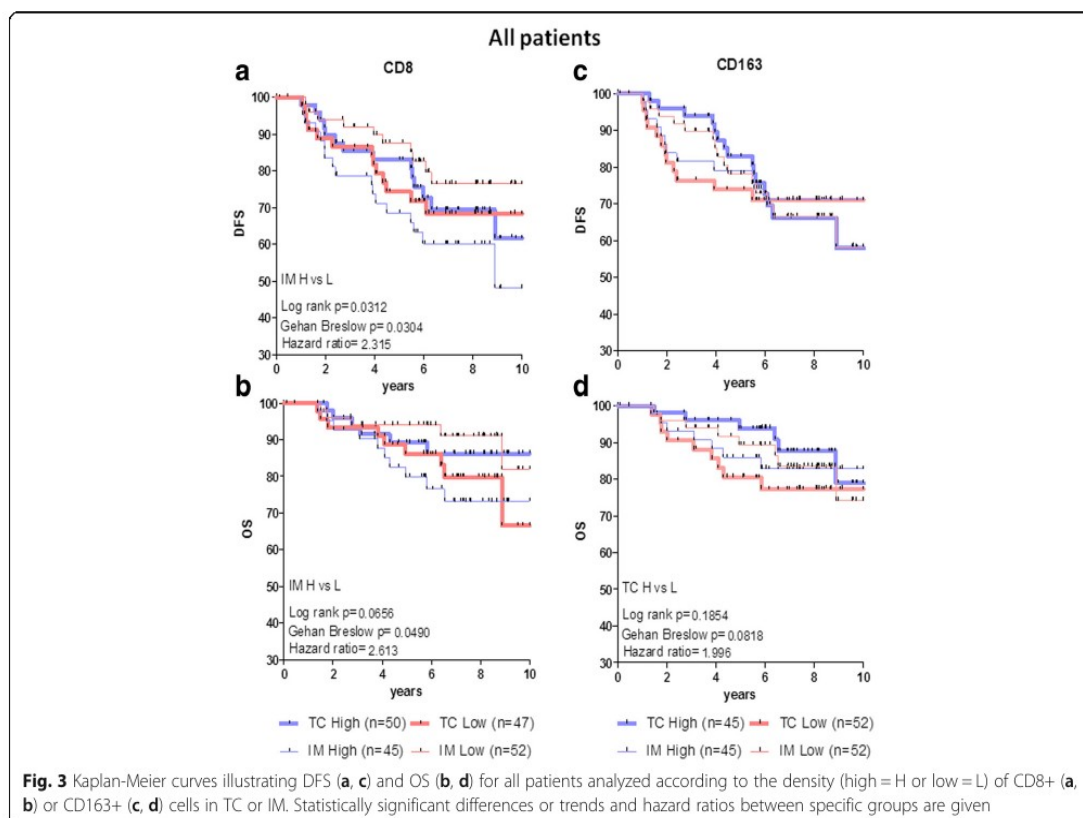
Next, we examined the association between CD8 or CD163 densities, separately in TC or IM, with clinical outcomes using the median value to delineate low (L) from high (H) density. Thus, we considered cell densities as L or H when these were below or above the median value for the respective subset from all tissues analyzed. Retrospective analyses in the total patient population with follow-up (*n* = 97), revealed that tumors from patients with longer DFS had significantly lower CD8+ immune cell densities within IM (CD8+ IM L), than tumors from patients who recurred more frequently (Fig. 3a). This latter group had high IM CD8+ cell densities (CD8+ IM H) and significantly reduced DFS (Fig. 3a). In contrast, no significant differences in DFS were found for patients with high or low CD8+ cell densities in the TC (Fig. 3a). There was a strong trend for improved OS in patients with CD8+ IM L vs CD8+ IM H which reached borderline significance by Gehan Breslow analysis (Fig. 3b). CD163+ cell densities in each tumor region (TC or IM) did not allow the stratification of patients into groups with statistically different DFS (Fig. 3c) or OS (Fig. 3d). We also assessed the association of CD8+ and CD163+ cell densities with DFS and OS in subgroups of patients stratified by clinicopathological variables. Kaplan-Meier curves for both DFS and OS showed strong trends for or even significantly better



clinical outcomes among groups of patients with favorable vs poor standard clinicopathological parameters (Additional file 1: Figure S1). However, these differences in recurrences and survival were based on the standard TNM staging regardless of the immune cell densities in the different tumor regions, because neither CD8+ nor CD163+ cell densities either in TC or IM had a significant prognostic value when examined separately (Additional file 1: Figures S2–S5). These data suggest that separate analyses of either CD8+ or CD163+ cell densities in single tumor regions are not useful prognostic biomarkers for tumor recurrence and survival in patients with early or advanced BCa.

Assessment of CD8+ or CD163+ cell densities in the combined tumor regions

Previous reports [18, 22] showed the usefulness of an immune score that is based on the evaluation of TILs in combined tumor regions (TC and IM) for the accurate prediction of tumor recurrence and survival in early stage patients with colorectal cancer. Based on this concept, we investigated whether the analysis of CD8+ and CD163+ cell densities combined in TC and IM could improve the prediction of risk for recurrence or survival also in BCa. For the CD8 marker, the combined analysis of TC plus IM regions with high density in TC and low density in IM (CD8+ HL)



versus the reverse combination (low density in TC and high density in IM (CD8+ LH)) allowed a more accurate discrimination for both DFS and OS for the different patient groups; patients with CD8+ HL had a better prognosis than CD8+ LH patients (Fig. 4a, b). In contrast, low CD163+ cell densities in TC combined with high densities in the IM (i.e., CD163+ LH) versus the inverse CD163+ HL, were correlated with strong trends for improved clinical outcome (both DFS and OS; Fig. 4c, d).

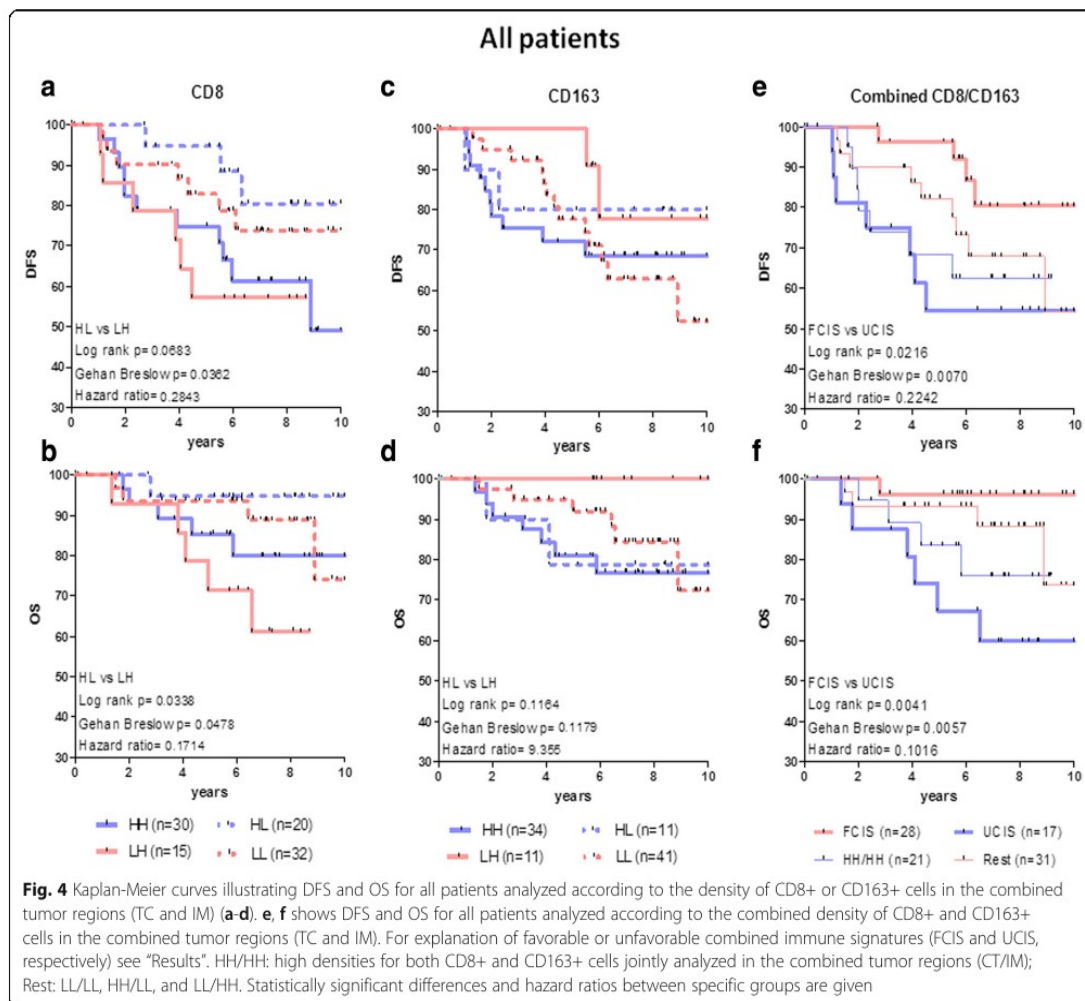
Joint assessment of CD8+ and CD163+ cell densities in the combined tumor regions

The data thus far show that the differential distribution of each immunologic cell marker (CD8+ or CD163+) in the combined tumor regions has a potential prognostic value for both DFS and OS as clinical endpoints. Next, we determined whether a combined evaluation of spatial distribution of CD8+ and CD163+ cell densities in TC and IM could increase the prognostic power for clinical outcome. This type of analyses compared patients with favorable CD8+ HL or CD163+ LH cell densities or both (assigned as the group with the favorable combined immune signatures (FCIS)) and patients having tumors with unfavorable CD8+ LH densities (excluding concomitant CD163+ LH

densities) or unfavorable CD163+ HL densities (excluding concomitant CD8+ HL densities), or both. This latter group was assigned as having the unfavorable combined immune signatures (UCIS). We found a more profound discrimination which was highly significant for both DFS and OS among patients having the FCIS versus those who had the UCIS. The estimated 5-year rates for both DFS and OS for patients with the FCIS was 96.3% compared to 54.5% DFS and 67.3% OS rates for those having the UCIS (Fig. 4e, f). Also in this type of analyses, the homogeneous distribution in both tumor regions (i.e., combined CD8+/CD163+ high and/or low cell densities in both TC and IM; HH/HH, LL/LL, HH/LL and LL/HH), could not significantly discriminate for DFS or OS (Fig. 4e, f). In fact, the LL/LL, HH/LL and LL/HH signatures showed a similar trend for improved clinical outcomes, albeit inferior to the FCIS; they were therefore grouped together as the “rest”.

CD8+ and CD163+ intratumoral cell densities and their correlation with clinical outcome in BCa patients stratified by clinicopathological characteristics

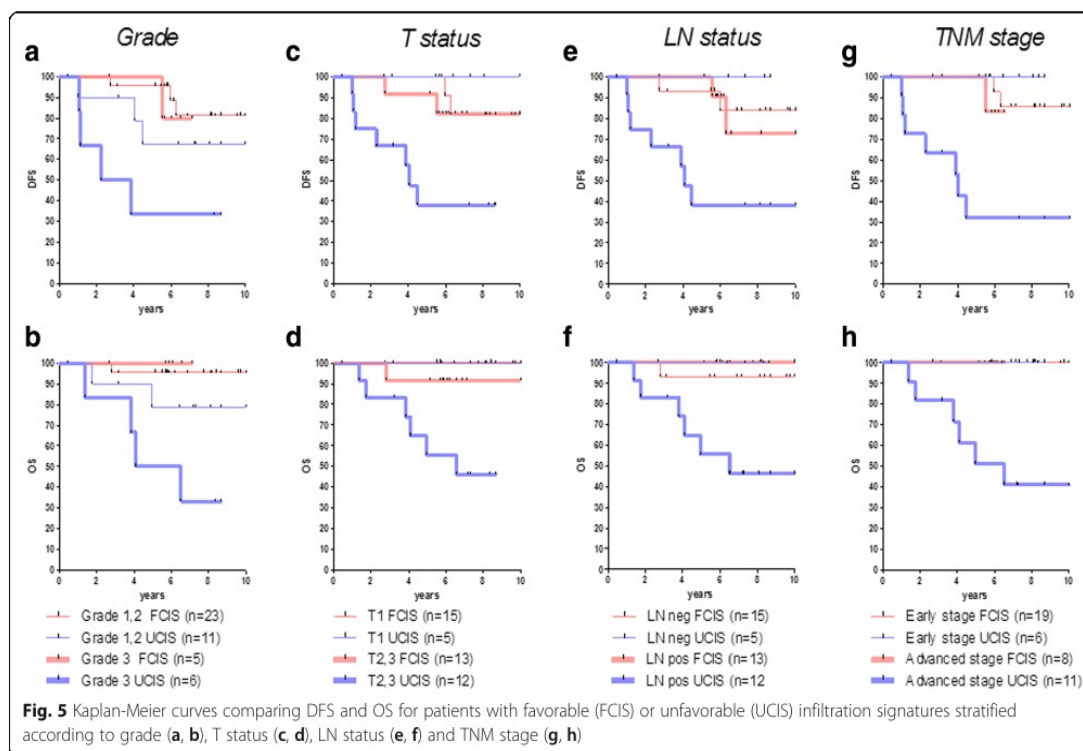
We focused subsequent analyses on CD8+ and CD163+ cells hypothesizing that this intratumoral immune signature could improve the prognostic impact of established



clinicopathological parameters. Assuming that the differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the combined tumor regions represent different levels of antitumor immunity, we sought to explore whether the favorable signatures, identified in the total patient population, could also have prognostic value for clinical outcome in subgroups of patients who were at high or low risk for recurrence according to standard clinicopathological parameters. For this, we evaluated the prognostic effect of the favorable CD8+ HL and CD163+ LH immune signatures after stratifying the patients by histological grade (Additional file 1: Figure S6A-D), T (Additional file 1: Figure S7A-D) and lymph-node (Additional file 1: Figure S8A-D) status and pathological stage (Additional file 1: Figure S9A-D). Similarly to what was observed for the total patient population, in all stratified groups patients with CD8 HL and patients with CD163 LH, indeed, exhibited better DFS and OS.

Because our results showed a strong association between combined differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the tumor compartments TC and IM (i.e., FCIS and UCIS) and clinical outcome in the total patient population (Fig. 4e, f), we also evaluated the prognostic significance of this immune signatures in the same patients stratified by clinicopathological parameters. We found that FCIS strongly correlated with a favorable prognosis regardless of poor standard clinicopathological parameters (Fig. 5a-h). Conversely, UCIS always correlated with a poor prognosis in these groups of patients (Fig. 5a-h and Table 2). Importantly, clinical outcomes (both DFS and OS) for patients with high risk of recurrence having the FCIS were almost indistinguishable from those observed in patients with more favorable clinicopathological parameters (i.e., grade 3 vs 1,2; T2,3 vs T1 status; node positive vs negative; and advanced vs early stage, respectively).

Further analyses within each group of patients with worse clinicopathological characteristics revealed that



the “rest” (i.e., LL/LL, LL/HH, HH/LL) and HH/HH immune signatures did not have a significant prognostic value for clinical outcome (Additional file 1: Figures S6E, F, S7E, F, S8E, F and S9E, F).

Inverse relationship between FCIS and state of disease

To better understand the relationship between the in situ immune reaction, as represented by the FCIS and UCIS, with the different histopathologic parameters, we analyzed the percentages of patients expressing these signatures at each histopathologic stage. In this analysis, we included all patients (total $n = 162$). We observed an inverse correlation

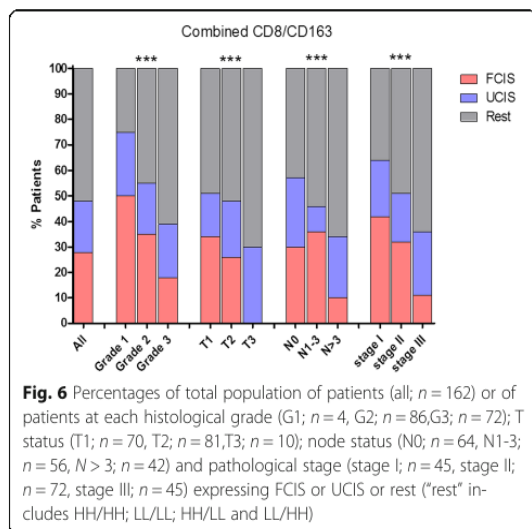
between the number of patients expressing the FCIS and tumor grade, T and nodal status and TNM stage (Fig. 6). In addition, there was a gradual decrease in the number of FCIS-positive patients from low to high grade tumors, T1 to T3, non-infiltrated with moderate-to-high infiltrated lymph-nodes and early-to-advanced stages (Fig. 6).

Multivariate analysis of patient DFS and OS according to clinicopathological parameters and combined immune signatures

Results from the multivariate analysis are presented in Table 3. We performed this analysis by initially including

Table 2 DFS and OS comparisons in stratified groups of patients with favorable and unfavorable signatures

Groups compared	DFS				OS			
	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p	Hazard Ratio	95% CI of ratio	Log rank p	Gehan Breslow p
Grade 3 FCIS vs UCIS	0.2095	0.03457 to 1.270	0.0891	0.0719	0.1438	0.01995 to 1.036	0.0543	0.0589
FCIS Grade 3 vs Grade 1,2	1.604	0.1247 to 20.63	0.717	0.6238	0.2931	0.001887 to 45.53	0.6336	0.6336
T2,3 status FCIS vs UCIS	0.1924	0.04993 to 0.7417	0.0167	0.0139	0.2015	0.04510 to 0.9000	0.0359	0.0462
FCIS T2,3 vs T1	1.684	0.2194 to 12.92	0.6162	0.3775	9.488	0.1837 to 490.0	0.2636	0.2636
LN pos FCIS vs UCIS	0.1865	0.04807 to 0.7233	0.0152	0.0054	0.1035	0.02048 to 0.5231	0.0061	0.0070
FCIS LN pos vs LN neg	1.375	0.1876 to 10.08	0.754	0.9229	0.1653	0.003201 to 8.537	0.3711	0.3711
Advanced stage FCIS vs UCIS	0.1854	0.04531 to 0.7587	0.0191	0.0155	0.1584	0.02981 to 0.8417	0.0306	0.0336
FCIS Adv. stage vs Early stage	3.369	0.1545 to 73.43	0.4399	0.2995	0	0 to 0	1	1



into (i) the current, well-established prognostic biomarkers used in breast cancer, i.e., age (patients below or above the 50 year threshold) and pathological parameters, including T status (1,2,3), nodal status (0–3), grade (1,2,3), as well as (ii) HER-2 status (positive or negative), hormone receptor (Estrogen and/or Progesterone) status (positive or negative) and (iii) our immune signatures (FCIS, rest, UCIS, as suggested by the Log-rank survival analyses). T status and hormone receptors status remained significantly associated with both DFS and OS, while grade and HER-2 status were associated only with

OS. HER-2 status did not associate with DFS. This result may be explained by the fact that a significant number of patients were diagnosed between 2000 and mid 2006, at which time trastuzumab was not yet the standard-of-care in the adjuvant setting for early stage BCa overexpressing HER-2. Interestingly, despite the small size of samples analyzed, the immune signatures were also significantly associated with DFS and OS. In order to decide on a first model, covariates of lower importance were excluded, using a forward stepwise selection method. As a result, T status, hormone receptors status and our immune signatures were deemed of high importance for DFS and OS.

Discussion

In the present study, we demonstrate that the combined evaluation of CD8+ or CD163+ immune cell densities in the tumor center and invasive margin allows better stratification and improves the prognostic value of TNM staging in BCa. Our data also suggest that the combined evaluation of CD8+ and CD163+ cell densities jointly in TC and IM could improve the accuracy of prediction for DFS and OS. Initially, focusing on the most common TIL population, the CD8+ cells, we observed maximum DFS and OS when high CD8+ densities in the TC were combined with low densities in the IM (i.e., HL). In contrast, the inverse combination (i.e., LH) was associated with significantly higher recurrence rates and reduced OS. This finding is challenging given that the most potent favorable immunoscore value in colorectal cancer combines high CD8+ densities both in TC and IM [18,

Table 3 Multivariate Cox proportional hazard analysis for DFS and OS of patients with non-metastatic invasive breast cancer

	DFS			OS		
	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)	Hazard Ratio	P	95.0% CI for HR (range)
Model before stepwise selection						
Age ^a	1.031	0.948	0.411–2.589	4.391	0.188	0.486–39.703
T status ^b	2.613	0.010	1.255–5.439	3.679	0.028	1.148–11.793
N stage ^b	1.222	0.512	0.671–2.225	1.125	0.815	0.420–3.010
Grade ^b	1.142	0.750	0.504–2.585	4.189	0.027	1.180–14.867
HER-2/neu	0.928	0.884	0.342–2.520	0.066	0.016	0.007–0.606
Hormone Receptors	0.277	0.004	0.277–0.669	0.168	0.007	0.046–0.621
Signatures ^b	2.063	0.041	1.031–4.126	4.850	0.014	1.374–17.122
Model after stepwise selection						
T status ^b	2.999	0.001	1.602–5.615	3.522	0.005	1.477–8.398
Hormone Receptors	0.269	0.002	0.116–0.621	0.231	0.014	0.072–0.742
Signatures ^b	2.146	0.027	1.091–4.219	4.273	0.006	1.521–11.999
TNM stage ^b	2.180	0.009	1.219–3.898	3.937	0.006	1.494–10.371
Signatures ^b	1.560	0.138	0.866–2.810	2.085	0.091	0.889–4.890

^aAge under 50 and over 50 years old

^bAll categorical covariates were transformed into numeric codes as follows : T status (T1; 1, T2; 2, T3; 3), N stage (N0; 0, N1; 1, N2; 2, N3; 3), Grade (G1; 1, G2; 2, G3; 3), Signatures (FCIS; 1, Rest; 2, UCIS; 3) TNM stage (I; 1, II; 2, III)

22]. We also aimed to investigate whether the localization of macrophages in primary BCa could be of clinical relevance. CD163 represents a marker expressed primarily by the anti-inflammatory (M2) subtypes of macrophages [24]. We detected higher numbers of CD163+ than CD8+ cells in both tumor regions, consistent with the increased influx of TAMs in breast tumors [24]. In agreement with a recent report [13], we found that CD163+ cells in TC positively correlated with poor clinicopathological features, emphasizing the importance of analyzing densities of these cells locally as a prognostic factor. However, in line with our CD8+ cell scoring, we found that evaluation of CD163+ cell densities in single regions did not strongly associate with DFS or OS. Nonetheless, combined analyses indicated a favorable clinical outcome in patients having low CD163+ cell densities in TC combined with high densities in the IM. Interestingly, the poorest prognostic impact was noticed among patients whose tumors' compartments were inversely infiltrated by CD163+ cells, namely with high TC vs low IM densities.

Presently it is not clear what may cause such differential distributions among tumor compartments. Given the interrelationship between tumor biology features and immune reactions we may hypothesize that depending on locally tumor-secreted inflammatory molecules, immune cells may accumulate at distinct areas within the tumor microenvironment. Such a compartmentalization may then influence the functional status of these immune cells as this has been shown for intratumoral DCs with pro- and anti-tumor properties [25–27]. In an analogous fashion, various chemokines have been shown to selectively attract CD8+ cells at different tumor compartments [28–34], suggesting that the location of the various TIL populations is a dynamic process with pro- or antitumor effects, depending on tumor biology reflecting the stage of disease, which associates with clinical outcome in different malignancies, including BCa [23, 25, 35]. In the same lines, we show herein that cells with opposing functions (i.e., CD8+ and CD163+ cells) in distinct tumor regions and at differential densities have significant predictive roles; yet, at present it is not known whether their location in either compartment is due to migratory processes induced by locally secreted factors or architectural (contextual) barriers capturing these cells in the tumor compartments [14].

We also determined that such favorable immune cell differential densities were correlated with improved clinical outcomes in groups of patients with otherwise poor clinicopathological variables (i.e., advanced stage, large tumors, high grade and positive lymph nodes) which were comparable to those for patients with good prognosis according to standard clinicopathological criteria (i.e., early pathological stage,

low volume tumors and histologic grade and negative lymph nodes).

From a theoretical point of view, our results suggest that by the time human BCa become clinically detectable (i.e., the escape phase of immunoeediting), the adaptive immune response is still active playing a significant role in delaying tumor progression. This may not be quite compatible with the immunoeediting theory [36], given that the beneficial effect of adaptive immunity may persist throughout tumor progression, as we show here for BCa patients with more advanced disease having similar DFS and OS with early stage patients provided they have a favorable immune signature. We may propose that our favorable immune signature slows down tumor growth rates, thus increasing OS. At this point we should mention that such pre-existing immunity may, to a certain degree, be directed towards neoantigens expressed by the tumor through the emergence of nonsynonymous somatic mutations [37]. Alternatively, the FCIS may contribute to a modification of tumor stroma and tumor cells in order to negatively influence angiogenesis and extravasation and in this way to influence tumor evolution and progression. Alterations in immune cell densities and function that may occur while disease is progressing could support tumor evasion from immunosurveillance. The underlying mechanisms for the so-called acquired immune resistance have been mostly attributed to epigenetic changes [35, 38] and most recently to upregulation of alternate immune checkpoints [39] as well as to the loss of nonsynonymous somatic mutations which leads to low densities or elimination of neoantigens [40]. However, also in this case the beneficial effect of intratumoral antitumor immunity may persist during tumor progression, attenuating the metastatic potential of the tumor and resulting in better clinical outcomes. Thus, intratumoral immune infiltrates may not only reflect pre-existing immunity but also the immune response to therapy. Therefore, it will be of great importance for decisions making in terms of patients' clinical management to know whether and to what level the patients' original immune status influences survival independently of therapy.

Because the primary tumor in our BCa population was removed by surgery, the prognostic value associated with the host intratumoral immune response may reflect the quantity and quality of circulating cytotoxic effectors recognizing and lysing tumor cells in peripheral blood, lymphoid tissues or other anatomical sites. It is, however, at present unknown whether a correlation exists between the immune phenotype of tumors and the responsiveness of peripheral immune cells to immune stimulation. Mortarini et al. [41] observed that the frequency of T regulatory cells at the tumor site, correlated with increased circulating levels of TGF β and decreased

responsiveness to IL-2 stimulation by peripheral T cells. In the same lines, we have demonstrated an inverse correlation between serum TGFβ levels with immunological T cell responses to a HER-2/neu hybrid peptide used to vaccinate prostate cancer patients [42]. This points to the need to test whether there is an interrelation between the status of activation of tumors and the behavior of circulating cells and to compare whether this drives the systemic alteration of immune function associated with the cancer bearing status. Identification of a correlation would allow functional assessment of tumors which consequently would predict prognosis by testing circulating cells. Such analyses may be useful for assessing the role of adaptive immune responses at the tumor site and the periphery as a continuum alongside with tumor evolution.

We also show here that the frequency of patients exhibiting the FCIS was decreased among groups with poor clinicopathological variables suggesting that favorable CD8+ and CD163+ cell densities inversely correlated with the TNM stage. We may propose that disease progression associates with a worsening of this antitumor immune response resulting in a gradually increasing immune escape. As also discussed above, even at this stage, the strength of the immune response could be an essential parameter for efficiently controlling tumor evolution.

We have shown that the differential densities and spatial distribution of CD8+ and CD163+ cells as described by the FCIS could identify patients with increased DFS or patients who lived longer despite the fact that these were in late tumor stages according to the TNM classification. This indicates that the FCIS, as defined here, constitutes a novel candidate-indicator beyond TNM staging to improve the prediction of clinical outcomes.

Conclusions

Our study is the first to reveal that differential densities of the same immune cell subpopulation infiltrating the primary tumor at the TC and IM may have opposing prognostic impacts in BCa. The FCIS defined herein predicts favorable clinical outcomes (both DFS and OS) across heterogeneous groups of patients with advanced stage disease, large tumors, invaded lymph nodes and high histological grade tumors, and complements the established robust standard prognostic parameters in BCa. Thus, by associating TNM-based classifications and combined intratumoral immune signatures, as shown here with the FCIS, we may provide preliminary evidence for defining new subgroups of patients with distinct prognosis.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. DFS and OS in patients according to standard clinicopathological variables. **Figures S2-S5.** DFS (A, C) and OS (B, D) for patients stratified by grade (Figure S2), T status (Figure S3), nodal status (Figure S4) and pathological TNM stage (Figure S5) and analyzed according to the density of CD8+ (A, B) or CD163+ (C, D) cells in TC or IM. **Figures S6-S9.** Kaplan-Meier curves illustrating DFS (A, C, E) and OS (B, D, E) for patients stratified by grade (Figure S6), T status (Figure S7), nodal status (Figure S8) and pathological TNM stage (Figure S9) and analyzed according to the density of CD8+ (A, B) or CD163+ (C, D) cells in the combined tumor regions and to the combined immune signatures (E, F). The statistics with significant differences or strong trends between groups and the corresponding hazard ratios are shown in the respective plots. (PDF 356 kb)

Abbreviations

BCa: Breast cancer; DCs: Dendritic cells; DFS: Disease free survival; FCIS: Favorable combined immune signature; FFPE: Formalin-fixed, paraffin-embedded; HE: Hematoxylin-eosin; HR: Hazard ratio; IL-2: Interleukin-2; IM: Invasive margin; iNKT: Invariant natural killer T; NK: Natural killer cell; OS: Overall survival; TAMs: Tumor-associated macrophages; TC: Tumor center; TGFβ: Transforming growth factor beta; TILs: Tumor-infiltrating lymphocytes; UCIS: Unfavorable combined immune signature

Funding

This study is supported by grant GER_1968 (ISPEBREAST) to CNB and GP from the bilateral Research and Technology Greek-German collaboration.

Availability of data and materials

The datasets during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. Paraffin embedded tissue blocks are not available. Immunohistochemistry slides and corresponding photographs are available upon request.

Authors' contributions

SPF and MS equally contributed to study design, data collection, analysis and interpretation of results and writing of the manuscript. NNS contributed to data collection and writing of the manuscript. CH, NA, AA were responsible for the collection of patients' material and clinical follow up. CV & EA contributed to data analysis and writing of the manuscript. NJ contributed to data collection and analysis. GP critically revised the manuscript. SAP and CNB equally made substantial contributions to conception and design, analysis, interpretation of data and writing the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the IRB of Saint Savas Cancer Hospital: Prospectively enrolled patients (2014–2015) signed an informed consent prior to be operated. Retrospectively analyzed patients, if presenting to give also blood sample (according to the study, data not included here) also signed the same informed consent. All other retrospectively analyzed patients (either informed by telephone call or deceased patients) were anonymized by the treating medical oncologist (AA) and the pathologists (NA and MS) and their clinical information was recorded in an anonymized database by the responsible medical doctor (CH).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece. ²Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece. ³Center for Medical Research, Eberhard-Karls Universität, Tübingen, Germany. ⁴First Medical Oncology Clinic, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece.

Received: 15 December 2016 Accepted: 6 April 2017

Published online: 18 April 2017

References

- Siegel R, et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9–29.
- Gooden MJ, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93–103.
- Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):261–7.
- Ingold Heppner B, Loibl S, Denkert C. Tumor-infiltrating lymphocytes: a promising biomarker in breast cancer. *Breast Care (Basel)*. 2016; 11(2):96–100.
- Ali HR, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1536–43.
- Addison EG, et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005;116(3):354–61.
- O'Reilly V, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28648.
- Shabo I, et al. Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction. *BMC Cancer*. 2015;15:922.
- Shabo I, et al. Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer*. 2008;123(4):780–6.
- Jensen TO, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(20):3330–7.
- Lee AH, et al. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*. 1997;50(8):669–73.
- Nagorsen D, et al. Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med*. 2007;5:62.
- Medrek C, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:306.
- Salgado R, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71.
- Savas P, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(4):228–41.
- Baker K, et al. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology*. 2011;58(7):1107–16.
- Denkert C, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):105–13.
- Galon J, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4.
- Issa-Nummer Y, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer—a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One*. 2013;8(12):e79775.
- Loi S, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02–98. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):860–7.
- Mahmoud SM, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949–55.
- Pages F, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5944–51.
- Miyan M, et al. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med*. 2016;14(1):227.
- Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett*. 2013;332(1):3–10.
- Figel AM, et al. Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *Am J Pathol*. 2011;179(1):436–51.
- Giraldo NA, et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):3031–40.
- Middel P, et al. Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2010;10:578.
- Becht E, et al. Immune contexture, immunoscore, and malignant cell molecular subgroups for prognostic and therapeutic classifications of cancers. *Adv Immunol*. 2016;130:95–190.
- Dannenmann SR, et al. Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2013;2(3):e23562.
- Elsasser-Beile U, et al. Different expression of Fas and Fas ligand in tumor infiltrating and peripheral lymphocytes of patients with renal cell carcinomas. *Anticancer Res*. 2003;23(1A):433–7.
- Fridman WH, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298–306.
- Oldham KA, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *Eur Urol*. 2012;61(2):385–94.
- Polimeno M, et al. Regulatory T cells, interleukin (IL)-6, IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL10, CXCL11, epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth factor (HGF) as surrogate markers of host immunity in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2013;112(5):686–96.
- Sharpe K, et al. The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6924–34.
- Zaretsky JM, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2016;375(9):819–29.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024):1565–70.
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 2015;348(6230):69–74.
- Shukla SA, et al. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat Biotechnol*. 2015;33(11):1152–8.
- Koyama S, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun*. 2016;7:10501.
- Anagnostou V, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2017;7(3):264–76.
- Mortarini R, et al. Impaired STAT phosphorylation in T cells from melanoma patients in response to IL-2: association with clinical stage. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4085–94.
- Perez SA, et al. Results from a phase I clinical study of the novel li-Key/HER-2/neu(776–790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(13):3495–506.



The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer

Michael Sofopoulos¹ · Sotirios P. Fortis² · Christoforos K. Vaxevanis² · Nectaria N. Sotiriadou¹ · Niki Arnogiannaki¹ · Alexandros Ardavanis³ · Dimitrios Vlachodimitropoulos⁴ · Sonia A. Perez² · Constantin N. Baxevanis²

Received: 29 May 2019 / Accepted: 29 September 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Tumors and their surrounding area represent spatially organized “ecosystems”, where tumor cells and the immune contextures of the different compartments are in a dynamic interplay, with potential clinical impact. Here, we aimed to investigate the prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures (TLS) either alone or jointly with the intratumoral densities and spatial distribution of CD8+ and CD163+ cells in breast cancer (BCa) patients. TLS were identified peritumorally, within the area distancing up to 5 mm from the infiltrative tumor border, counted and further characterized as adjacent or distal, in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue samples from a cohort of 167 patients, with histologically confirmed invasive ductal BCa. TLS and tumor-infiltrating immune cells were determined by H&E and immunohistochemistry. Clinical follow-up was available for 112 of these patients. Patients with peritumoral TLS exhibited worse disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) as compared to patients lacking TLS. Moreover, the density of peritumoral TLS was found to be crucial for prognosis, since patients with abundant TLS exhibited the worst DFS and OS. By combining the density of adjacent TLS (aTLS) with our recently published intratumoral signatures based on the differential distribution of CD8+ and CD163+ in the tumor center and invasive margin, we created two improved immune signatures with superior prognostic strength and higher patient population coverage. Our observations strengthen the notion for the fundamental role of the dynamic interplay between the immune cells within the tumor microenvironment (center/invasive margin) and the tumor surrounding area (peritumoral TLS) on the clinical outcome of BCa patients.

Keywords Breast cancer · Tertiary lymphoid structure · Tumor infiltration · Immune contexture · Prognostic signatures

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00262-019-02407-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Michael Sofopoulos and Sotirios P. Fortis equally contributed as first authors.

✉ Constantin N. Baxevanis
baxevanis@ciic.gr

¹ Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece

² Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, 171 Alexandras Avenue, 11522 Athens, Greece

³ First Medical Oncology Clinic, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece

⁴ Department of Forensic Medicine and Toxicology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Abbreviations

AJCC	American Joint Committee on Cancer
aTLS	Adjacent tertiary lymphoid structure
BCa	Breast cancer
DAB	Diaminobenzidine
DFS	Disease-free survival
dTLS	Distant tertiary lymphoid structure
FCIS	Favorable combined immune signature
FFPE	Formalin fixed, paraffin embedded
HEV	High endothelial venule
HH	High/high
HL	High/low
IM	Invasive margin
LH	Low/high
LL	Low/low
RFCIS	Reinforced favorable combined immune signature
RUCIS	Reinforced unfavorable combined immune signature

SLO	Secondary lymphoid organ
TC	Tumor center
TLS	Tertiary lymphoid structure
Treg	T regulatory cell
UCIS	Unfavorable combined immune signature

Introduction

During the last decades, cancer immunotherapy has evolved from a promising therapeutic modality to a robust clinical reality [1], switching from the traditional cell-centric cancer treatments to new holistic therapeutic approaches which consider both, the tumor microenvironment and immune contexture [2]. Studies from immunotherapy trials, using immune checkpoint inhibitors [3], have demonstrated profound clinical benefit in a proportion of patients with varied tumor types, although most patients do not respond to such therapies, highlighting the need for developing biomarkers to guide proper selection of patients. Given the established significance of patients' immune profile regarding tumor initiation, development, and response to therapies, many studies have investigated the impact of the complexity and diversity of the tumor microenvironment on clinical outcome [4, 5].

Tumor immune cell infiltration is progressively becoming an important aspect for clinical outcome prediction of cancer patients. Particularly, in colorectal cancer, the "Immunoscore", comprising an immune cell infiltration signature considering densities and location of CD3+ and CD8+ cells, has been proposed to be more informative than the standard AJCC/TNM staging [6]. In breast cancer, although a high degree of immune infiltration has been repeatedly reported to associate with survival benefit [7], the establishment of validated prognostic immune signatures in the distinct tumor compartments remains elusive. In our recent study, we have highlighted the importance of the differential spatial (tumor center; TC and invasive margin; IM) distributions of TIL subpopulations (CD8+ and CD163+), single or jointly analyzed, on clinical outcomes in breast cancer patients [8].

Besides the differential immune infiltrates in TC and IM, there is a "third level biomarker" that orchestrates the tumor immune microenvironment, namely the tertiary lymphoid structures (TLS) which can be found as intratumoral and peritumoral clusters of immune cells. TLS are lymph node-like structures that develop inside non-lymphoid organs, architecturally and functionally similar to secondary lymphoid organs (SLO) [9]. They are ovoid, mainly lymphocytic, aggregates that contain centrally an ill-defined B cell-rich area that may include a well-defined germinal center and a subtle network of follicular dendritic cells. This area is surrounded by a parafollicular T cell-rich area with extravasation of lymphocytes into the tissue. Sometimes, these

lymphoid aggregates are not arranged in distinct B and T cell areas, indicating probably different stages of TLS maturation [10, 11]. TLS presence has been noted as a response in cases of chronic inflammation due to persistent antigen stimulation (e.g., GVHD, Crohn's disease) [12], autoimmune conditions (like lymphocytic thyroiditis and rheumatoid arthritis), and several solid tumors [13–15].

To date, the presence of TLS in the tumor microenvironment has been mainly correlated with favorable clinical outcomes in various malignancies [9, 16–19] also including BCa [20–23]. Moreover, there are reports investigating the prognostic relevance of TLS in particular breast cancer subtypes (TNBC or HER-2/neu±), jointly with total TILs, but not with TILs distributed in the different breast tumor areas [23, 24]. Other studies in BCa have reported a correlation of TLS with higher tumor grade [24, 25], while in murine lung models TLS have been found to contain significant numbers of Tregs, thus acting as immunosuppressors, decreasing the effectiveness of therapy [26]. In hepatocellular carcinoma, TLS located in liver parenchyma have been proposed to act as microniches for tumor progenitor cells, promoting cancer cell stemness [27]. However, the role of TLS in this case is blurred due to a possible different function of outlier TLS from the tumor core.

Based on this potential functional pluralism of TLS, we suggest that their further characterization (e.g., spatially, compositionally, and functionally) in the tumor and the surrounding area will shed more light on the adaptive tumor-reactive immune mechanisms in the tumor microenvironment. We have previously demonstrated the importance of immune infiltration in breast cancer based on the combined differential densities of CD8+ and CD163+ cells in the TC and IM, resulting in the identification of favorable and unfavorable combined immune signatures (FCIS and UCIS, respectively) with significant prognostic value [8]. Nevertheless, there were a considerable number of patients, about 50% of the total cohort analyzed, who could not be classified either in the favorable or the unfavorable prognosis group. Consequently, it would be essential to find an additional discriminating and sensitive factor in the tumor microenvironment to guide classification of these patients into prognostic groups. Another interesting finding from our study was that patients with accumulation of CD8+ cells in the IM exhibited poor prognosis in contrast with colon cancer patients [28], emphasizing the key role for the spatial distribution of the immune cells in different tumor types for patients' survival. From this perspective, it is obvious that the immune contexture in the different tumor's compartments (e.g., TC, IM, TLS) is crucial for the orchestration of the antitumor immunity in the tumor microenvironment.

As outlined above, studies in breast cancer have been mainly focused on TLS intratumorally [22–24], thus neglecting to a great extent their prognostic significance when these

are located peritumorally (i.e., outside of, but adjacent to the IM). In the present study, we aimed to investigate the prognostic significance of peritumoral immune cells organized into TLS, either alone or jointly with differential intratumoral densities of immune infiltrates in TC/IM. This approach strongly supports the concept that the combined analysis of the presence, quantity, and immune contexture of peritumoral TLS, together with the differential distribution of intratumoral CD8+ and CD163+ cells in the TC and IM, may provide significant information on the immune status of the tumor microenvironment, possibly leading to an improved powerful reinforced biosignature for clinical outcomes of breast cancer patients.

Materials and methods

Patient selection

A total of 167 tumor samples (47 from the prospective arm and 120 from the retrospective arm of our previous study [8]) were selected from women with histologically confirmed invasive ductal breast cancer diagnosed at Saint Savas Cancer Hospital during a 15-year period (2000–2015). CD8+ and CD163+ cells were quantified in TC and IM immunohistochemically in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue samples from our recent study [8]. As breast cancer is a very heterogeneous disease, we tried to limit this heterogeneity by including in our study cohort only patients with invasive ductal carcinoma, without any distal metastasis, muscle or skin involvement, bilateral cancer, or history of any other malignancy. Cases with preoperative neoadjuvant therapy were excluded.

Paraffin block selection and immunohistochemistry

Multiple serial 3–4 μ sections were obtained from blocks of FFPE tissues and their respective hematoxylin–eosin (H&E) slides were reviewed by two experienced pathologists who selected areas from each tumor containing a substantial amount of tumor-infiltrative margin (minimum length of 28 mm-average 45 mm) surrounded by at least 5 mm of peritumoral breast parenchyma. These were stained with antibodies specific for CD4 (4B12, 1:40, Biogenex), CD8 (SP16, 1:80, Thermo Scientific), CD163 (10D6, 1:400, Biocare), and FOXP3 (236A/E7, 1:100, Abcam) for quantifying immune infiltrates in TLS. In some cases, the slides were also stained with anti-CD20 (L26, 1:500, Dako), anti-CD3 (LN10, 1:200, Novocastra), anti-CD23 (DAK-CD23, 1:80, Dako), and anti-CD31 (JC70A, 1:70, Dako) to validate the presence of TLS by demonstrating their content of B cells, T cells, and dendritic cells and high endothelial venules (HEVs), respectively (Suppl Fig. 1). Staining with CK7

(OV-TL 12/30, 1:200, Dako) was also performed for verifying the presence of cancer cell clusters inside TLS. Immunostaining was carried out using the Leica Bond III automation system (Leica Biosystems, Melbourne, Australia) and the Leica detection kit (Leica Biosystems, Newcastle, UK). Immunohistochemical staining was optimized using hyperplastic tonsil tissue.

TLS quantification and grouping

The presence and location of peritumoral TLS in each tumor was assessed in serial slides (both H&E and immunohistochemically stained) and only those distancing up to 5 mm from the infiltrative tumor border, including those associated with ductal in situ (DCIS) component, were scored [24, 29]. On H&E stained slides, TLS were identified morphologically as distinct ovoid lymphocytic aggregates presenting high endothelial venules (HEV) and/or a germinal center. As the use H&E alone has been proven to underestimate the presence of TLS [30], the utilization of immunohistochemical staining for CD4, CD8, and FoxP3 was used as a subsidiary means of detection. In equivocal cases, their identification was validated with supplementary immunostaining for CD31, CD20, CD3, and CD23. At least five serial slides per tumor (1 H&E and 4 immunostains) were evaluated and the mean number of TLS was recorded.

TLS were grouped in adjacent (aTLS) and distal (dTLS), according to distance and interposition of normal breast tissue (that is lobules, ducts, or adipose tissue without inflammation or desmoplastic stroma) between them and the infiltrative tumor margins [31]. Infiltrative tumor margins were defined as the outermost edge of invasive carcinoma disregarding any peripheral fibroinflammatory or desmoplastic response. aTLS were considered as those situated tangentially to the tumor-infiltrative border surface or bridged to it by non-normal breast tissue. dTLS were considered as those TLS that have normal breast tissue inter-positioned between them and the tumor-infiltrating border (Fig. 1a). The presence and number of aTLS and dTLS was evaluated on each slide. Tumors were then subgrouped in three arbitrary categories based on the number of aTLS: negative, low to moderate (1–4 aTLS), and high (≥ 5 aTLS). Implementation of serial FFPE sections allowed the assessment of CD4, CD8, FOXP3, and CD163 cells in each TLS separately in 118 out of the 167 patients (39 patients of the prospective cohort and 79 patients retrospectively analyzed, from our previous study), for whom staining for all four markers was available. The immunohistochemical evaluation revealed variations in CD4+, CD8+, FOXP3+ and CD163+ cell densities, which allowed their categorization in four density groups: very low, low, medium, and high with percentages of positive cells scored in each group, 0–10, 10–20, 20–30, and > 30, respectively (Fig. 5e). We determined a mean infiltration in aTLS

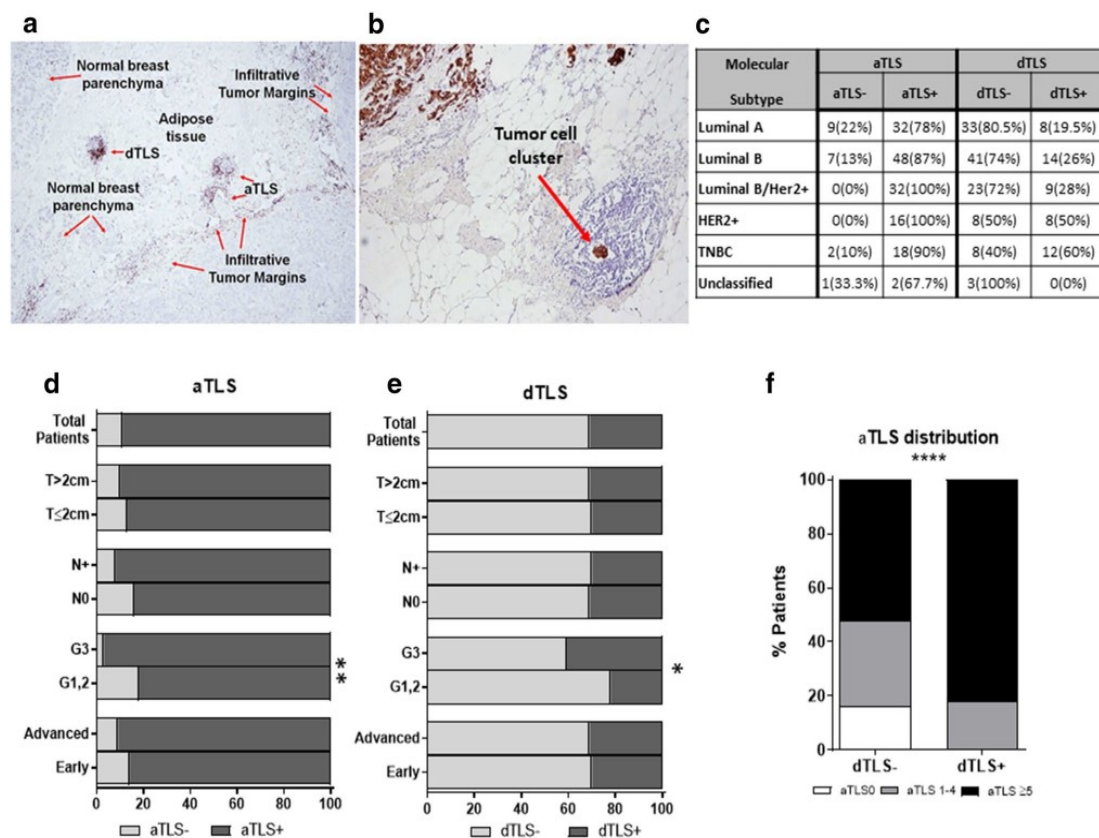


Fig. 1 Adjacent and distal TLS and their relation to clinicopathological characteristics. **a** Two aTLS and one dTLS, stained with anti-CD3 ($\times 40$ magnification), are shown. The invasive margin (IM) of the tumor is also visible. **b** Shown is an aTLS next to the tumor with a cluster of cancer cells (cytokeratin staining, $\times 100$ magnification). **c** Distribution of aTLS and dTLS-positive or -negative tumors among

BCa patients stratified by molecular subtypes. Percentages of **d** aTLS and **e** dTLS-positive (+) or -negative (-) tumors in the total BCa patient population and in groups of patients stratified by clinicopathological characteristics. **f** Presence of aTLS within dTLS- (dTLS0) and dTLS+ patients. ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p \leq 0.0001^{****}$)

and dTLS, due to the high degree of uniformity of infiltrating patterns of CD4+, CD8+, FOXP3+, and CD163+ cells detected in every single patient.

Statistical analysis

Contingency and survival plots were created using Prism GraphPad 7.01. All the contingency statistical tests (Chi square, Fisher's exact test) were carried out using the number of patients and not their percentages, although the corresponding graphs present percentages. Thus, p values refer to the real number of patients evaluated in each case. The non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) tests were used to analyze continuous variables. In the survival analyses, both, log-rank p and Gehan-Breslow p were considered. p values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Univariate and multivariate survival analyses (Cox

regression) were conducted in IBM SPSS 24. For the multivariate analysis, the forward stepwise method was used using the threshold of 0.05 as an entry point.

Results

Quantitative and qualitative analysis of adjacent and distal TLS and their relation to clinicopathological characteristics and clinical outcome

The clinicopathological characteristics of the 167 breast cancer patients evaluated in the present study are summarized in Supplementary Table 1. The number of peritumoral aTLS and dTLS (Fig. 1a) was determined and their relation to the patient clinicopathological characteristics was investigated

(Fig. 1d, e). Notably, some aTLS and dTLS were found to contain clusters of cancer cells (Fig. 1b). aTLS were detected in the majority of patients (Fig. 1d). Higher numbers of patients lacking aTLS were detected among those with better prognosis based on clinicopathological characteristics, i.e., lower TNM stage, well-differentiated tumor cells (G1, 2), absence of infiltrated lymph nodes (N0), and smaller tumors ($T \leq 2$ cm), although statistically significant differences were detected only for tumor grade (Fig. 1d). On the other hand, dTLS were present in the minority of our patients (Fig. 1e). Among those, grade 3 patients had statistically higher dTLS vs patients with grades 1 and 2 (Fig. 1e). Interestingly, all patients with HER2+ molecular subtypes (Luminal B/HER2+ and HER2+) had aTLS, while dTLS were more often detected in patients having molecular subtypes without hormone receptors (either HER2+ or TNBC; Fig. 1c).

The presence of aTLS relative to dTLS number was also investigated. Figure 1f clearly shows that the vast majority (approximately 95%) of dTLS+ tumors also harbors a higher number of aTLS (≥ 5), the rest were scored with aTLS (1–4) and none lacked aTLS. The latter was confirmed by our findings showing that patients with no aTLS (i.e., aTLS0) also lacked dTLS (i.e., were dTLS0) (Fig. 1f, left column).

In a group of 112 patients with clinical follow-up data (clinicopathological and treatment characteristics are presented in Supplementary Table 2), we examined the

association of peritumoral TLS with DFS and OS. Patients with aTLS exhibited significantly lower DFS than those without aTLS; OS was also lower in patients with aTLS, although statistical significance was not reached (Fig. 2a). In an analogous manner, patients with dTLS had statistically significantly worse DFS and OS than those lacking dTLS (Fig. 2b).

Moreover, the combined presence of both, aTLS and dTLS (aTLS + dTLS +), defined a group of patients with the worse clinical outcome, in terms of both DFS and OS (Fig. 2c). Patients having aTLS + dTLS – tumors exhibited a lower risk for recurrence and death than double-positive patients (i.e., aTLS + dTLS +). As expected, patients lacking both aTLS and dTLS (i.e., aTLS – dTLS –) had the best clinical outcomes (Fig. 2c). All statistical considerations among these groups, with significant differences in bold, are shown in Fig. 2d.

We next determined DFS and OS in our patients stratified by the number of aTLS. Interestingly, we observed that in the aTLS+ tumors, the number of aTLS (i.e., aTLS1–4 vs aTLS ≥ 5) did not substantially impact their DFS, whereas both groups exhibited statistically lower DFS vs patients whose tumors lacked aTLS (Fig. 3a). In contrast to what we observed when comparing for DFS, the OS was statistically significantly lower in the group of patients with aTLS ≥ 5 vs those with aTLS – 4 tumors. This latter group of patients had indistinguishable OS with patients lacking aTLS (Fig. 3a, b).

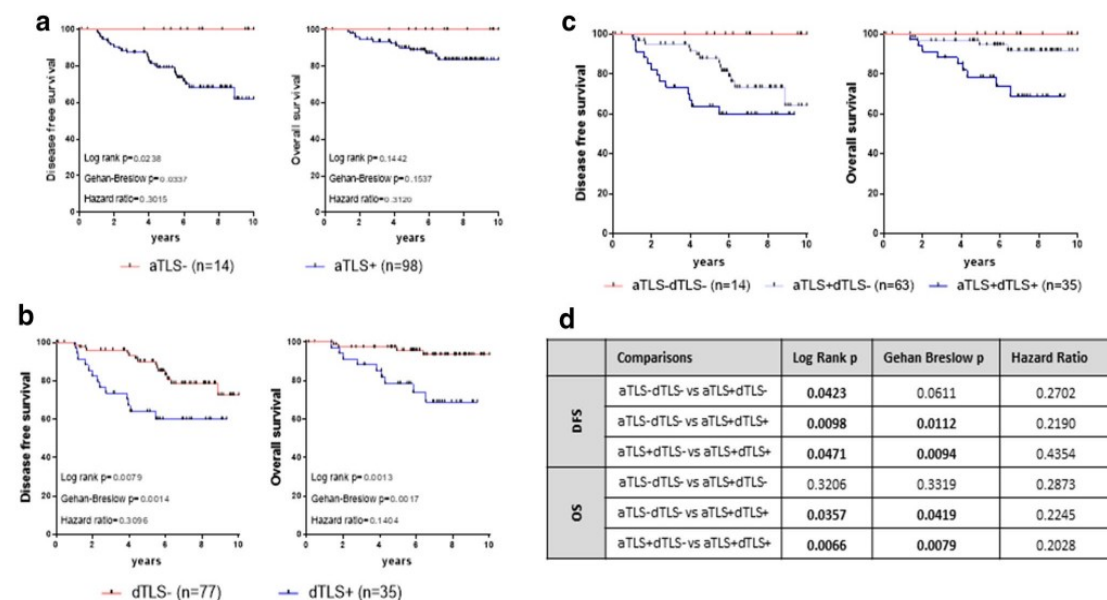


Fig. 2 Adjacent and distal TLS and their relation to clinical outcome. Clinical outcome (Kaplan–Meier disease-specific survival curves) in patients with **a** aTLS – and aTLS+ tumors or **b** dTLS – and dTLS+ tumors. **c** Clinical outcome in patients with TLS-nega-

tive tumors (aTLS – dTLS –), or with tumors harboring only aTLS (aTLS + dTLS –) or both aTLS and dTLS aTLS (aTLS + dTLS +). **d** Statistical analyses among the indicated groups

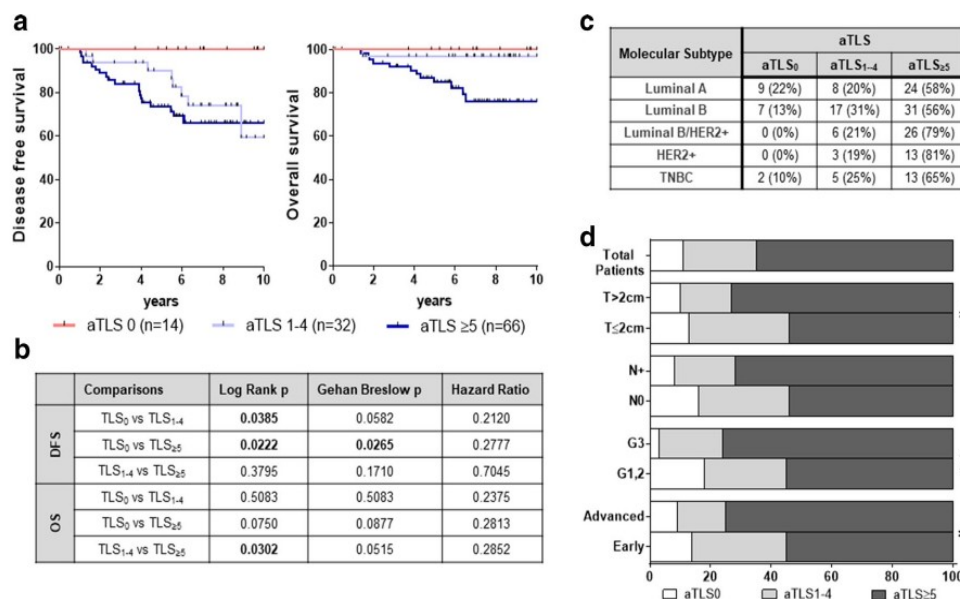


Fig. 3 Number of aTLS and their relation to clinicopathological characteristics and clinical outcome of patients. **a** Clinical outcome in patients with tumors without aTLS (aTLS₀) or with up to 4 aTLS (aTLS₁₋₄) and ≥ 5 aTLS (aTLS _{≥ 5}). **b** Statistical analyses among groups. **c** Distribution of aTLS-negative (aTLS₀) or aTLS-

positive (aTLS₁₋₄ and aTLS _{≥ 5}) tumors among BCa patients stratified by molecular subtypes. **d** Distribution of aTLS-negative (aTLS₀) or aTLS-positive (aTLS₁₋₄ and aTLS _{≥ 5}) tumors among BCa patients stratified by clinicopathological characteristics. ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$)

These data confirm that lack of aTLS represents a favorable prognosticator and also suggests that the number of aTLS in the aTLS+ tumors differentially affects DFS and OS. Figure 3c shows the distribution of the three groups among the molecular subtypes, with HER2+ patients lacking aTLS, as also shown above (Fig. 1c). As also expected, the frequency of patients with high numbers of aTLS was significantly increased among groups with unfavorable clinicopathological characteristics (i.e., increased tumor size, grade, and stage) (Fig. 3d).

Intratumoral immune infiltration and peritumoral TLS: an advanced level of the tumor immune profile

We have previously demonstrated the prognostic value of intratumoral CD8+ and CD163+ immune cells differentially distributed in TC and IM in breast cancer patients by establishing one favorable combined immune signature (FCIS) consisting of high CD8+ cell densities in the TC and low (L) ones in the IM (CD8HL) combined with opposite densities of CD163+ cells in the same regions (i.e., CD163LH). Inversely, CD8LH along with CD163HL comprised an unfavorable signature (UCIS) [8]. Nonetheless, by grouping our patients in either of these two signatures, we were left with a considerable number of patients (close to 50%; REST group), with distinct patterns of immune

infiltration in their primary tumors which could not lead to conclusive prognosis of either DFS or OS. This group contained patients whose CD8+ and CD163+ cells were homogeneously distributed in TC and IM comprising four subgroups, namely CD8LL/CD163LL, CD8HH/CD163HH, CD8HH/CD163LL, and CD8LL/CD163HH [8]. By examining aTLS and dTLS distribution within the FCIS, UCIS and REST groups, we observed that in the UCIS group the vast majority of patients had aTLS ≥ 5 (24 of 29; 83%), compared to patients having the FCIS (21 of 38; 55%) or REST (41 of 73; 56%) signatures (FCIS vs UCIS $p = 0.0403$ and REST vs UCIS $p = 0.0384$) (Fig. 4a). Moreover, a higher percentage of patients in the UCIS group presented with dTLS as compared to the two other groups, although not reaching statistical significance (Fig. 4b). Intra-analyses in the REST group revealed major differences with respect to the aTLS patterns among the four subgroups: the LL/LL group exhibited the best aTLS profile having the highest frequency of patients (33%) with the favorable aTLS₀ and only 17% of patients having unfavorable aTLS ≥ 5 with statistically significant differences compared to the other three subgroups which scored high aTLS ≥ 5 and low aTLS₀ profiles (60–81% and 0–10%, respectively; Fig. 4c). With regard to aTLS distribution, in an analogous manner with the total patient population, also in the REST group we found aTLS₀ tumors to be associated with improved DFS and OS as compared to

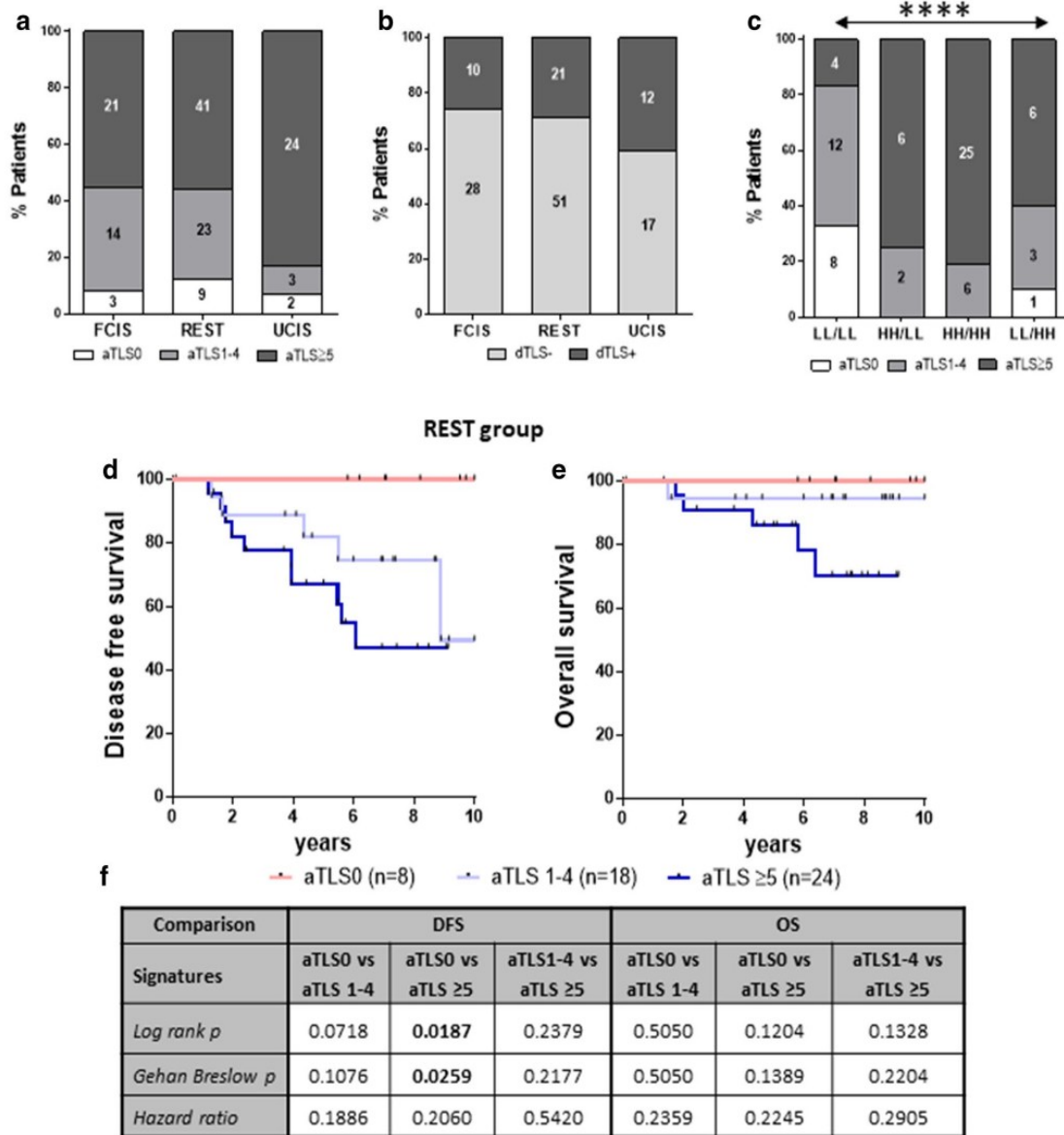


Fig. 4 aTLS and dTLS distribution in the FCIS, UCIS, and REST patients groups. **a** Percentages of patients in the FCIS, REST, and UCIS groups with aTLS-negative (aTLS0) or aTLS-positive (aTLS1–4 and aTLS≥5) tumors and **b** with dTLS-negative (dTLS0) or dTLS-positive (dTLS+) tumors. **c** Subgroups in the REST group with aTLS-negative (aTLS0) or aTLS-positive (aTLS1–4 and aTLS≥5) tumors stratified by immune infiltrates in the TC and IM; LL/LL: low number of CD8+ in the TC and IM and low number of

CD163+ in the TC and IM; HH/LL: high number of CD8+ in the TC and IM and low number of CD163+ in the TC and IM; HH/HH: high number of CD8+ in the TC and IM and high number of CD163+ in the TC and IM; LL/HH: low number of CD8+ in the TC and IM and high number of CD163+ in the TC and IM. **d, e** Clinical outcome in patients belonging to the REST group with tumors having aTLS0, aTLS1–4, or TLS≥5. **f** Statistical analyses among groups

those being positive for aTLS (i.e., aTLS1–4 and aTLS ≥ 5; Fig. 4d–f).

The reinforced immune signatures: a comprehensive “third level” assessment of tumor microenvironment immune profile

In an attempt to improve our recently described combined signatures (FCIS and UCIS) [8] so as to increase their prognostic value and also to cover a broader patient population, we reevaluated them by additionally considering aTLS patterns, thereby defining two new signatures which were called “Reinforced” Favorable or Unfavorable Combined Immune Signatures and were designated as RFCIS and RUCIS. Since

the number of patients with aTLS0 in the “REST” group was very small to be separately evaluated (only 8 patients with clinical follow-up; see Fig. 4d, e) and the clinical outcomes between the two groups, aTLS0 and aTLS1–4, did not differ significantly (Fig. 4f), we further proceeded with our analyses by combining aTLS0 and aTLS1–4 in one group. Thus, patients belonging to the RFCIS group were either CD8 HL and/or CD163 LH (i.e., FCIS), and/or aTLS0–4. All the remaining patients were classified within the RUCIS group: CD8 LH and/or CD163 HL (i.e., UCIS) and/or aTLS ≥ 5 (see also Suppl. Figure 2). Figure 5a shows how combining the FCIS with aTLS adds to the prognostic impact. The RFCIS group had a significantly better clinical outcome than the RUCIS, in terms of both DFS and OS, which was

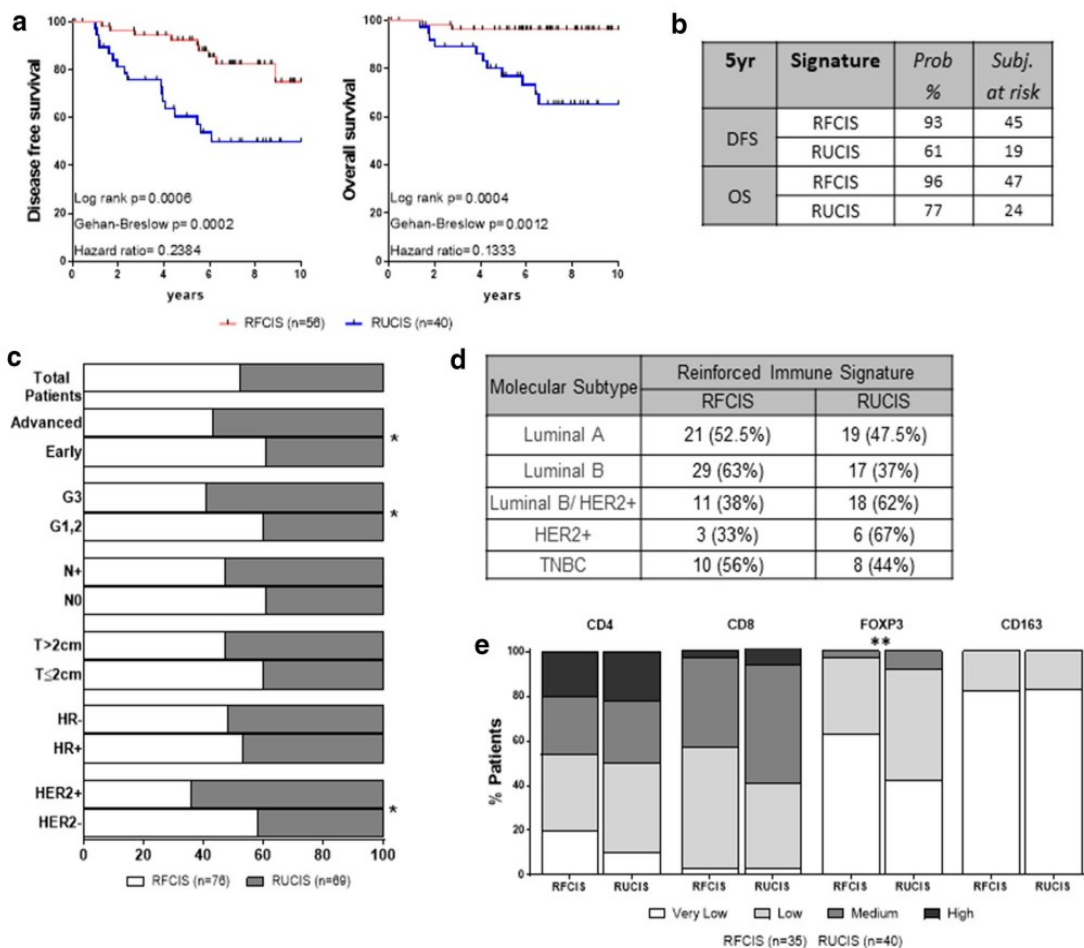


Fig. 5 The reinforced immune signatures. **a** Clinical outcome in BCa patients with RFCIS or RUCIS reinforced signatures. **b** %Probability and number of subjects at risk at 5 years for DFS and OS. **c** Distribution of the reinforced immune signatures in the total patient population and in patients’ groups based on clinicopathological parameters.

d Distribution of the reinforced signatures among BCa patients with different molecular subtypes. **e** Densities of CD4, CD8, CD163, and FoxP3 cells within TLS in BCa patients having RFCIS or RUCIS. Statistical significance refers to comparison of the percentage of patients. ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$)

robustly pronounced as compared to analogous comparisons between FCIS vs UCIS [8] and aTLS0/aTLS1–4 vs aTLS ≥ 5 (see Fig. 3a, b). The 5-year probability for DFS was 93% for the RFCIS patients vs 61% for the RUCIS. Accordingly, the 5-year probability for OS was 96% vs 77% (Fig. 5b). Kaplan–Meier curves illustrating survival of patients stratified by their tumor molecular subtype can be seen in Suppl. Figure 3A. Interestingly, we observed that patients with the RFCIS signature, irrespective of the tumor molecular subtype, had better clinical outcomes than those with the RUCIS signature. There was a trend for higher frequency of RUCIS vs RFCIS among the groups with unfavorable clinicopathological characteristics, reaching statistical significance in the groups for early vs advanced stage, grade 1, 2 vs grade 3, and HER2 – vs HER2+ (Fig. 5c). An increased frequency of RUCIS patients was also observed among the

HER2+ molecular subtypes, i.e., luminal B/HER2+ and HER2+ subgroups (Fig. 5d). Moreover, no significant differences in the cell infiltration of TLS by CD4+, CD8+, or CD163+ could be detected among the two groups (Fig. 5e). On the contrary, TLS infiltrated with FOXP3+ lymphocytes were significantly increased in the RUCIS patient group (Fig. 5e).

To investigate the prognostic significance of the new reinforced combined immune signatures, we conducted univariate and multivariate analysis (Table 1). In the univariate analysis for molecular subtype, early vs advanced stage (i.e., AJCC stages 1 and 2A vs 2B and 3), T status, N status, grade, expression of hormone receptors and HER2, and the prognostic power of the reinforced signatures were comparable to that of molecular subtype, stage, tumor size, nodal status, and hormone receptor expression for both

Table 1 Univariate and multivariate analyses

Univariate	DFS			OS		
	<i>p</i>	Hazard ratio	95.0% CI for exp (<i>B</i>) (range)	<i>p</i>	Hazard ratio	95.0% CI for exp (<i>B</i>) (range)
Molecular subtypes	0.001	1.555	1.197–2.019	0.008	1.650	1.130–2.409
Early advanced stage	0.001	4.332	1.837–10.212	0.006	17.564	2.293–134.540
T status	0.000	2.988	1.771–5.038	0.000	4.041	2.003–8.153
N status	0.000	2.168	1.467–3.205	0.000	3.229	1.844–5.654
Grade	0.188	1.559	0.805–3.019	0.036	3.317	1.083–10.160
Hormone receptors	0.003	0.323	0.152–0.689	0.010	0.249	0.086–0.719
HER-2/neu	0.591	1.247	0.564–2.758	0.539	0.670	0.187–2.403
Reinforced signatures	0.001	3.773	1.675–8.496	0.004	9.206	2.039–41.567
Multivariate	DFS			OS		
	<i>p</i>	Hazard ratio	95.0% CI for exp (<i>B</i>) (range)	<i>p</i>	Hazard ratio	95.0% CI for exp (<i>B</i>) (range)
2. Model before stepwise selection						
Molecular subtypes	0.022	2.092	1.115–3.924	0.196	2.038	0.692–5.998
Early–advanced stage	0.415	1.984	0.382–10.299	0.033	20.878	1.280–340.628
T status	0.049	2.475	1.004–6.101	0.662	1.331	0.369–4.802
N status	0.654	1.162	0.602–2.44	0.743	1.152	0.495–2.78
Grade	0.387	0.693	0.302–1.591	0.706	1.378	0.261–7.276
Hormone receptors	0.562	1.684	0.290–9.789	0.815	0.698	0.035–14.106
HER-2/neu	0.756	0.847	0.298–2.407	0.016	0.140	0.028–0.690
Reinforced signatures	0.009	3.450	1.366–8.708	0.014	11.026	1.631–74.533
2. Model after stepwise selection						
Molecular subtypes	0.000	1.685	1.268–2.241	0.000	2.432	1.528–3.871
Early–advanced stage	–	–	–	0.002	37.148	3.808–362.371
T status	0.000	3.522	1.774–6.993	–	–	–
HER-2/neu	–	–	–	0.012	0.158	0.037–0.666
Reinforced signature	0.009	2.981	1.307–6.802	0.003	12.583	2.362–67.024

All categorical covariates were transformed into numeric codes as follows: early–advanced stage (I–IIA; 1, IIB, IIIA, III3; 2), T status (T1; 1, T2; 2, T3; 3), N stage (N0; 0, N1; 1, N2; 2, N3; 3), grade (G1; 1, G2; 2, G3; 3), hormone receptors (neg; 0, pos; 1), HER-2/neu (neg; 0, pos; 1), reinforced signatures (RFCIS; 1, R UCIS; 2), molecular subtypes (Lum A; 1, Lum B; 2; luminal B/Her2+, 3, HER2+, 4 TNBC, 5)

CI confidence interval, HR hazard ratio

DFS and OS. In the multivariate analysis and the stepwise selection for the same parameters, the reinforced signature was found to be an independent prognostic factor for DFS, along with the molecular subtype and the tumor size, and for OS by the inclusion of the molecular subtype, early vs advanced stage, and HER2 expression.

Discussion

In the current study, we investigated the presence, quantity, and immune contexture of TLS peritumorally, alone, and in combination with intratumoral signatures based on differential densities of CD8+ and CD163+ cells in TC and IM which were recently described by us [8]. This type of analyses provided significant information on the in situ adaptive immune status, introducing improved reinforced biosignatures for clinical outcomes in BCa patients. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that both, presence and high numbers of peritumoral TLS correlate with unfavorable clinicopathological characteristics and worse prognosis in BCa.

TLS represent structures of varying organization, from simple clusters of lymphocytes to complicated structures with considerable morphological, cellular, and molecular similarities with SLO, particularly lymph nodes [13, 32]. As a consequence of these similarities, HEV, a common characteristic of these structures, may play an important role in the recruitment of circulating lymphocytes to intratumoral TLS [33, 34]. The contribution of TLS to immune control of tumor growth remains speculative. TLS have been detected in the stroma and/or in the invasive margin of tumor in most cancers and their densities mostly correlated with a favorable clinical outcome [9, 16–18]. The presence of TLS intratumorally has been correlated with antitumor orientated immune responses, possibly offering an advantage for enhancing the effectiveness of TIL [13, 33]. TLS-associated dendritic cells, by presenting tumor antigenic peptides to T cells located in the T cell compartments of TLS, are key to mount local T cell-mediated antitumor responses [33]. In addition, the presence of CD4+ T cells within TLS further strengthens the notion of a supportive role of TLS for CD8+ effector TIL differentiation [35]. However, TLS may also have a negative impact on cancer prognosis. The presence of Treg in TLS may negatively affect the levels of activation of CD4+ and CD8+ immune infiltrates, resulting in tumor escape from immune surveillance [26]. Furthermore, immunosuppressive B cells, adjacent to CD8+ T cells, in lymphoid follicle-like structures were detected in prostate cancer specimens [36].

The role of peritumoral, outside the invasive margin, TLS has been much less investigated and in BCa there

are limited results regarding their prognostic value. Our results show that the presence of peritumoral TLS significantly correlates with histological grade 3 tumors, in accordance with other studies in BCa and urothelial bladder carcinoma [24, 37]. We additionally show that BCa patients with invasive ductal carcinoma, independently of the molecular subtype, having peritumoral TLS exhibit worse DFS and OS than those lacking TLS. This unfavorable prognosis depends both on the location (adjacent only vs adjacent and/or distal) and density (0, 1–4 and > 5) of peritumoral TLS. Liu et al. [24] have recently reported that the presence of TLS, at the invasive margin and/or peritumorally, was associated with a better DFS, but not OS, in a subset of BCa patients, namely those expressing HER2, whereas no differences could be detected in terms of both OS and DFS in HER2 – patients. As no patient lacking TLS in our HER2+ cohort was observed, this finding could not be evaluated in the present study. The difference in TLS-negative HER2+ patients could be attributed to the fact that in our study only patients with primary ductal invasive cancer, no stage IIIB and without neoadjuvant treatment were enrolled, whereas in Liu et al. study patients with any type of primary invasive breast cancer were included.

Our recent work shows that intratumoral high densities of CD8+ cells in the IM, but not in the TC, predicted poor prognosis in BCa patients [8]. Considering these findings, together with the poor prognosis of peritumoral TLS described herein, we could make the hypothesis that immune elements located in the IM or peritumorally may reflect a progressive migration of malignant cells from the TC to the outer areas of the tumor related to invasion and metastasis. This hypothesis could hold true given that we, and others [24], have detected a number of peritumoral TLS infiltrated with clusters of cancer cells. Furthermore, extratumoral TLS were found to be associated with advanced disease in colorectal cancer [38]. In line with this, Finkin et al. reported that inflammation-associated TLS serve as niches for tumor progenitor cells, which may lead to recurrence in hepatocellular carcinoma, suggesting an unfavorable prognostic role for peritumoral TLS [27], in contrast to the favorable ones described for intratumoral TLS, thus far in hepatocellular carcinomas [39]. Thus, peripheral TLS may contribute to an immunosuppressive milieu, supporting tumor growth through negative effects on antitumor immunity, or via direct supportive effects on tumor [40].

Besides the distribution of TLS (intratumorally/peritumorally), an additional parameter to be considered is the “quality” of TLS. The initial TLS formation is followed by a sequence of maturation stages, which probably reflect different functionalities [13, 41]. Studies focusing on the infiltration of TLS attributed their immunosuppressive role to the infiltrating immune cells [26, 36]. In BCa, Tregs within

lymphoid infiltrates surrounding the tumor were found to correlate with increased risk for relapse and death [42]. Our results show that RUCIS patients have higher amount of infiltrating FOXP3+ cells in their TLS than the RFCIS patients. Such FOXP3+ cell-containing TLS could promote an immunosuppressive microenvironment leading to shorter survival. Taken altogether, we may propose that the formation, presence, and quality of TLS substantially contribute to the heterogeneity of the tumor microenvironment and may explain the differences among intratumoral and peritumoral TLS, a hypothesis requiring further investigation.

In our study, the presence and the density of peritumoral TLS are not independent predictors for DFS and OS in BCa. For this reason, by combining the intratumoral spatial distribution of CD8+ and CD163+ cells in TC and IM with the number of peritumoral TLS in BCa patients, we aimed to create more robust “reinforced signatures”. These signatures do not necessarily mean established signatures (this remains to be validated in future studies with larger cohorts of patients), but rather combined signatures with higher prognostic value compared to the individual signatures from which they were composed. Even though our recently described signature, based on the differential CD8+ and CD163+ cell distribution in the TC and IM, was an independent factor for both DFS and OS in invasive ductal BCa, there was a considerable group (about 50%) of “gray zone” patients (REST group) who could not be classified either in the FCIS or the UCIS group. After combining the intratumoral and peritumoral microenvironment components (TC, IM, and aTLS), we managed to stratify more accurately the patients, creating two new signatures: Reinforced FCIS (RFCIS) and Reinforced UCIS (RUCIS), with an even more powerful prognostic value versus our previously reported signatures [8]. The reinforced signatures described herein constitute an independent prognostic factor, along with the molecular subtype and the tumor size for DFS, and for OS together with molecular subtype, early vs advanced stage and HER2 expression.

Conclusions

In the present study, we demonstrate for the first time an association between spatial differential densities of intratumoral immune infiltrates with peritumoral TLS and clinical outcomes. Our observations further support the existence of a dynamic interplay between the immune cells within the intratumoral microenvironment (TC, IM) and its surrounding counterpart (TLS). Despite the limitations of our study (particularly the small cohort of patients and the elusive determination of the maturational stage of TLS), there is strong evidence supporting the fundamental role of the

relationship between tumor microenvironment components for clinical responses. Further studies on the cellular and molecular mechanisms leading to TLS formation, governing their functions and distinguishing TLS with anti- or pro-tumor activity, are required to thoroughly enlighten their role.

Author contributions MS and SPF equally contributed to study design, data collection, analysis and interpretation of results, and the writing the manuscript; CKV contributed to the study design, data collection, and interpretation of results; NNS contributed to data collection and analysis; AA and NA were responsible for the collection of patient material and clinical follow-up; DV contributed to data analysis and writing of the manuscript; SAP and CNB supervised the study, contributed to experimental design, data analysis, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding This study was supported by Grant GER_1968 (acronym ISPEBREAST) to Constantin N. Baxevanis from the Greek–German bilateral cooperation for research and innovation, funded by the General Secretariat for Research and Technology (GSRT) of the Ministry of Education, Research and Religious Affairs of the Hellenic Republic and the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF), and by a donation to Sonia Perez from the Haegeman-Goossens family, Netherlands. We would like to acknowledge the Haegeman-Goossens family for their support to our research.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval and ethical standards The study was approved by the Institutional Review Board of Saint Savas Cancer Hospital. Study code: IRB-ID 6079/448/10-6-13. Date of approval: 10/06/2013; retrospective study (2000–2010); first patient prospectively enrolled: 14/2/2014.

Informed consent Retrospectively analyzed (2000–2010) and prospectively enrolled patients (2014–2015) who signed the same informed consent. Individual participants provided written informed consent for the use of their specimens. In cases where retrospectively analyzed patients could not visit the hospital to provide signed informed consent, they were informed orally via telephone calls by their oncologists. Clinical data were obtained from all patients anonymously. Patients were assured that confidentiality of their records will be protected according to the Greek regulations and laws.

References

- Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro JM, Buque A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N, Castoldi F, Abastado JP, Agostinis P, Apte RN, Aranda F, Ayyoub M, Beckhove P, Blay JY, Bracci L, Caignard A, Castelli C, Cavallo F, Celis E, Cerundolo V, Clayton A, Colombo MP, Coussens L, Dhodapkar MV, Eggermont AM, Fearon DT, Fridman WH, Fucikova J, Gabrilovich DI, Galon J, Garg A, Ghiringhelli F, Giaccone G, Gilboa E, Gnjatic S, Hoos A, Hosmalin A, Jager D, Kalinski P, Karre K, Kepp O, Kiessling R, Kirkwood JM, Klein E, Knuth A, Lewis CE, Liblau R, Lotze MT,

- Lugli E, Mach JP, Mattei F, Mavilio D, Melero I, Melief CJ, Mitendorf EA, Moretta L, Odunsi A, Okada H, Palucka AK, Peter ME, Pienta KJ, Porgador A, Prendergast GC, Rabinovich GA, Restifo NP, Rizvi N, Sautes-Fridman C, Schreiber H, Seliger B, Shiku H, Silva-Santos B, Smyth MJ, Speiser DE, Spisek R, Srivastava PK, Talmadge JE, Tartour E, Van Der Burg SH, Van Den Eynde BJ, Vile R, Wagner H, Weber JS, Whiteside TL, Wolchok JD, Zitvogel L, Zou W, Kroemer G (2014) Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 5(24):12472–12508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2998>
2. Zinzindohoue F, Zeitoun G, Berger A, Todosi AM, Marliot F, Lagorce C, Galon J, Pages F (2014) Immunology and personalized medicine in oncology. *Bull Cancer* 101(Suppl 1):S12–S17. <https://doi.org/10.1684/bdc.2014.1972>
 3. Ribas A, Wolchok JD (2018) Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359(6382):1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
 4. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, Coussens LM, Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Hedrick CC, Vonderheide RH, Pittet MJ, Jain RK, Zou W, Howcroft TK, Woodhouse EC, Weinberg RA, Krummel MF (2018) Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 24(5):541–550. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
 5. Keren L, Bosse M, Marquez D, Angoshtari R, Jain S, Varma S, Yang SR, Kurian A, Van Valen D, West R, Bendall SC, Angelo M (2018) A structured tumor-immune microenvironment in triple negative breast cancer revealed by multiplexed ion beam imaging. *Cell* 174(6):1373–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.039>
 6. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Borger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grutzmann R, Van den Eynde M, Joret-Mourin A, Kartheuser A, Leonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, Vocka M, Spacek J, Petruzella L, Konopasek B, Dunder P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Hacheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Musina AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391(10135):2128–2139. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30789-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30789-X)
 7. Schauer D, Starlinger P, Zajc P, Alidzanovic L, Maier T, Buchberger E, Pop L, Gruenberger B, Gruenberger T, Brostjan C (2014) Monocytes with angiogenic potential are selectively induced by liver resection and accumulate near the site of liver regeneration. *BMC Immunol* 15:50. <https://doi.org/10.1186/s12865-014-0050-3>
 8. Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, Haritos C, Vaxevas CK, Anastasopoulou EA, Janssen N, Arngiannaki N, Ardavanis A, Pawelec G, Perez SA, Baxevas CN (2017) Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *J Immunother Cancer* 5:39. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0240-7>
 9. Sautes-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Dieu-Nosjean MC (2016) Tertiary lymphoid structures in cancers: prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. *Front Immunol* 7:407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00407>
 10. Cipponi A, Mercier M, Seremet T, Baurain JF, Theate I, van den Oord J, Stas M, Boon T, Coulie PG, van Baren N (2012) Neogenesis of lymphoid structures and antibody responses occur in human melanoma metastases. *Cancer Res* 72(16):3997–4007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1377>
 11. Jones GW, Hill DG, Jones SA (2016) Understanding immune cells in tertiary lymphoid organ development: it is all starting to come together. *Front Immunol* 7:401. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00401>
 12. Ager A (2017) High endothelial venules and other blood vessels: critical regulators of lymphoid organ development and function. *Front Immunol* 8:45. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00045>
 13. Colbeck EJ, Ager A, Gallimore A, Jones GW (2017) Tertiary lymphoid structures in cancer: drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or bystander sentinels in disease? *Front Immunol* 8:1830. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01830>
 14. Noort AR, van Zoest KP, van Baarsen LG, Maracle CX, Helder B, Papazian N, Romera-Hernandez M, Tak PP, Cupedo T, Tas SW (2015) Tertiary lymphoid structures in rheumatoid arthritis: NF-kappaB-inducing kinase-positive endothelial cells as central players. *Am J Pathol* 185(7):1935–1943. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.012>
 15. Pipi E, Nayar S, Gardner DH, Colafrancesco S, Smith C, Barone F (2018) Tertiary lymphoid structures: autoimmunity goes local. *Front Immunol* 9:1952. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01952>
 16. Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, Laghi L, Allavena P, Mantovani A, Marchesi F (2014) Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 20(8):2147–2158. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2590>
 17. Ladanyi A, Sebestyen T, Mohos A, Liszky G, Somlai B, Both E, Timar J (2014) Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma. *Pathol Oncol Res* 20(4):981–985. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9784-8>
 18. Schweiger T, Berghoff AS, Glogner C, Glueck O, Rajky O, Traxler D, Birner P, Preusser M, Klepetko W, Hoetzenecker K (2016) Tumor-infiltrating lymphocyte subsets and tertiary lymphoid structures in pulmonary metastases from colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 33(7):727–739. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9813-y>
 19. Lin L, Hu X, Zhang H, Hu H (2019) Tertiary lymphoid organs in cancer immunology: mechanisms and the new strategy for immunotherapy. *Front Immunol* 10:1398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01398>
 20. Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautes-Fridman C, Fridman WH (2014) Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 35(11):571–580. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.09.006>
 21. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G (2017) The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 14(12):717–734. <https://doi.org/10.1038/nrcli.nonc.2017.101>
 22. Lee HJ, Kim JY, Park IA, Song IH, Yu JH, Ahn JH, Gong G (2015) Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes and the tertiary lymphoid structures in HER2-positive breast cancer treated with adjuvant trastuzumab. *Am J Clin Pathol* 144(2):278–288. <https://doi.org/10.1309/AJCPXUYDYZORZ3G>
 23. Lee HJ, Park IA, Song IH, Shin SJ, Kim JY, Yu JH, Gong G (2016) Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast

- cancer. *J Clin Pathol* 69(5):422–430. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203089>
24. Liu X, Tsang JYS, Hlaing T, Hu J, Ni YB, Chan SK, Cheung SY, Tse GM (2017) Distinct tertiary lymphoid structure associations and their prognostic relevance in HER2 positive and negative breast cancers. *Oncologist* 22(11):1316–1324. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0029>
 25. Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, Fenton C, Mortensen ES (2015) Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer* 15:101. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1116-1>
 26. Joshi NS, Akama-Garren EH, Lu Y, Lee DY, Chang GP, Li A, DuPage M, Tammela T, Kerper NR, Farago AF, Robbins R, Crowley DM, Bronson RT, Jacks T (2015) Regulatory T cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures suppress anti-tumor T cell responses. *Immunity* 43(3):579–590. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.006>
 27. Finkin S, Yuan D, Stein I, Taniguchi K, Weber A, Unger K, Browning JL, Goossens N, Nakagawa S, Gunasekaran G, Schwartz ME, Kobayashi M, Kumada H, Berger M, Pappo O, Rajewsky K, Hoshida Y, Karin M, Heikenwalder M, Ben-Neriah Y, Pikarsky E (2015) Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol* 16(12):1235–1244. <https://doi.org/10.1038/ni.3290>
 28. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(35):5944–5951. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6147>
 29. Vingiani A, Viale G (2017) The pathology report. In: Veronesi U, Goldhirsch A, Veronesi P, Gentilini OD, Leonardi MC (eds) *Breast cancer: innovations in research and management*. Springer International Publishing, Cham, pp 157–168. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48848-6_16
 30. Buisseret L, Desmedt C, Garaud S, Fornili M, Wang X, Van den Eyden G, de Wind A, Duquenne S, Boisson A, Naveaux C, Rothe F, Rorive S, Decaestecker C, Larsimont D, Piccart-Gebhart M, Biganzoli E, Sotiriou C, Willard-Gallo K (2017) Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer. *Mod Pathol* 30(9):1204–1212. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.43>
 31. Pedersen L, Gunnarsdottir KA, Rasmussen BB, Moeller S, Lanng C (2004) The prognostic influence of multifocality in breast cancer patients. *Breast* 13(3):188–193. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2003.11.004>
 32. Engelhard VH, Rodríguez AB, Mauldin IS, Woods AN, Peske JD, Slingluff CL Jr (2018) Immune cell infiltration and tertiary lymphoid structures as determinants of antitumor immunity. *J Immunol* 200(2):432–442. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701269>
 33. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TK, Lupo A, Klein C, Knockaert S, de Chaisemartin L, Ouakrim H, Becht E, Alifano M, Validire P, Remark R, Hammond SA, Cremer I, Damotte D, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Dieu-Nosjean MC (2014) Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* 74(3):705–715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>
 34. Nerviani A, Pitzalis C (2018) Role of chemokines in ectopic lymphoid structures formation in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol* 104(2):333–341. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0218-062R>
 35. de Chaisemartin L, Goc J, Damotte D, Validire P, Magdeleinat P, Alifano M, Cremer I, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Dieu-Nosjean MC (2011) Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res* 71(20):6391–6399. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0952>
 36. Shalpour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, Willinsky G, Ammirante M, Strasner A, Hansel DE, Jamieson C, Kane CJ, Klatte T, Birner P, Kenner L, Karin M (2015) Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature* 521(7550):94–98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>
 37. Koti M, Xu AS, Ren KYM, Visram K, Ren R, Berman DM, Siemens DR (2017) Tertiary lymphoid structures associate with tumour stage in urothelial bladder cancer. *Bladder Cancer* 3(4):259–267. <https://doi.org/10.3233/BLC-170120>
 38. Bento DC, Jones E, Junaid S, Tull J, Williams GT, Godkin A, Ager A, Gallimore A (2015) High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology* 4(3):e974374. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.974374>
 39. Calderaro J, Petitprez F, Becht E, Laurent A, Hirsch TZ, Rousseau B, Luciani A, Amaddeo G, Derman J, Charpy C, Zucman-Rossi J, Fridman WH, Sautes-Fridman C (2019) Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 70(1):58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.003>
 40. Butterfield LH, Kaufman HL, Marincola FM (2017) *Cancer immunotherapy principles and practice*. Demos Medical Publishing, New York
 41. Posch F, Silina K, Leibl S, Mundlein A, Moch H, Siebenhuner A, Samaras P, Riedl J, Stotz M, Szkandera J, Stoger H, Pichler M, Stupp R, van den Broek M, Schraml P, Gerger A, Petrausch U, Winder T (2018) Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *Oncoimmunology* 7(2):e1378844. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1378844>
 42. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69(5):2000–2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2360>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΑΝΑΣΚΟΠΙΣΗΣ (REVIEW)



The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer

Constantin N. Baxevanis¹ · Michael Sofopoulos² · Sotirios P. Fortis¹ · Sonia A. Perez¹

Received: 2 November 2018 / Accepted: 19 March 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

The presence of immune infiltrates in the tumor microenvironment has been documented in many types of cancer. Moreover, the preexistent or endogenous immunity which consists of interactions between intratumoral lymphocytes and tumor cells is mostly relevant for the successful application of various anticancer therapies, including standard chemotherapy, immune checkpoint inhibition-based immunotherapy and targeted therapies. The immunoscore defines densities of intratumoral immune infiltrates which determine poor or favorable prognosis depending on their quantity and quality in the tumor compartments. Results from large clinical studies have demonstrated an association between high densities of cytotoxic and memory TILs in the tumor compartments with improved prognosis. Importantly, we have demonstrated that differential combined densities of immune infiltrates jointly analyzed in the tumor center (TC) and the invasive margin (IM) have a significant prognostic value in breast cancer patients with poor clinicopathological parameters.

Keywords Breast cancer · TILs · CD163+ cells · CD8+ T cells · Biomarkers · TIMO XIV

Abbreviations

BCa	Breast cancer
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4 and 6
DFS	Disease-free survival
ER	Estrogen receptor
FCIS	Favorable combined immune signature
HEV	High endothelial venule
IM	Invasive margin
TAM	Tumor-associated macrophages
TC	Tumor center
Th	T-helper
TMB	Tumor mutational burden
Tregs	Regulatory T cells
UCIS	Unfavorable combined immune signature

TILs and the endogenous antitumor immunity

Malignant cell transformation alters the structure of cell membrane proteins and induces antitumor responses against tumor antigens which eliminate the developing tumor cells, controlling tumor growth rates. However, as postulated in the “immunoediting hypothesis”, this immune surveillance may be overridden by various acquired resistance mechanisms employed by the tumor or other cells in the tumor microenvironment including fibroblasts and MDSCs, leading to immune evasion and clinical manifestation of cancer [1–3]. Thus, this inherent capacity of the immune system to respond to the tumor and to control cancer cell growth (referred to as endogenous or preexisting immunity) has a major impact on the balance between tumor immune surveillance and escape. TILs are key to our understanding of tumor immunogenicity and results from clinical studies revealed that these cells have a leading role on the clinical course of several cancers, with CTLs providing the most consistent positive prognostic impacts [4]. These findings underscore the relationship between the endogenous antitumor immunity and cancer, and also highlight the potential role of patients’ immune system for the management of malignant disease. At this point we are not aware at which levels the adaptive immune response generated within

✉ Constantin N. Baxevanis
 baxevanis@ciic.gr

¹ Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, 171 Alexandras Ave., 115 22 Athens, Greece

² Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece

the tumor microenvironment may hinder tumor progress, namely if there is a complete destruction of the tumor or, due to tumor heterogeneity, only the immunogenic clones will be recognized and eliminated, whereas “the rest” will continue growing. In the latter case, the immunoediting process will ensure that the tumor-specific TILs, by eliminating most of tumor cells, will “shape” the tumor to be more clonal than heterogeneous, and thus more accessible to reinforced immune attack via immunotherapies [5].

TILs as biomarkers

The complex process of interactions among TILs having different densities and function, will variously impact tumor growth depending on the strength by which they mediate opposite or synergistic antitumor effects. The magnitude of the immune response generated will be further influenced by the molecular characteristics of the tumor and its microenvironment, rendering this dynamic interaction of the tumor and immune system an indispensable parameter for clinical outcome. Indeed, in many cancer types there is an association of immune-cell infiltrates with prognosis and prediction which confirms the capacity of the immune system to influence clinical outcome and the ability to predict therapeutic responses [6].

The role of TILs as favorable prognostic biomarkers has been identified in multiple types of malignant diseases, whereby the densities of certain TIL subpopulations were indicative for the magnitude of the endogenous antitumor immunity [7]. In general terms, strong lymphocytic infiltration, mainly consisting of CD45RO+ (memory) and CD8+ (cytotoxic) TILs (comprising the “immunoscore”), has been associated with clinical benefits in patients with colon, lung, breast, ovarian, prostate, and head and neck cancer [8]. For colorectal cancer it has been established that the densities and type of CD8+ TILs correlate with tumor progression regardless of patients’ tumor stage, rendering the immunoscore a significant prognostic factor, complementing or even outperforming standard pathological criteria alone [9].

In contrast to CD8+, the prognostic value of CD4+ immune infiltrates are rather debatable. This is mostly due to the fact that the CD4+ T-cell pool comprises at least 4 lineages [e.g., T-helper (Th)1, Th2, Th17 and regulatory T cells (Tregs)] with distinct functional programs also characterized by functional plasticity [10]. Accumulating evidence suggests that CD4+ Tregs have the ability to inhibit host-derived adaptive antitumor immunity mostly by suppressing tumor-specific cytotoxicity [11, 12]. The transcription factor FOXP3 plays an important role for Tregs development and function, and is considered as a reliable marker for Tregs. Reports concerning the role of CD4+ Tregs TILs ascribe a functional dichotomy in this particular subset: on one hand

Tregs appear to support cancer progression by suppressing antitumor immunity, possibly representing a potential unfavorable prognostic factor which could be valuable as a therapeutic target. Indeed, this relation has been reported in a wide range of localized or metastatic human carcinomas, including ovarian, hepatocellular, lung, gastric and cervical cancers [13]. The capacity of Tregs to support a hostile tumor microenvironment promoting tumor progression has been highlighted also from reports in breast cancer supporting the role of these cells both as prognostic as well as predictive biomarkers. In comprehensive retrospective analyses, increased densities of FoxP3+ immune infiltrates were associated with poor OS which highlighted their role as unfavorable prognosticator [14, 15]. Because the endogenous tumor-reactive immunity in addition to regulating the outcome of immunotherapies also influences responses to other type of therapies, intratumoral Tregs have been also reported to function as predictive biomarkers. Thus, the density balance between CTLs and Tregs significantly associated with clinical responses after neoadjuvant chemotherapies in breast cancer with high complete pathological responses reported in patients having high CD8+/FOXP3+ ratios [16–18].

Besides adjuvant chemotherapies, densities of CD8+ T-lymphocytes have additionally been demonstrated to correlate with the outcome of neoadjuvant endocrine therapies in breast cancer patients [19]. This correlation may be linked to the tumor mutational burden (TMB)—CD8+ T infiltrates axis [5, 20]. For instance, Luminal B breast tumors are immunologic “hot” tumors characterized by high TMB and are less responsive to aromatase inhibitors [21, 22] presumably because their growth is regulated by alternate oncogenic pathways induced by activating mutations. On the other hand, tumors responsive to aromatase inhibitors should be dependent mainly on the estrogen receptor (ER) signaling for their growth meaning that such tumors have less activating oncogenic mutations during their evolution. However, irrespective of the molecular subtypes of breast cancer, the tumor microenvironment negatively impacts the antitumor immunity by downregulating tumor reactivity mediated by CD8+ CTLs mainly through induction of suppressive mechanisms [23]. In breast cancer, hormonal signaling can variously enhance tumor progression [24] which provides a serious obstacle for the successful outcome of immunotherapies in this type of cancer. This necessitates the development of combinatorial modalities to boost immunotherapeutic responses. For instance, blocking of immune checkpoints combined with hormonal therapies represents a promising therapeutic modality; however, the frequently emerging acquired immune resistance during immunotherapies with antibodies that block immune checkpoints provide a serious hurdle for its successful application. Another problem

that obviously prevents the use of combined therapies is the lack of knowledge about the appropriate time for their initiation as well as their sequencing. Despite these problems, immunotherapies targeting negative pathways of immune regulation seem to hold promise for inducing durable clinical responses through the generation of tumor-specific memory which can be even improved in the presence of conventional hormone therapies, thereby significantly prolonging patients' survival.

Besides gene mutations, oncogenic pathways in breast cancer can be activated via gene overexpression. For instance, overexpression of the cyclin D/ cyclin-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) complex has been associated with oncogenes in various types of cancers with a much higher incidence in Luminal B vs Luminal A breast cancers [25] which may suggest a link between CDK4/6 overexpression with CD8+ T lymphocyte tumor infiltration. Moreover, there are studies to demonstrate modulation of the tumor microenvironment by CDK4/6 inhibitors in favor of antitumor immunity. Thus, CDK4/6 inhibitors have been reported to potentiate tumor-specific T-cell immunity by downregulating immunosuppressive tumor cell infiltrates including Tregs and myeloid populations, and also to augment antitumor CD8+ T cell-mediated antitumor cytotoxicity via increase of tumor immunogenicity [26]. Such immunoenhancing effects may pave the way for the design of novel therapeutic modalities combining CDK4/6 inhibitors with immune checkpoint blockade.

On the other hand, Tregs appear as inhibiting cancer progression by suppressing cancer-promoting inflammatory processes [27]. To this end, recent studies reported that increased frequencies of FOXP3+ Tregs were associated with improved prognosis in some tumors, such as colorectal cancer and bladder cancer [28]. So far there are no results to provide a mechanistic explanation for the functional dichotomy of Tregs. One reason could be that the prognostic effect of FOXP3+ Tregs is determined by the tumor microenvironment which is unique for each tumor depending on various parameters including tumor biology, the anatomic site where the tumor grows and host factors (e.g., microbiota, local cytokine milieu). Second, there are no phenotypic markers fully restricted to Tregs which provide a serious obstacle when applying methodologies for their isolation and functional analysis. For instance, FOXP3 and CD25 which are widely being used as phenotypic markers for Tregs, are also expressed on activated CD4+ T-helper cells which could contaminate Tregs preparations and leading to misinterpretations. Moreover, the prognostic value of Tregs is correlated with tumor stage or molecular subtype. Therefore, it will be essential to further improve our understanding of the biology and functional programs of Tregs in different human cancers so to be able to use these cells as useful biomarkers, but also as targets for immunotherapy.

During the past decade results from various studies have ascribed a multifaceted role for macrophages within the tumor microenvironment. Based on phenotype analyses there are various subsets of tumor-associated macrophages (TAMs) which play a significant role for tumor initiation and progression. In general terms, TAMs can be classified in M1 inflammatory and M2 anti-inflammatory subsets with distinct phenotypes and functions regulating tumor proliferation, progression and angiogenesis through the release of cytokines, chemokines and growth factors [29, 30]. In particular, M2 TAMs have been demonstrated to exert protumoral functions in various types of solid malignancies but also in hematological cancers [29]. In breast cancer, CD163 positive M2 TAMs have been associated with tumor progression to invasive carcinomas [31]. Moreover, there are studies to suggest that the spatial distribution of CD163+ cells intratumorally may determine their clinical relevance [32, 33].

Although the central role of the immune system and particularly of T lymphocytes for controlling tumor growth has been widely accepted by the scientific community, still it remains a challenging issue why TILs cannot successfully eradicate tumors. This kind of controversy results from the fact that TILs are usually identified and characterized based on their phenotypic profiles and not their functional status. Accumulating data show that TILs have become functionally silent via a plethora of immunosuppressive and immune resistance mechanisms emerging in the tumor microenvironment. Such inert TILs should appear at the late stages of the escape phase under the immunoediting process during which the tumor microenvironment becomes quite hostile for TILs. Thus, we can hypothesize that by the time human cancers become clinically detectable, at least at the early phase of their detection, the adaptive immune response is still active playing a significant role in slowing down tumor growth rates. TILs may still be capable of controlling tumor growth in a way that prolongs OS, thus delaying progression to the advanced stages of the disease. This has been recently shown by us for patients with advanced, non-metastatic, invasive ductal carcinoma who had similar frequencies of relapse and OS with early stage patients provided they had a favorable composition of TILs [32]. It is also plausible that tumor infiltration by antitumor effectors (e.g., CD8+ CTLs) and consequently the levels of intratumoral antitumor immunity, could be determined by a combination of several parameters including, TMB, MHC and tumor antigen expression, and cytokines/chemokines released by the tumor. Therefore, the strength of the antitumor endogenous immunity exerted by TILs during the early stages of the disease could be a major parameter significantly controlling tumor evolution. The proposed immune classification of colorectal cancer patients based on the density, type and localization of TILs (comprising the "immunoscore") has a prognostic value that is superior to the standard TNM classification [9]. Considering that

the immunoscore reflects to a great extent the magnitude of the anticancer endogenous immune response, it is imperative to identify cellular immune signatures functioning not only as reliable prognostic factors, but also predicting responses to therapeutic treatments as this has been shown in neoadjuvant and adjuvant chemotherapies in breast and colorectal cancer.

TILs in breast cancer

Among the various molecular subtypes in breast cancer, those characterized as triple-negative or HER2-positive, in their majority have dense immune infiltrates [34]. There are studies to show that strong infiltration of lymphocytes in the tumor tissue (occasionally designated as lymphocyte-predominant breast cancer) may predict response to neoadjuvant therapy and also may have a significant prognostic value after adjuvant chemotherapy [35]. This is an important issue which is in line with recent clinical reports showing that chemotherapies can induce clinical benefit if successfully activating the endogenous TIL-mediated antitumor immunity. There is now an increasing body of reports to show that chemotherapy can exert beneficial effects within the tumor immune microenvironment through various mechanisms including the increase of (i) CTLs and NK cells function; (ii) Th1 cytokine release; (iii) tumor cells immunogenicity; and (iv) macrophages/DCs antigen presenting capacity. Chemotherapies may also promote antitumor immunity via mechanisms decreasing the densities of Tregs and MDSCs, as well as the release of suppressor enzymes [36–39]. In particular, chemotherapeutic drugs applied for breast cancer treatment, such as anthracyclines and taxanes, are efficient in triggering immunogenic tumor cell death, thereby triggering an immune response in TILs via cross-presentation of tumor antigens by mature DCs [37]. In similar lines, Denkert et al. [40] studied intratumoral lymphocytes in pretherapy core biopsies of breast cancer patients receiving anthracyclines/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and reported a dependence of pathologic complete responses on lymphocytic infiltrates. The authors proposed a re-activation of the endogenous antitumor immunity via presentation of tumor protein antigenic epitopes released by chemotherapy-induced tumor cell death. This suggested that chemotherapy may function as an immunopotentiator in patients whose tumors have triggered endogenously antitumor immune responses.

Cyclophosphamide and gemcitabine, which are also being used for breast cancer treatment, indirectly stimulate TIL-mediated adaptive immune responses via reduction of immunosuppressive elements [41]. Hence, chemotherapy, besides being tumoricidal, may additionally have an immunotherapeutic effect via stimulation of immune responses

in TILs leading to complete clinical responses [42]. Consequently, it is conceivable that the endogenous antitumor immunity in the form of TILs confirms the presence of underlying immune pathways in breast cancer supporting the notion that this type of cancer is immunogenic and amenable to immunotherapeutic regimens. Because different immune-cell infiltrates may induce variations in clinical response rates during systemic therapies, it is important to analyze quantitatively as well as qualitatively TILs in the various compartments of breast tumors to be able to use them as potential prognostic and predictive biomarkers. Nevertheless, clinical studies are needed with a special focus on combinatorial treatments to determine the sequence and dosing of chemoimmunotherapies based on the assumption that the kinetics of development of antitumor responses are critical for the magnitude of clinical responses. To this end, we should keep in mind that despite robust clinical efficacy such combinatorial modalities may induce significant toxicity. Therefore, it is imperative to design trials to define the minimal dosage of combined chemoimmunotherapeutics causing maximal immune activation with minimal toxicity.

Differential distribution of immune infiltrates in the tumor compartments

The complex interactions between immune infiltrates and the tumor microenvironment is very crucial for determining tumor progression and clinical outcome. In various types of cancer, the type and densities of immune subsets have been associated with clinical outcomes. In the majority of human cancers increased densities of CD3+, CD8+ and memory CD45RO+ T cells in the various tumor compartments are associated with favorable prognosis. In colorectal cancer, densities of CD8+ T cells were decreased along with tumor progression, suggesting that intratumoral immune signatures can function as potential markers predicting tumor relapses and overall survival [9]. Nevertheless, this concept may not be unambiguous since in some malignancies, including B-cell lymphoma, Hodgkin lymphoma and clear cell renal cell carcinoma, high densities of tumor-infiltrating CD8+ T cells have been associated with poor prognosis [6]. Certainly, the prognostic value of CD8+ T cells may be influenced by other types of immune-cell infiltrates capable of negatively regulating their functional program. This could also represent another type of acquired immune resistance whereby tumor cells, under immune pressure by high density cytotoxic CD8+ T cells, attract intratumorally suppressor elements to counteract such an immune attack, or become immune-resistant by altering their phenotype. Therefore, detailed information concerning not only the abundance and type of TILs, but also their functional programs as well as their spatial locations is needed to have a more accurate

information of their role as prognostic biomarkers [43]. For instance, in colorectal cancer, high densities of CD3+ T cells at the invasive margin were significantly associated with disease-free survival, whereas CD8+ T cells infiltrating the tumor stroma could predict breast cancer-specific survival. Moreover, a high degree of stromal immune infiltration was found to be associated with increased disease-specific survival in ER-negative/HER2-negative breast cancer patients [44, 45]. Notably, some groups reported that this favorable prognosis, due to the abundance of immune infiltrates, was dependent on the levels of “hotspots” defined as the co-localization of cancer and immune cells. In this way they could identify groups of patients with low hotspot scores who, regardless of high or low immune infiltrates, had a similar poor prognosis [46]. More recently, Miyan et al. studied T-cell infiltration in the various molecular subtypes of breast cancer and found low ratios of CD8+ and FOXP3+ T cells in TC and IM which were associated with poor prognosis [47].

One reasonable question then is what causes such differential distributions of immune cells among the tumor compartments and how this is linked to clinical outcome. A crucial factor that could account for this concerns the biological properties of the tumor. This is supported by a broad range of inflammatory gene and protein signatures within the tumor as determined by high throughput technologies. Such signatures include information for (i) factors related to Th1 or Th2 adaptive immunity; (ii) immune effector or cytotoxic factors; (iii) chemokine ligands, chemokines, and adhesion molecules and (iv) regulatory molecules. These signatures are heterogeneous among tumor types and may contribute to differences in vascularization, high endothelial venule (HEV) density, tumor antigenicity, tumor suppressor potential and chemokine/cytokine profiles, all of which can influence to various levels the density and function of intratumoral immune cells as well as their spatial localization within tumor regions predicting patient survival [48].

To this end, of particular interest is the association of CD8+ T-cell infiltration with the immunogenic TMB. Accumulating evidence suggests that patients’ tumors with somatic nonsynonymous coding mutations have elevated expression of tumor-specific neoantigens and elevated counts of CD8+ TIL [49, 50]. Among the dense CD8+ T-cell infiltrates, are tumor-reactive clones recognizing tumor expressed neoantigens [5, 51]. Nevertheless, it appears that missense mutations generating endogenous tumor reactivity are relatively rare. This is due to the fact that only few mutations per tumor are immunogenic, and tumors with a higher mutational burden have increased chances of expressing immunogenic neoantigens. However, there are many tumors having high CD8+ infiltrates albeit with few or no predicted immunogenic missense mutations suggesting that in these tumors, immunogenic neoantigenic

epitopes attracting CD8+ T cells have been generated by other conditions of genetic hypermutability, mainly including that of microsatellite instability [52]. Alternatively, during the process of immune editing, tumor clones with immunogenic missense mutations may have been selectively recognized and deleted resulting in the accumulation of CD8+ T cells. Irrespective of the mechanism(s) that may lead to imbalances between CD8+ T-cell densities and mutational load, tumor areas overpopulated by tumor cells may attract tumor-reactive CD8+ T cells resulting in the generation of an inflammatory milieu with release of MIP-3b attracting DCs and thus completing the picture of a sustainable local antitumor immune response [53, 54]. DCs, in turn, may facilitate the accumulation of TILs at specific tumor compartments through generation and maintenance of HEV intratumorally [55]. In breast cancer, HEV number and density are highly correlated with the extravasation of immune effector and memory T lymphocytes into the tumor, which was correlated with improved clinical outcomes [56]. Moreover, patients with high lymphatic vessels in the IM of their tumors had high levels of cytotoxicity and reduced metastases [57] ascribing antitumor properties to lymphatic vascularization via facilitated immune-cell infiltration and prevention of metastatic invasions at the IM.

Intratumoral immune infiltrates and signatures in patients with breast cancer

As outlined above, the spatiotemporal tumor infiltration by immune cells is a dynamic process which depends on multiple factors released by various cells, also including tumor cells, which attract TILs at distinct tumor areas followed by the generation of pro-inflammatory or immunosuppressive pathways. With TILs migrating to the different tumor areas, considerable levels of heterogeneity, both in terms of cell-types and function, are generated which suggests that their separate and combined evaluation in well-defined tumor regions would be valuable [32]. To this end, there are reports to show that combined density analyses for memory (CD45RO+) and cytotoxic markers in TC and IM could be useful for precisely predicting tumor recurrences and survival for different patient groups in colorectal cancer [58, 59]. Although the concept of evaluating immune infiltration in breast cancer and making correlations with clinical outcomes is not new, yet there have been few consistent data on the differential distribution of immune cells in the tumor areas and their combined evaluation as reliable prognosticators. The presence of TILs in either the stromal or intratumoral compartment was valuable for the outcome of neoadjuvant therapies [60]. Spatial heterogeneity in the co-localization of tumor cells and TILs was found to play a prominent role for clinical outcome in ER-negative breast

cancer [43] regardless the abundance of TILs infiltration, underlying the need to study heterogeneity of spatial distribution in addition to measuring abundance of microenvironmental components. Further to this, Miyan et al. demonstrated differential densities of CD3+ and CD8+ cells in the TC and IM among the different molecular subtypes of BCa, but they did not address their clinical relevance [47].

Our retrospective analyses of CD8+ and CD163+ cells in TC and IM as single subpopulations or jointly, provided first information regarding the role of spatial heterogeneity of immune infiltrates on the frequency of relapses and overall survival in patients with breast cancer [32]. Our study was designed to answer novel questions. First, can combined analyses of immune infiltrates (CD8+ or CD163+ cells) in the tumor regions (TC and IM) provide advantages over single region analyses for patient prognosis? Second, can the combined evaluation of CD8+ and CD163+ cell densities jointly in TC and IM improve prognosis? Third, how does the immune infiltration in the tumor compartments compare with clinicopathological parameters regarding clinical prognosis? Starting with single CD8+ or CD163+ cell analyses in either TC or IM, we could hardly find statistical correlations with the frequency of tumor recurrence or survival [except in the case of low vs high CD8+ cell densities in the IM which correlated with disease-free survival (DFS)]. As expected, both DFS and OS were correlated with standard TNM staging, grade, tumor size and invaded lymph nodes. This first part of our analyses demonstrated that neither CD8+ nor CD163+ cell densities could contribute to prognosis when separately analyzed in either TC or IM. By analyzing each one of these subsets in TC and IM, we found that high densities of CD8+ cells in the TC concomitantly with low ones in the IM (referred to as HL) predict significantly better DFS and OS compared with the inverse densities of CD8+ cells in the combined tumor regions (i.e., CD8+ low in the TC and CD8+ high in the IM; referred to as LH) [32]. This suggests that CTL (assuming that in our case the CD8+ cells are cytotoxic) represent a prognostic biomarker, and further delineates the importance of their spatial distribution in high or low numbers, which can help refining their predictive capability on patients' clinical outcome. Interestingly, when DFS and OS were assessed based on CD163+ cell densities, patients with LH densities (i.e., TC low and IM high densities) had significantly increased DFS or prolonged OS compared to patients with the inverse densities of CD163+ cells, namely high in TC and low in IM (HL). Next, we assessed these CD8+ and CD163+ cell density profiles for complementarity. The patients were separated into 2 groups. The 1st group included patients with CD8HL or CD163LH (also including those patients with CD8HL and CD163LH); this constituted the favorable combined immune signature (FCIS). In the 2nd group we have included patients with CD8LH or CD163HL (and patients with CD8LH and

CD163HL, but not CD8HL or CD163 LH); this constituted the unfavorable combined immune signature (UCIS) (Fig. 1). We found that the combined immune signatures had a much higher prognostic significance for both DFS and OS as compared to the single ones. Given that this type of analyses was performed with the total patient population, we were keen to analyze the prognostic value of FCIS vs UCIS in subgroups of patients based on their clinicopathologic characteristics. Our data consistently showed that the FCIS had a robust favorable prognostic value in patients with poor clinicopathologic parameters: patients having the FCIS and poor clinicopathologic parameters (i.e., undifferentiated grade 3 tumors, large T2,3 tumors, invaded lymph nodes, and advanced disease) had similar DFS and OS with patients having favorable prognosis (i.e., grade 1,2/T1 tumors, non-invaded lymph nodes and early disease) [32]. Ongoing studies in our laboratory show that, in the vast majority of these patients, high CD8+ cell densities in the tumor compartments (TC and/or IM) are accompanied by high densities of FoxP3+ cells which could be explained as a mechanism

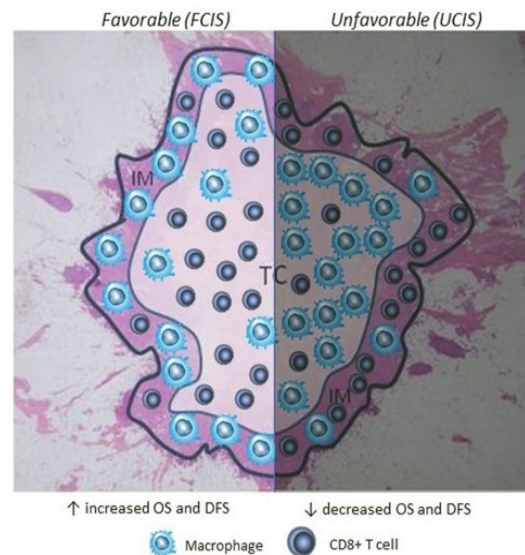


Fig. 1 A Schematic representation of intratumoral FCIS and UCIS. The former is characterized by high CD8+ cell densities and low CD163+ ones within the TC combined with inverse densities for the same subsets in the IM. Mechanistically this could be explained via chemical gradients consisting of chemokines released by the tumor cells which attract CD8+ cells into the TC leaving only sparse CD8+ cells in the IM. In contrast, CD163+ cells are not affected by such gradients thus remaining in the IM and allowing the CD8+ cells in the TC to develop efficient antitumor reactivity resulting in improved clinical outcomes. In the UCIS the intratumoral cellular densities are inverse (i.e., low CD8+ and high CD163+ cell densities in the TC combined with high CD8+ and low CD163+ cell densities in the IM) which may be explained by different chemokine gradients through different tumor-released chemokine patterns

of acquired immune resistance. This was supported by data showing that low densities of CD8+ cells in these compartments did not attract high numbers of FoxP3+ cells and this was correlated with favorable clinical outcomes.

Future perspectives

Advances in tumor biology along with improvements in our understanding of the dynamic interplay between the immune system and tumor cells are of pivotal importance for disease evolution. Reports from various clinical trials offer now accumulating evidence to propose a link between divergent tumor biology with the composition of tumor microenvironment and activation of tumor-specific adaptive immunity. The majority of cancers at diagnosis may have evaded immune surveillance, but nevertheless, residual anticancer immune responses in the form of preexisting immunity could have significant prognostic and predictive roles. Although this has been explored in many cancer types, including breast cancer, ongoing investigations on the contribution of the tumor microenvironment to prediction and prognosis will surely provide additional fundamental information. So far, knowledge derived from the immune contexture of a tumor yields information on the spatial distribution of immune infiltrates which undoubtedly improves standard clinicopathological criteria for clinical outcomes. Our studies have an important contribution to this, demonstrating for the first time that differential densities of immune infiltrates jointly assessed in the TC and IM have a robust prognostic value in breast cancer patients with poor clinicopathological parameters. To this end we have shown that favorable prognostic features include the dense presence of T-lymphocyte subsets supporting cytotoxic responses (e.g., CD8+ cells) in TC along with low densities of immunosuppressive elements (e.g., CD163+ cells) combined with the inverse cell densities in IM (i.e., low CD8+ and high CD163+ cell densities). Of course, our findings do not preclude other types of cells with prognostic significance in the tumor microenvironment. Thus, clinical research should focus to further evaluation of the potential prognostic and predictive role of cells constituting the preexisting immunity in tumors. Through this, we may have better chances to select patients who most likely will benefit from therapeutic modalities targeting immunomodulatory molecules to reinforce the endogenous antitumor immunity.

Another important aspect that should be explored for biomarker discovery is that of T-cell functionality. It will be namely essential to identify CD8+ T cells capable of mediating antitumor cytotoxic responses and not being anergic or exhausted. T-cell functionality depends on the expression of immune checkpoints mostly as a result of increased tumor mutational load and expression of neoantigens [50, 61]. The

latter represent another factor which strongly impacts the outcome of intratumoral immune responses. Depending on the modus of their expression, neoantigens may influence such responses in opposite directions: tumors exhibiting clonal expression of neoantigens have an increased likelihood of responding to checkpoint blockade and highly clonal tumors are more immunogenic than their more heterogeneous counterparts [5]. The latter only poorly respond to immunotherapies. Nevertheless, mutational load leading to the formation of neoantigens, is not the only factor which may determine the outcome of an anticancer immune response. Several studies suggested that additional biomarkers, including copy number alterations affecting particular genes and signaling pathways, correlate with poor T-lymphocyte tumor infiltrates, and may function as valuable predictive biomarkers for clinical outcomes after immune checkpoint therapies [20, 62, 63]. Given that lack of clinical responses after immune checkpoint inhibition in heterogeneous tumors correlates with absence or low T-cell infiltration, it is conceivable that lack of T-cell-based immunoselection during immunoediting results in tumors that escape immunosurveillance. Thus, combining the mutational load with the copy number alterations, may predict more accurately clinical response to immune checkpoint inhibition. This intratumoral network which applies for the majority of cancers has led to the application of combined therapeutic modalities including standard chemotherapy, targeted agents and immunotherapies with impressive clinical achievements in some patients [64]. Moreover, distinct immunotherapies aiming at reversing immune suppression in the tumor microenvironment induced prolonged clinical responses [23].

Conclusions

There is now compelling evidence on the prognostic and predictive role of TILs. It is a general consensus that higher numbers of TILs are linked to higher probability to achieve clinical responses. In the light of the impressive clinical results with immune checkpoint inhibitors based on the reactivation of the endogenous antitumor immunity, the presence and type of TILs will be used as a guide to inform decisions on systemic therapy. However, there is a serious obstacle which may hinder the field moving forward, namely tumor heterogeneity may prove to be a confounding factor towards validation of TIL prognostic and predictive biomarkers. Inventing therapeutic modalities to generate robust host immune response and enable tumor control are therefore required to circumvent this problem. For this it will be mandatory to improve our knowledge about the immune circuits which regulate antitumor T-cell reactivity in the tumor microenvironment to develop strategies for further improving clinical results from cancer immunotherapies.

Author Contributions Constantin N. Baxevanis conceived the manuscript. All authors wrote and edited the manuscript and approved its final version.

Funding No relevant funding.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A (2017) Primary, Adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168(4):707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2):137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Zhu J, Petit PF, Van den Eynde BJ (2018) Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. *Cancer Immunol Immunother*. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2269-y>
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J (2010) Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 22(2):215–222. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.006>
- Spranger S (2016) Tumor heterogeneity and tumor immunity: a chicken-and-egg problem. *Trends Immunol* 37(6):349–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.008>
- Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G (2017) The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 14(12):717–734. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
- Baxevanis CN, Perez SA (2015) Cancer dormancy: a regulatory role for endogenous immunity in establishing and maintaining the tumor Dormant state. *Vaccines (Basel)* 3(3):597–619. <https://doi.org/10.3390/vaccines3030597>
- Vano YA, Petitprez F, Giraldo NA, Fridman WH, Sautes-Fridman C (2018) Immune-based identification of cancer patients at high risk of progression. *Curr Opin Immunol* 51:97–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.005>
- Church SE, Galon J (2017) Regulation of CTL infiltration within the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1036:33–49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_3
- Fang D, Zhu J (2017) Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *J Exp Med* 214(7):1861–1876. <https://doi.org/10.1084/jem.20170494>
- Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y (2015) Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 5:15179. <https://doi.org/10.1038/srep15179>
- Whiteside TL (2014) Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother* 63(1):67–72. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1490-y>
- Whiteside TL (2015) The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther* 4:159–171. <https://doi.org/10.2147/ITT.S55415>
- Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J (2016) Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 16:687. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2732-0>
- Whiteside TL (2012) Disarming suppressor cells to improve immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 61(2):283–288. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1171-7>
- Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Kurata K, Noda S, Takashima T, Onoda N, Tanaka S, Ohsawa M, Hirakawa K (2016) Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg* 103(7):845–854. <https://doi.org/10.1002/bjs.10127>
- Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A, Tada H, Watanabe G, Nemoto N, Nakagawa S, Ishida T, Ohuchi N (2014) Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 148(3):525–534. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3197-y>
- Nabholtz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Dauplat MM, Weber B, Gligorov J, Forest AM, Tredan O, Vanlemmens L, Petit T, Guiu S, Van Praagh I, Jouannaud C, Dubray-Longeras P, Tubiana-Mathieu N, Benmammar KE, Kullab S, Bahador MR, Radosevic-Robin N, Kwiatkowski F, Desrichard A, Cayre A, Uhrhammer N, Chalabi N, Chollet P, Penault-Llorca F (2014) Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol* 25(8):1570–1577. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu183>
- Chan MS, Wang L, Felizola SJ, Ueno T, Toi M, Loo W, Chow LW, Suzuki T, Sasano H (2012) Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients—an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers* 27(4):e295–e304. <https://doi.org/10.5301/IJBM.2012.10439>
- McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, Watkins TB, Shafi S, Murugaesu N, Mitter R, Akarca AU, Linares J, Marafioti T, Henry JY, Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Schadendorf D, Garraway LA, Makarov V, Rizvi NA, Snyder A, Hellmann MD, Merghoub T, Wolchok JD, Shukla SA, Wu CJ, Peggs KS, Chan TA, Hadrup SR, Quezada SA, Swanton C (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 351(6280):1463–1469. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1490>
- Creighton CJ (2012) The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics* 6:289–297. <https://doi.org/10.2147/BTT.S29923>
- Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, Klauschen F, Lennerz JK, Gyorffy B, Dietel M, Loibl S, Weichert W, Stenzinger A (2015) Classical pathology and mutational load of breast cancer—integration of two worlds. *J Pathol Clin Res* 1(4):225–238. <https://doi.org/10.1002/cjp.225>
- Munn DH, Bronte V (2016) Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 39:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.009>
- Rothenberger NJ, Somasundaram A, Stabile LP (2018) The Role of the Estrogen Pathway in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020611>
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, McHenry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Taberner J, Baselga J, Tsao

- MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463(7283):899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
26. Teh JLF, Aplin AE (2018) Arrested Developments: CDK4/6 Inhibitor Resistance and Alterations in the Tumor Immune Microenvironment. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1967>
 27. Whiteside TL (2014) Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14(10):1411–1425. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.927432>
 28. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH (2012) The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 18(11):3022–3029. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3216>
 29. Ruffell B, Coussens LM (2015) Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 27(4):462–472. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.015>
 30. Santoni M, Massari F, Amantini C, Nabissi M, Maines F, Burattini L, Berardi R, Santoni G, Montironi R, Tortora G, Cascinu S (2013) Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 62(12):1757–1768. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1487-6>
 31. Hoskoppal D, Reisenbichler ES (2018) Can tumor-associated macrophages in ductal carcinoma in situ (DCIS) on biopsy predict invasive carcinoma on excision? *Hum Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.07.023>
 32. Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, Haritos C, Vaxevanis CK, Anastasopoulou EA, Janssen N, Arnoyiannaki N, Ardavanis A, Pawelec G, Perez SA, Baxevanis CN (2017) Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. *J Immunother Cancer* 5:39. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0240-7>
 33. Wu SQ, Xu R, Li XF, Zhao XK, Qian BZ (2018) Prognostic roles of tumor associated macrophages in bladder cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 9(38):25294–25303. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25334>
 34. Pfitzner BM, Lederer B, Lindner J, Solbach C, Engels K, Rezai M, Dohal K, Tesch H, Hansmann ML, Salat C, Beer M, Schneeweiss A, Sinn P, Bankfalvi A, Darb-Esfahani S, von Minckwitz G, Sinn BV, Kronenwett R, Weber K, Denkert C, Loibl S (2018) Clinical relevance and concordance of HER2 status in local and central testing-an analysis of 1581 HER2-positive breast carcinomas over 12 years. *Mod Pathol* 31(4):607–615. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.171>
 35. Denkert C, Wienert S, Poterie A, Loibl S, Budczies J, Badve S, Bago-Horvath Z, Bane A, Bedri S, Brock J, Chmielik E, Christgen M, Colpaert C, Demaria S, Van den Eynden G, Floris G, Fox SB, Gao D, Ingold Heppner B, Kim SR, Kos Z, Kreipe HH, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Pruneri G, Radosevich-Robin N, Rimm DL, Schnitt SJ, Sinn BV, Sinn P, Sirtaine N, O'Toole SA, Viale G, Van de Vijver K, de Wind R, von Minckwitz G, Klauschen F, Untch M, Fasching PA, Reimer T, Willard-Gallo K, Michiels S, Loi S, Salgado R (2016) Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Mod Pathol* 29(10):1155–1164. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.109>
 36. Zheng H, Zeltsman M, Zauderer MG, Eguchi T, Vaghjiani RG, Adusumilli PS (2017) Chemotherapy-induced immunomodulation in non-small-cell lung cancer: a rationale for combination chemioimmunotherapy. *Immunotherapy* 9(11):913–927. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0052>
 37. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8(1):59–73. <https://doi.org/10.1038/nri2216>
 38. Liljenfeldt L, Gkirtzimanaki K, Vyrila D, Svensson E, Loskog AS, Eliopoulos AG (2014) Enhanced therapeutic anti-tumor immunity induced by co-administration of 5-fluorouracil and adenovirus expressing CD40 ligand. *Cancer Immunol Immunother* 63(3):273–282. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1507-6>
 39. Fritzell S, Sanden E, Eberstal S, Visse E, Darabi A, Siesjo P (2013) Intratumoral temozolomide synergizes with immunotherapy in a T cell-dependent fashion. *Cancer Immunol Immunother* 62(9):1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1449-z>
 40. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hansasch C, von Torne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G (2010) Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28(1):105–113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>
 41. Vacchelli E, Enot DP, Pietrocola F, Zitvogel L, Kroemer G (2016) Impact of pattern recognition receptors on the prognosis of breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy. *Cancer Res* 76(11):3122–3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0294>
 42. Menard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F (2008) Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 57(11):1579–1587. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0505-6>
 43. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y (2015) Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol* 28(12):1621. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.133>
 44. Dushyanthen S, Beavis PA, Savas P, Teo ZL, Zhou C, Mansour M, Darcy PK, Loi S (2015) Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med* 13:202. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0431-3>
 45. Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S (2017) Clinical validity and utility of tumor-infiltrating lymphocytes in routine clinical practice for breast cancer patients: current and future directions. *Front Oncol* 7:156. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00156>
 46. McIntire PJ, Irshaid L, Liu Y, Chen Z, Menken F, Nowak E, Shin SJ, Ginter PS (2018) Hot spot and whole-tumor enumeration of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes utilizing digital image analysis is prognostic in triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.04.019>
 47. Miyayama M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, de Boniface J (2016) Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med* 14(1):227. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0983-9>
 48. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39(1):11–26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.008>
 49. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen MHG, Goldinger SM, Utikal J, Hassel JC, Weide B, Kaehler KC, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu CJ, Schadendorf D, Garraway LA (2015) Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350(6257):207–211. <https://doi.org/10.1126/science.aad0095>

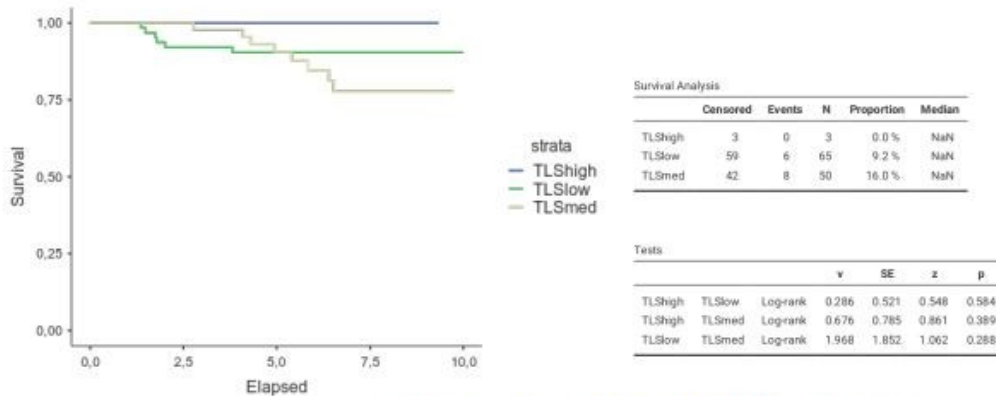
50. Popovic A, Jaffee EM, Zaidi N (2018) Emerging strategies for combination checkpoint modulators in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 128(8):3209–3218. <https://doi.org/10.1172/JCI120775>
51. Gajewski TF, Corrales L, Williams J, Horton B, Sivan A, Spranger S (2017) Cancer immunotherapy targets based on understanding the T cell-inflamed versus non-T cell-inflamed tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1036:19–31. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_2
52. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, Church SE, Lafontaine L, Fischer M, Fredriksen T, Sasso M, Bilocq AM, Kirilovsky A, Obenauf AC, Hamieh M, Berger A, Bruneval P, Tuech JJ, Sabourin JC, Le Pessot F, Mauillon J, Raffi A, Laurent-Puig P, Speicher MR, Trajanoski Z, Michel P, Sesboue R, Frebourg T, Pages F, Valge-Archer V, Latouche JB, Galon J (2016) Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity* 44(3):698–711. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.025>
53. Tokalov SV, Abolmaali ND (2010) Protection of p53 wild type cells from taxol by nutlin-3 in the combined lung cancer treatment. *BMC Cancer* 10:57. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-57>
54. Middel P, Brauneck S, Meyer W, Radzun HJ (2010) Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 10:578. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-578>
55. Moussion C, Girard JP (2011) Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479(7374):542–546. <https://doi.org/10.1038/nature10540>
56. Martinet L, Garrido I, Filleron T, Le Guellec S, Bellard E, Fournie JJ, Rochaix P, Girard JP (2011) Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 71(17):5678–5687. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0431>
57. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, Church SE, Maby P, Vasaturo A, Angelova M, Fredriksen T, Mauger S, Waldner M, Berger A, Speicher MR, Pages F, Valge-Archer V, Galon J (2016) The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* 8(327):327ra326. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6352>
58. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27(35):5944–5951. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.6147>
59. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F, Galon J (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29(6):610–618. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5425>
60. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, Pfitzner BM, Salat C, Loi S, Schmitt WD, Schem C, Fisch K, Darb-Esfahani S, Mehta K, Sotiriou C, Wienert S, Klare P, Andre F, Klauschen F, Blohmer JU, Krappmann K, Schmidt M, Tesch H, Kummel S, Sinn P, Jackisch C, Dietel M, Reimer T, Untch M, Loibl S (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol* 33(9):983–991. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.1967>
61. Miao D, Margolis CA, Vokes NI, Liu D, Taylor-Weiner A, Wankowicz SM, Adeegbe D, Kelihir D, Schilling B, Tracy A, Manos M, Chau NG, Hanna GJ, Polak P, Rodig SJ, Signoretti S, Sholl LM, Engelman JA, Getz G, Janne PA, Haddad RI, Choueiri TK, Barbie DA, Haq R, Awad MM, Schadtendorf D, Hodi FS, Bellmunt J, Wong KK, Hammerman P, Van Allen EM (2018) Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors. *Nat Genet* 50(9):1271–1281. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0200-2>
62. Kato S, Goodman A, Walavalkar V, Barkauskas DA, Sharabi A, Kurzrock R (2017) Hyperprogressors after immunotherapy: analysis of genomic alterations associated with accelerated growth rate. *Clin Cancer Res* 23(15):4242–4250. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3133>
63. Miao D, Margolis CA, Gao W, Voss MH, Li W, Martini DJ, Norton C, Bosse D, Wankowicz SM, Cullen D, Horak C, Wind-Rotolo M, Tracy A, Giannakis M, Hodi FS, Drake CG, Ball MW, Allaf ME, Snyder A, Hellmann MD, Ho T, Motzer RJ, Signoretti S, Kaelin WG Jr, Choueiri TK, Van Allen EM (2018) Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science* 359(6377):801–806. <https://doi.org/10.1126/science.aan5951>
64. Galon J, Bruni D (2019) Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 18(3):197–218. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0007-y>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

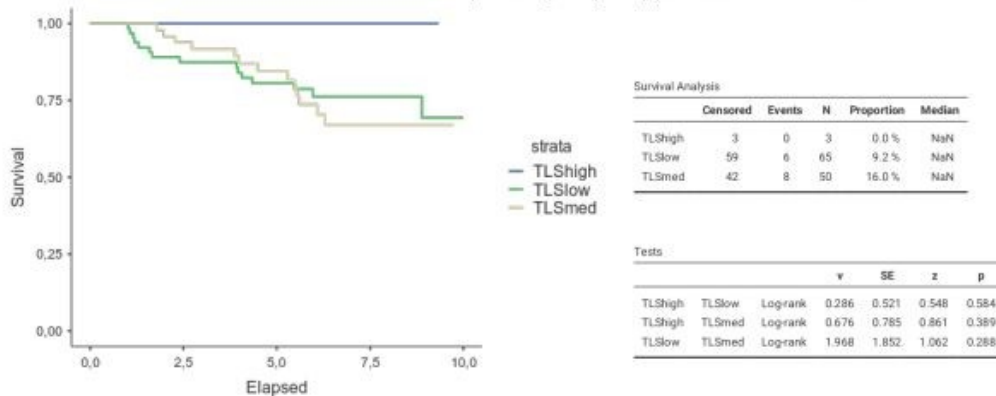
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ – ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer. M.Sofopoulos***, S.Fortis*, C.Vaxevanis, N.Sotiriadou, N.Arnogiannaki, A.Ardavanis, D. Vlachodimitropoulos, S. Perez, C. Baxevanis 19th international conference on progress in vaccination against cancer (PIVAC) 7-9 June 2019 Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.
- **Tertiary Lymphoid Structures in breast cancer: Evaluating their correlation with tumor immune-cell infiltration and clinical outcome. Michael Sofopoulos**, Christoforos K. Vaxevanis, Sotirios P. Fortis, Nectaria N. Sotiriadou, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Dimitrios Vlachodimitropoulos, Constantin N. Baxevanis, Sonia A. Perez. 3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy. Athens 2-4 November 2017
- **Η πιθανή προγνωστική σημασία των τριτογενών λεμφοειδών δομών (TLS) στον καρκίνο του μαστού. Μ. Σοφόπουλος¹, Σ. Φόρτης², Χ. Βαξεβάνης², Ν. Σωτηριάδου¹, Ν. Αρνογιαννάκη¹, Α. Αρδαβάνης³, Δ. Βλαχοδημητρόπουλος⁴, Κ. Μπαξεβάνης², Σ. Πέρεζ². ¹Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», ²Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθερα-πείας του Καρκίνου, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», ³Α' Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», ⁴Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ.45^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 15-19 Μαΐου 2019.**

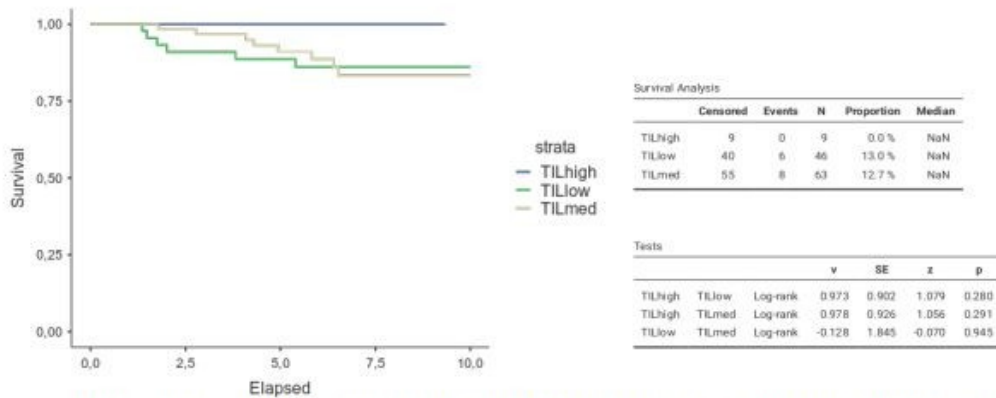
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ



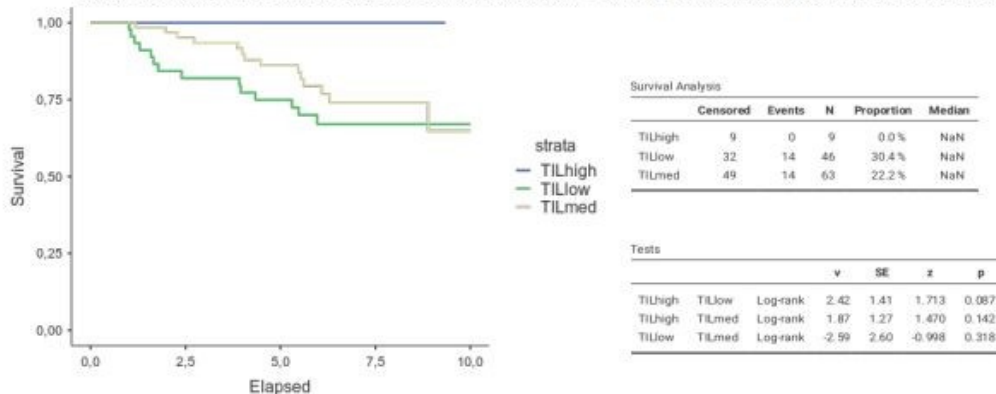
Εικόνα 1:Περινεοπλασματική κάλυψη από TLS και OS κατά Lee et al



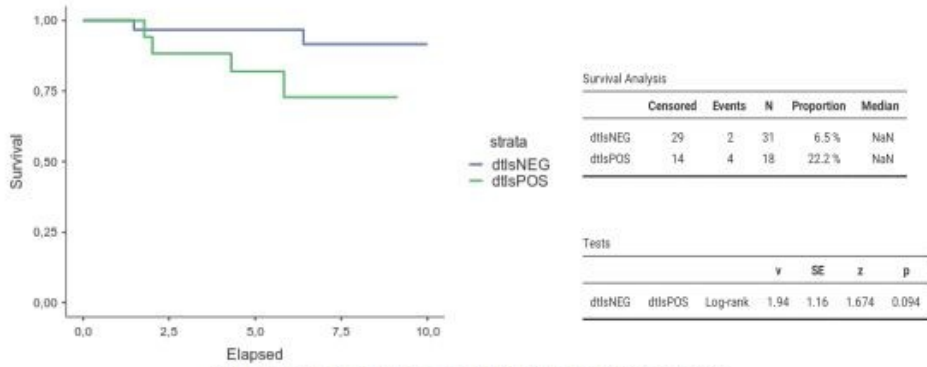
Εικόνα 2:Περινεοπλασματική κάλυψη από TLS και DFS κατά Lee et al



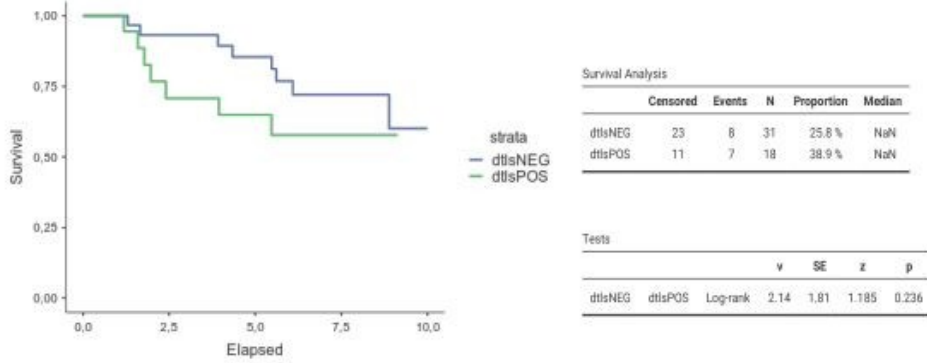
Εικόνα 3:TILs και OS στο παρόν δείγμα κατά International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer



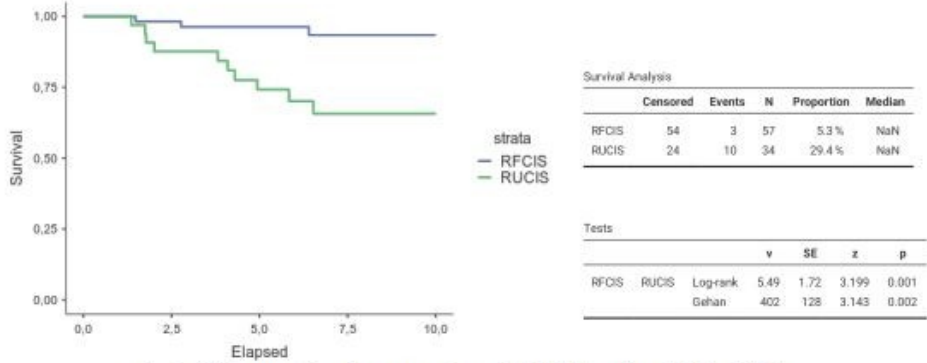
Εικόνα 4:TILs και DFS στο παρόν δείγμα κατά International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer



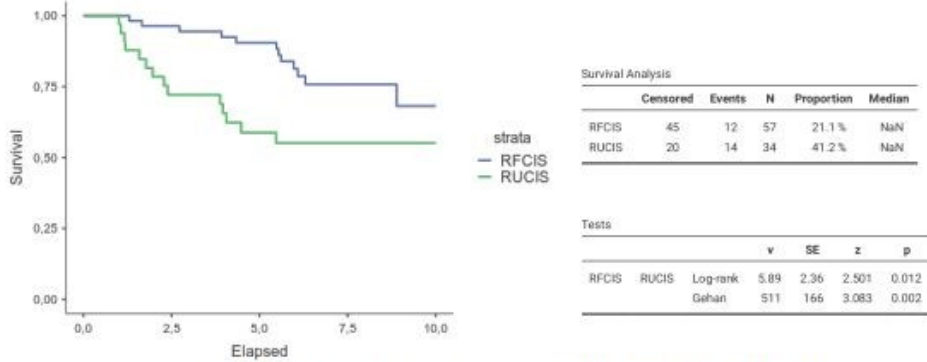
Εικόνα 5: Παρουσία dTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST



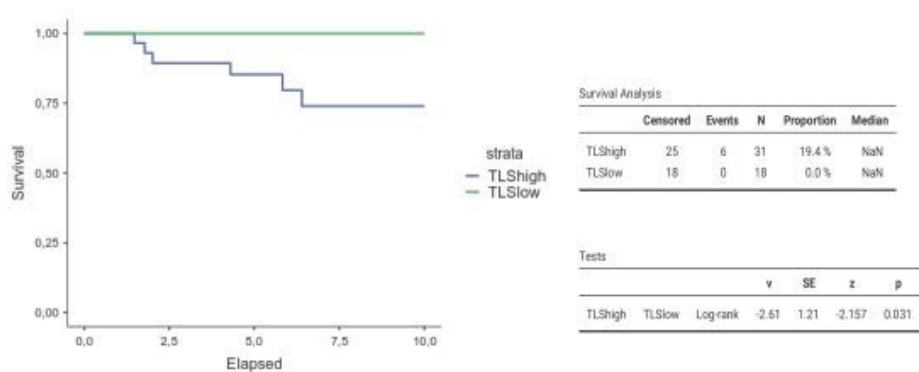
Εικόνα 6: Παρουσία dTLS και DFS στην ομάδα REST



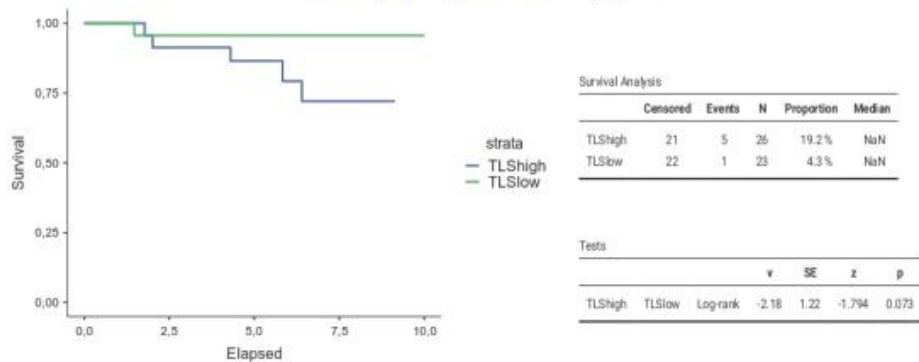
Εικόνα 7: OS και ανοσολογικές υποομάρες με χρήση dTLS+/- αντί για aTLSSlow/High



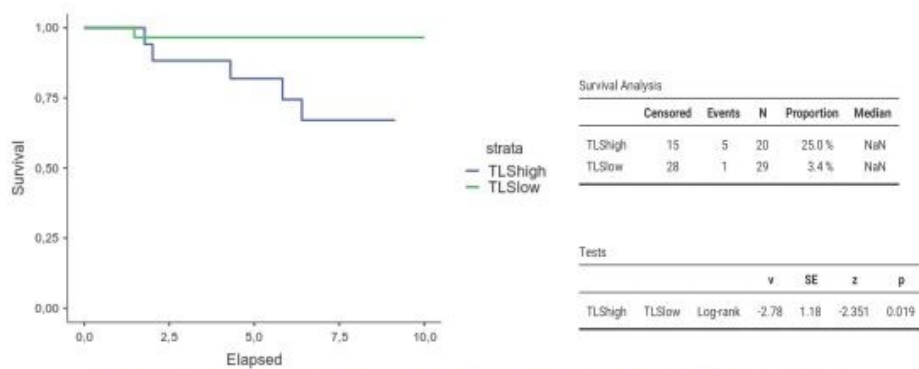
Εικόνα 8: DFS και ανοσολογικές υποομάρες με χρήση dTLS+/- αντί για aTLSSlow/High



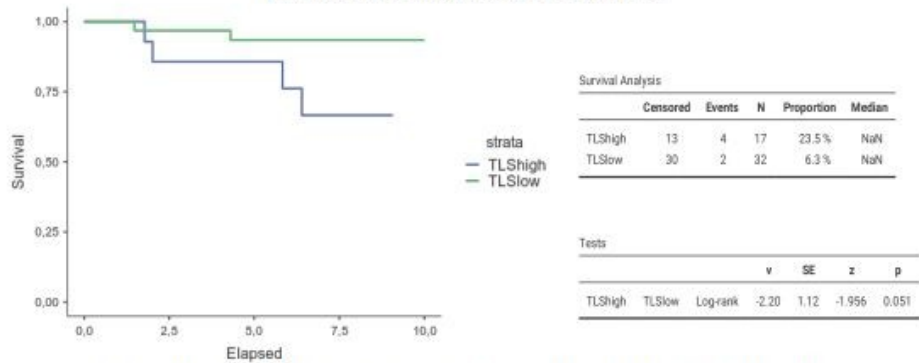
Εικόνα 9: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



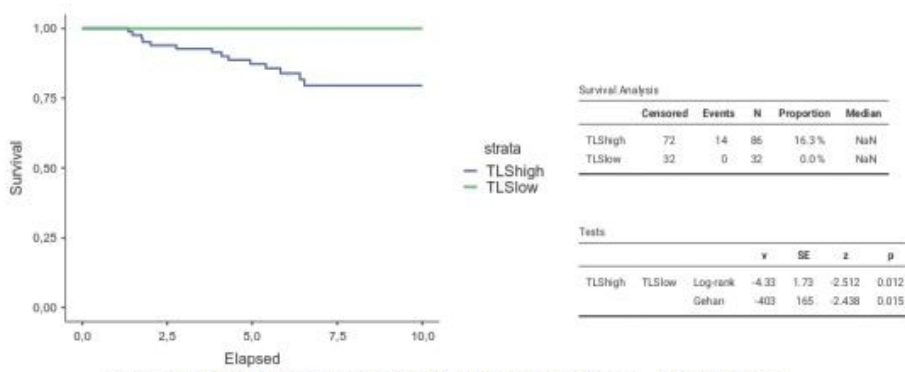
Εικόνα 10: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



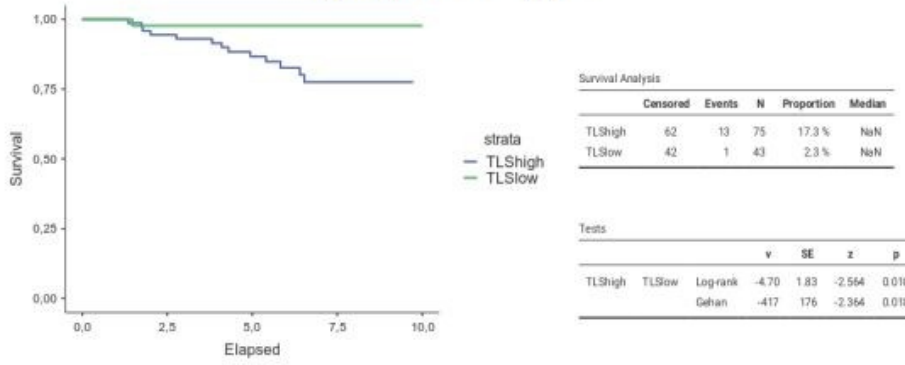
Εικόνα 11: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



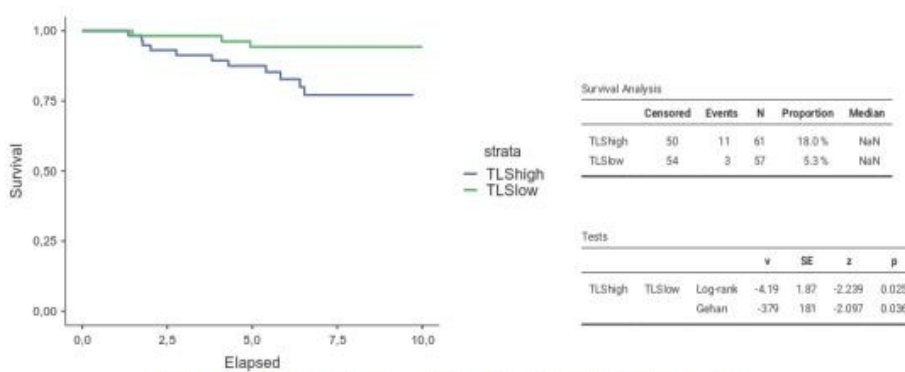
Εικόνα 12: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



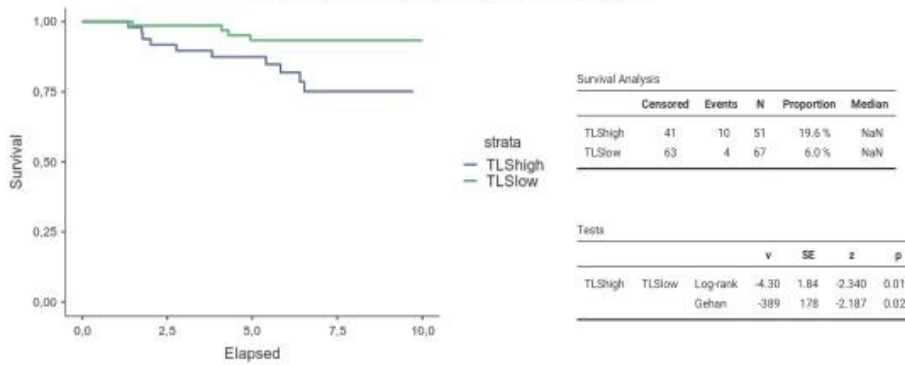
Εικόνα 13: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



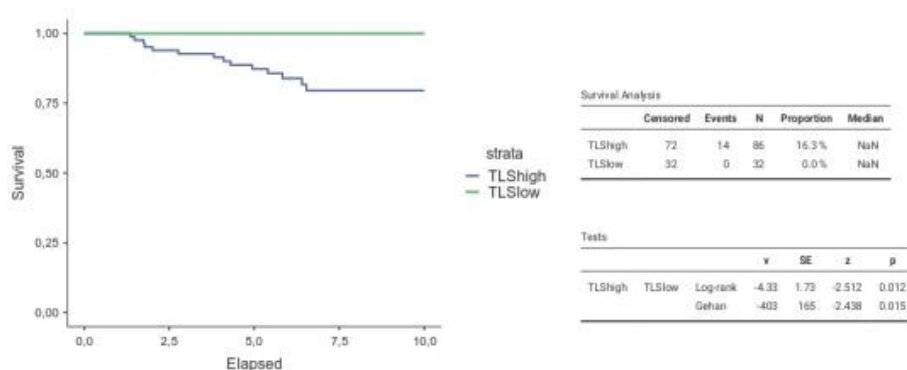
Εικόνα 14: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



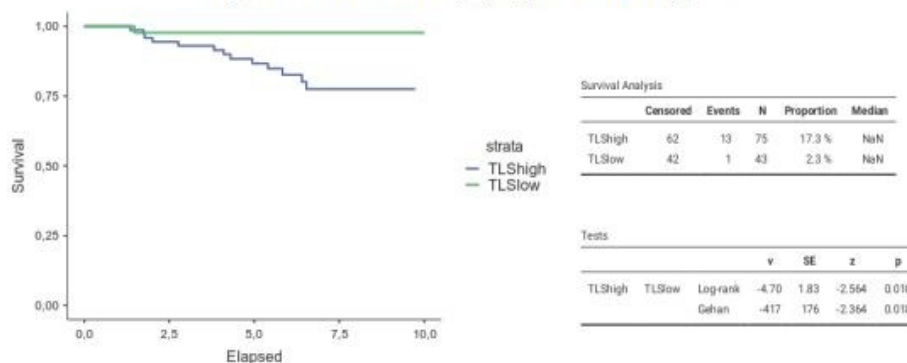
Εικόνα 15: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



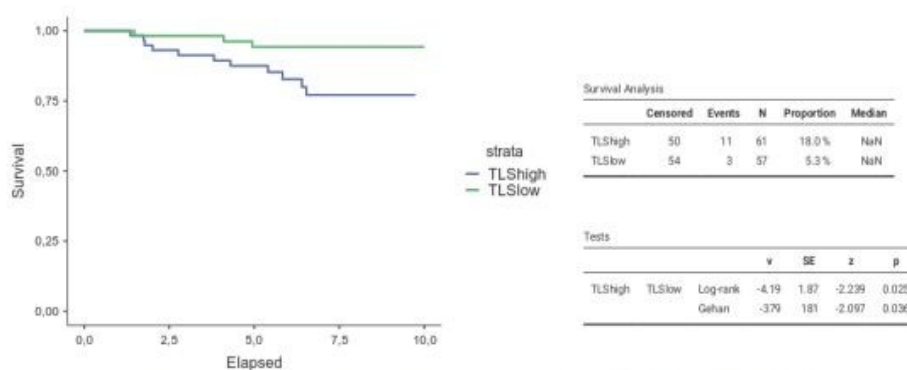
Εικόνα 16: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



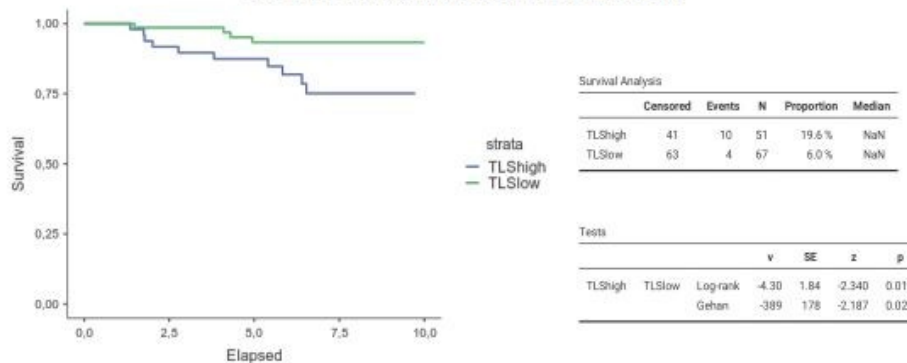
Εικόνα 17: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



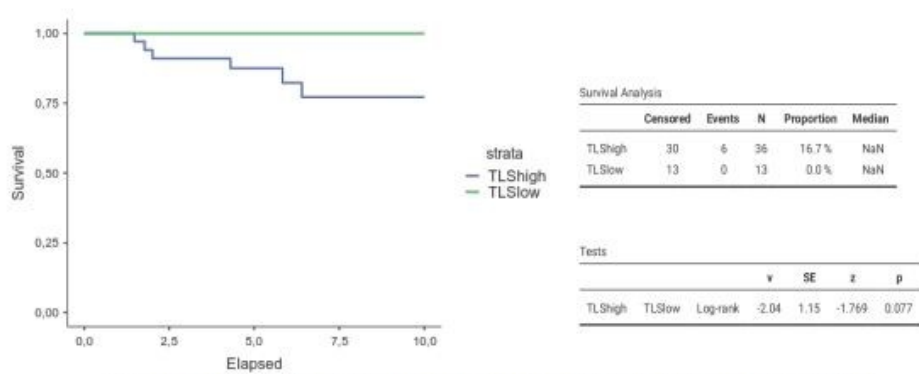
Εικόνα 18: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low- 1 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



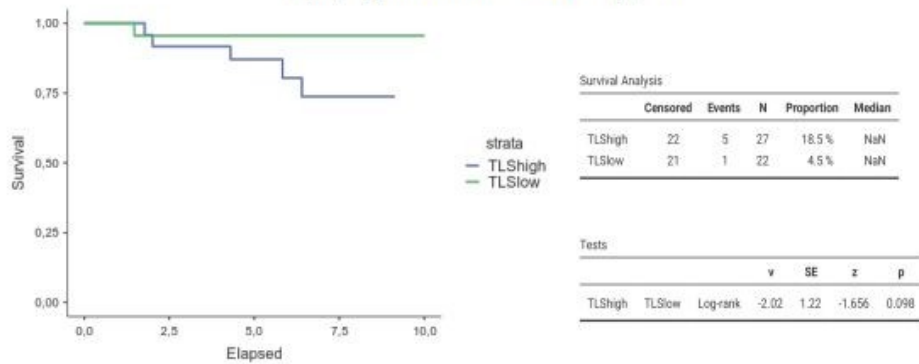
Εικόνα 19: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



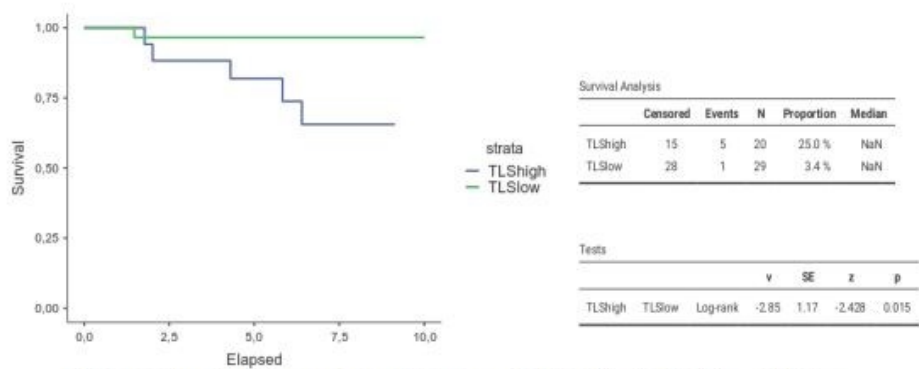
Εικόνα 20: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.50 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



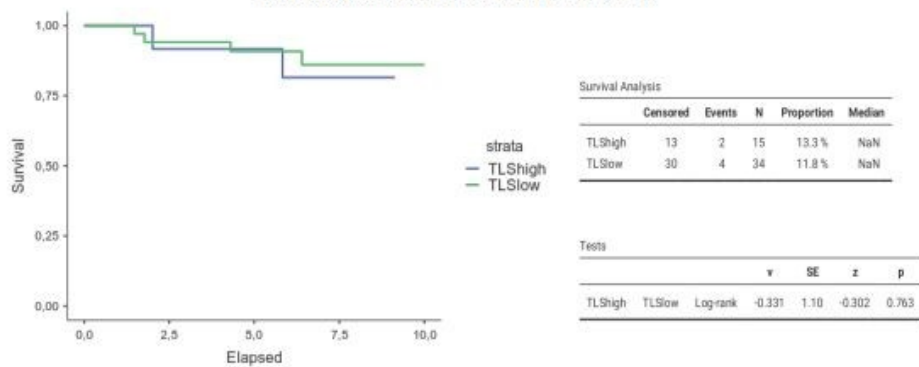
Εικόνα 21: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/cm²
Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



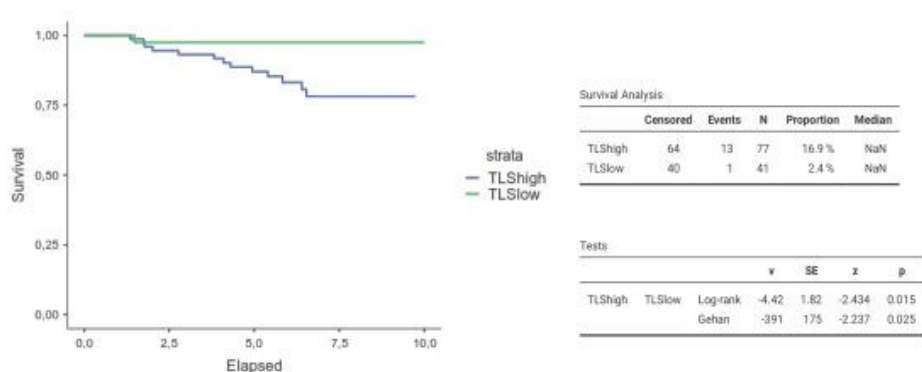
Εικόνα 22: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 2
TLS/cm² Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



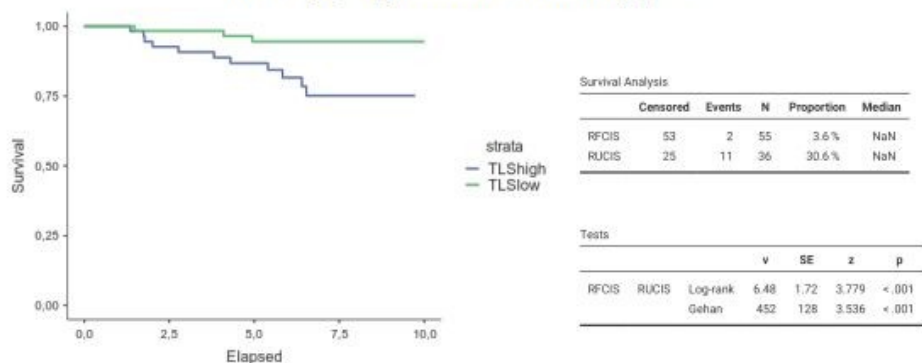
Εικόνα 23: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 3 TLS/cm²
Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



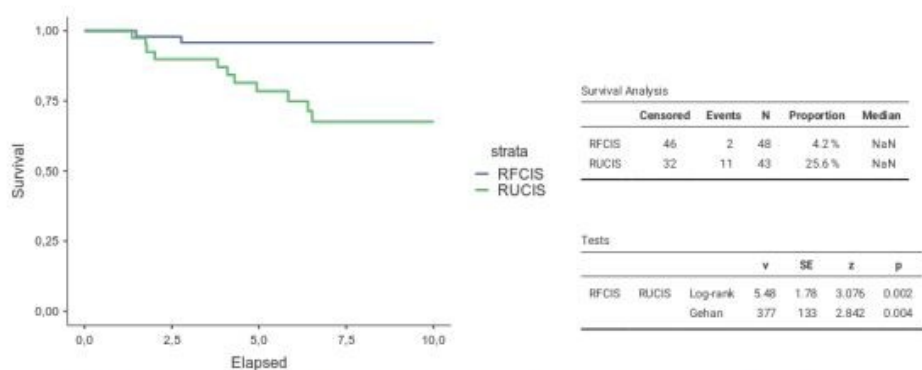
Εικόνα 24: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 4 TLS/cm²
Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



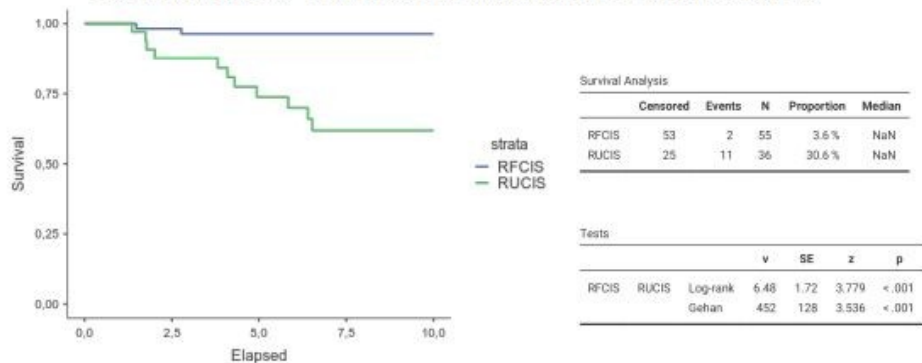
Εικόνα 25: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



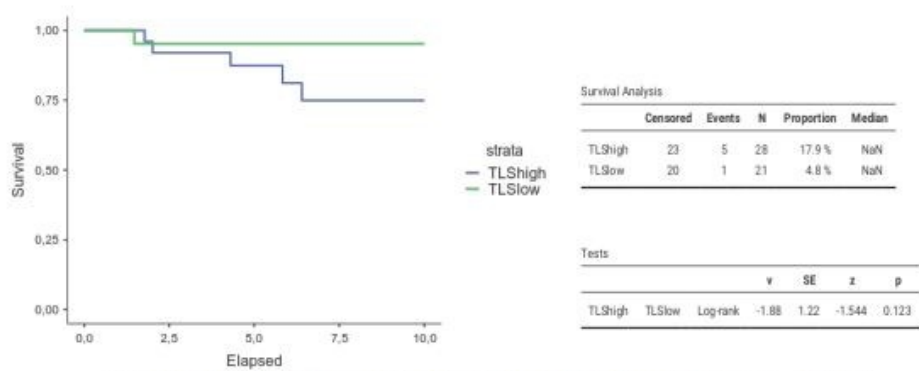
Εικόνα 26: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



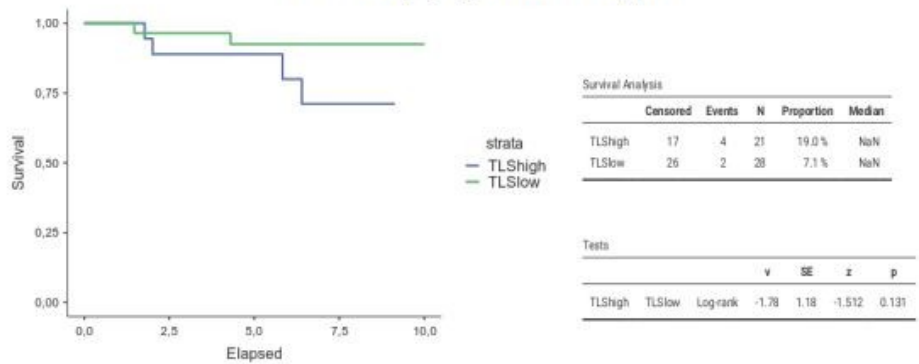
Εικόνα 27: OS και «ενισχυμένως» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περινεοπλασματικά TLS. Threshold High-Low - 2 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS.



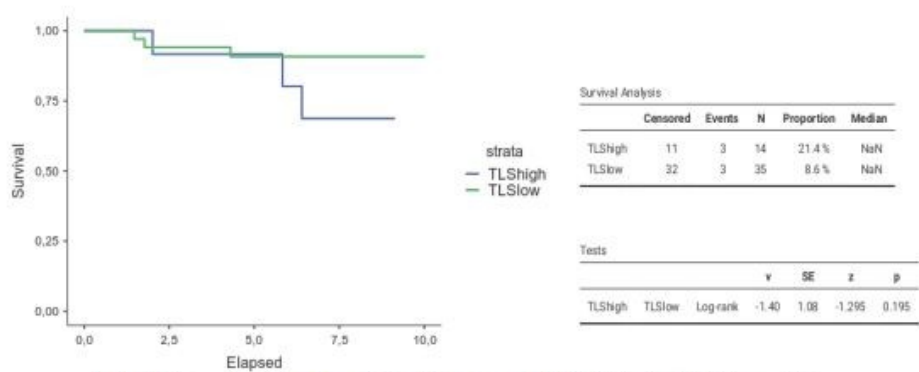
Εικόνα 28: OS και «ενισχυμένως» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περινεοπλασματικά TLS. Threshold High-Low - 3 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS.



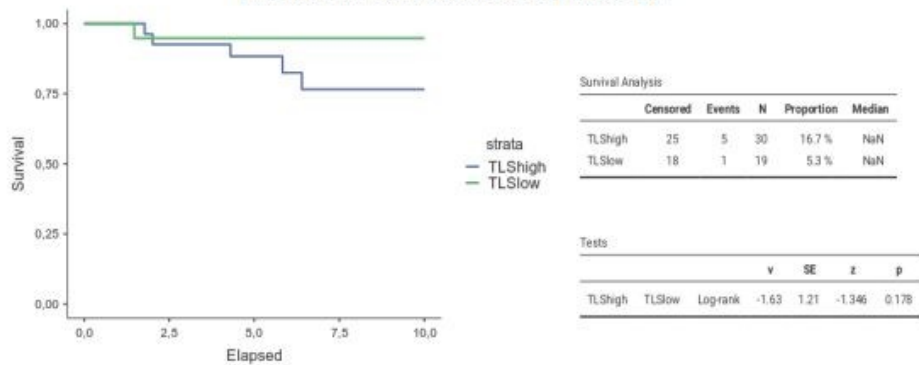
Εικόνα 29: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



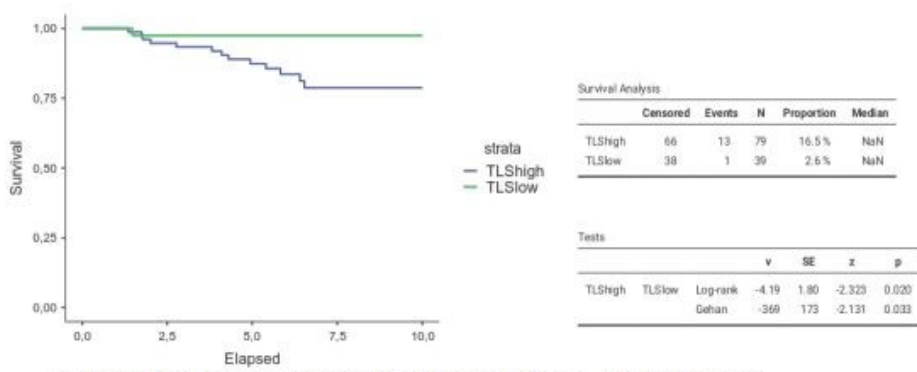
Εικόνα 30: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



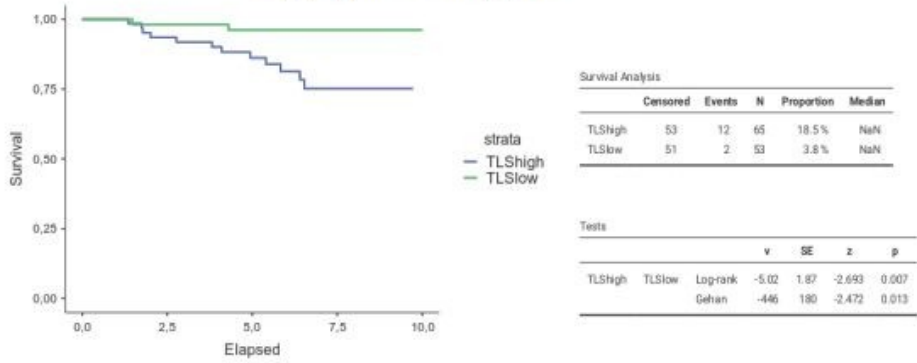
Εικόνα 31: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



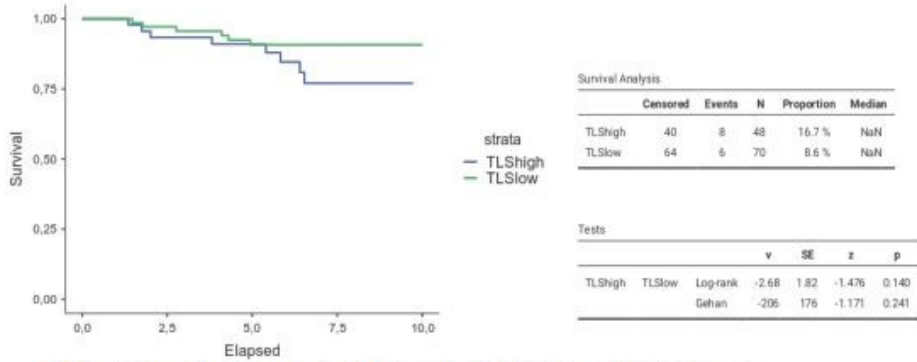
Εικόνα 32: Παρουσία αTLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



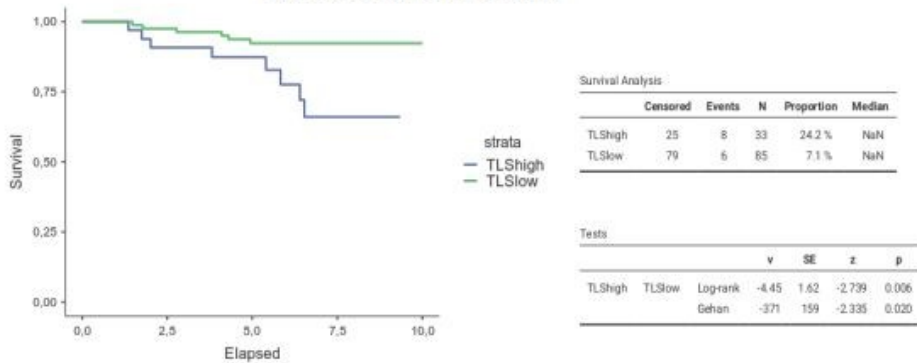
Εικόνα 33: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



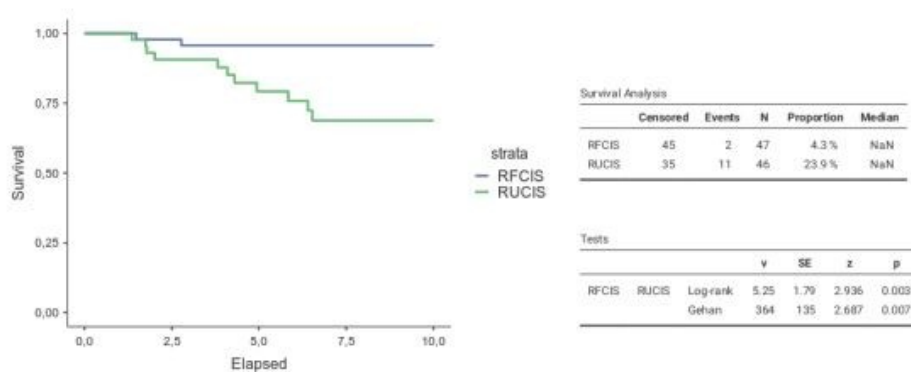
Εικόνα 34: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



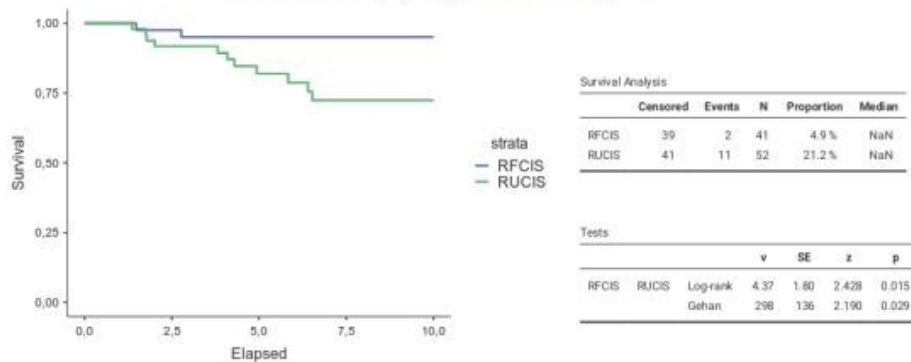
Εικόνα 35: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



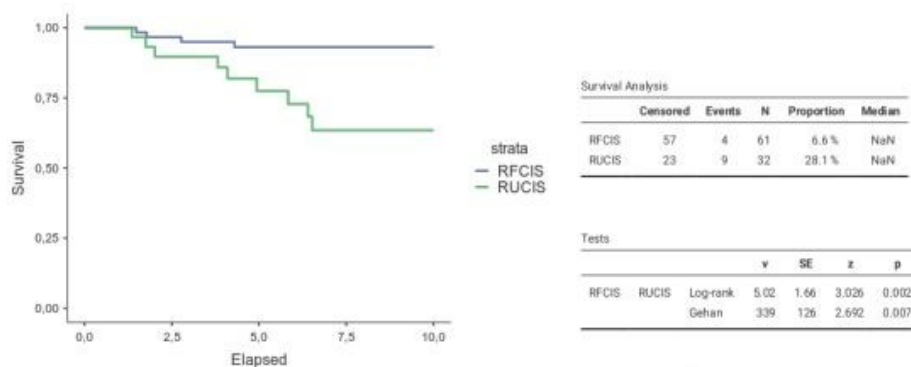
Εικόνα 36: Παρουσία aTLS και συνολική επιβίωση. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



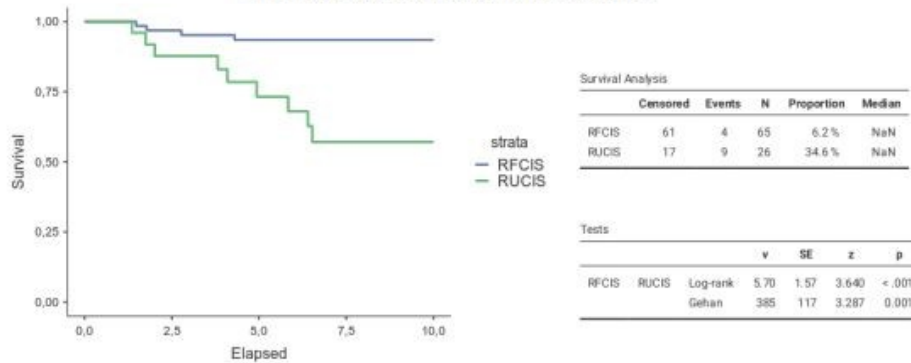
Εικόνα 37: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS.



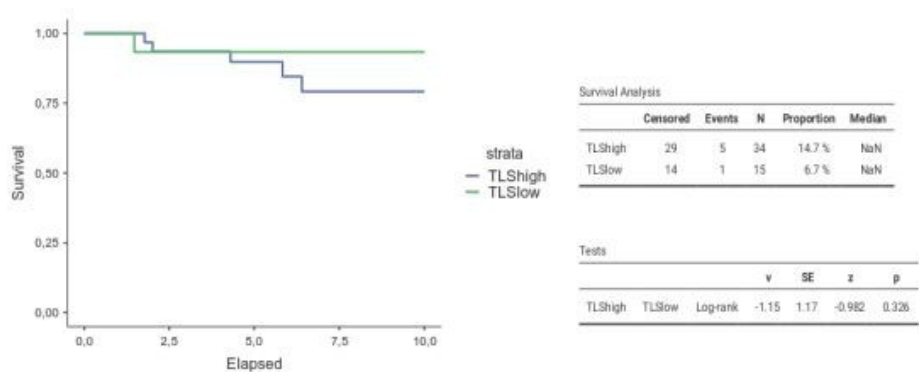
Εικόνα 38: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS.



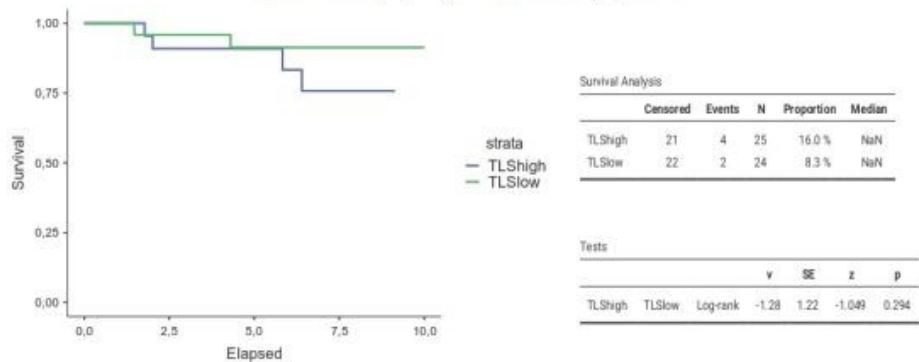
Εικόνα 39: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS.



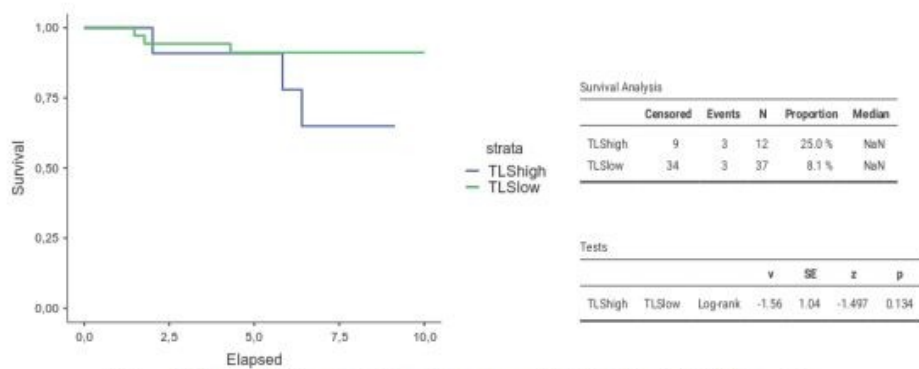
Εικόνα 40: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS.



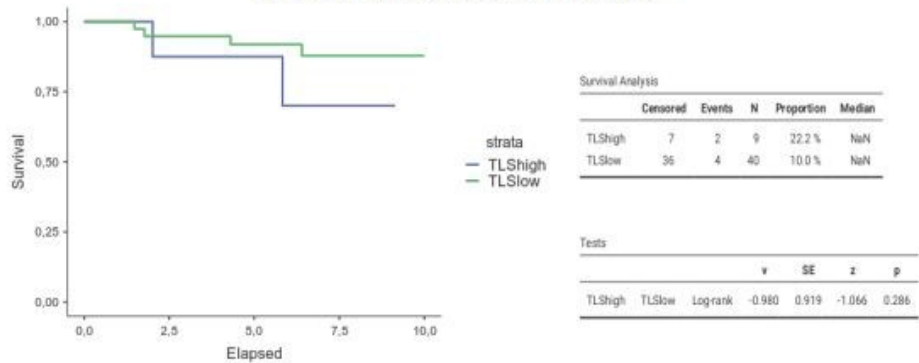
Εικόνα 41: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



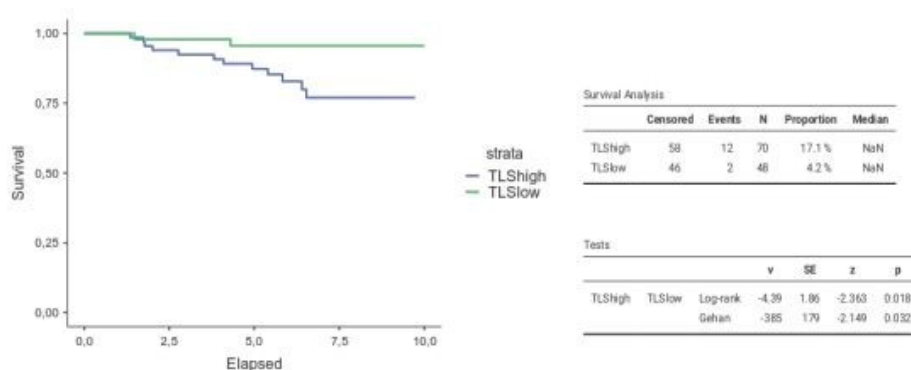
Εικόνα 42: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



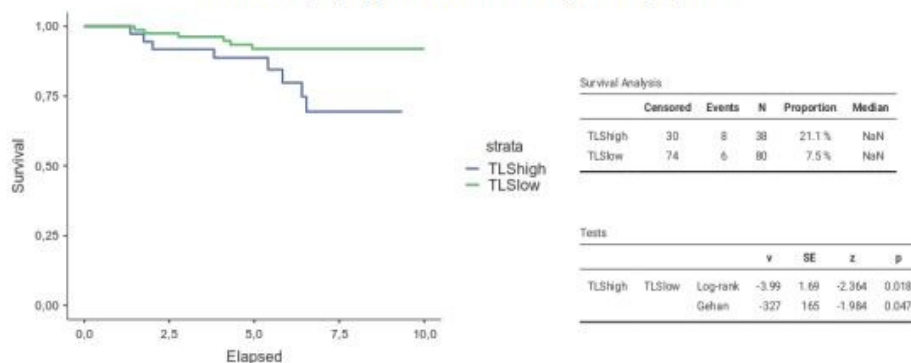
Εικόνα 43: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



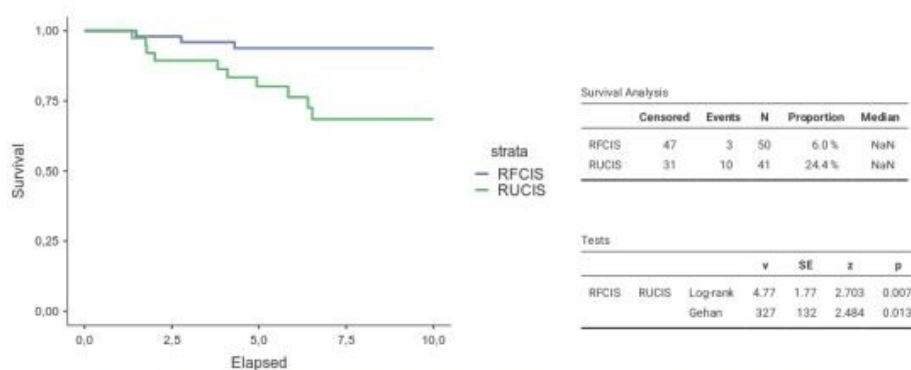
Εικόνα 44: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 4 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



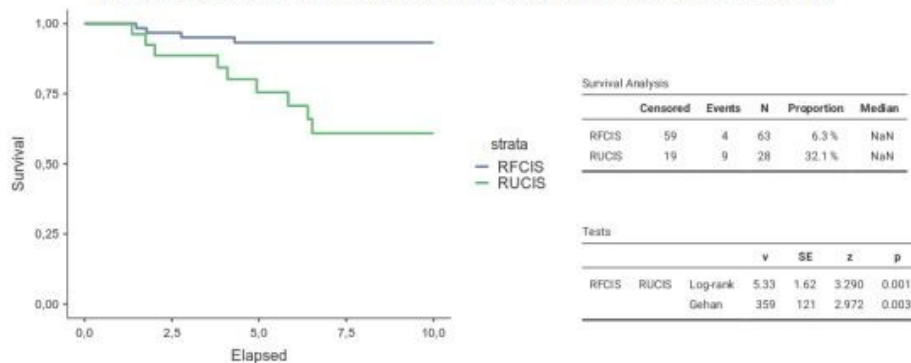
Εικόνα 45: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίεξ DCIS



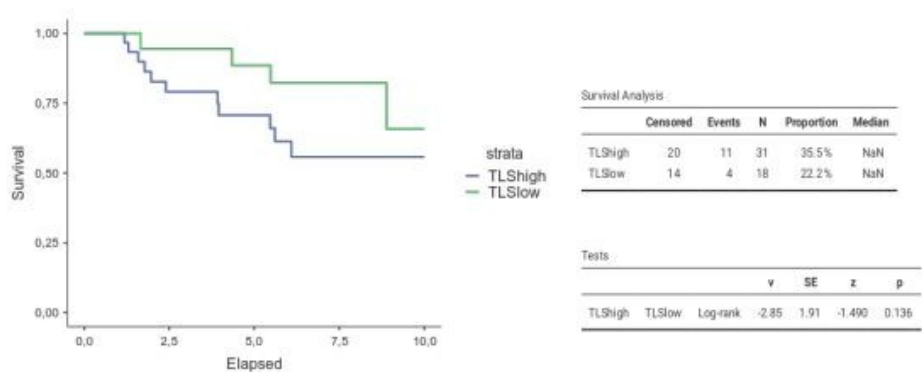
Εικόνα 46: Παρουσία TLS και συνολική επιβίωση ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίεξ DCIS



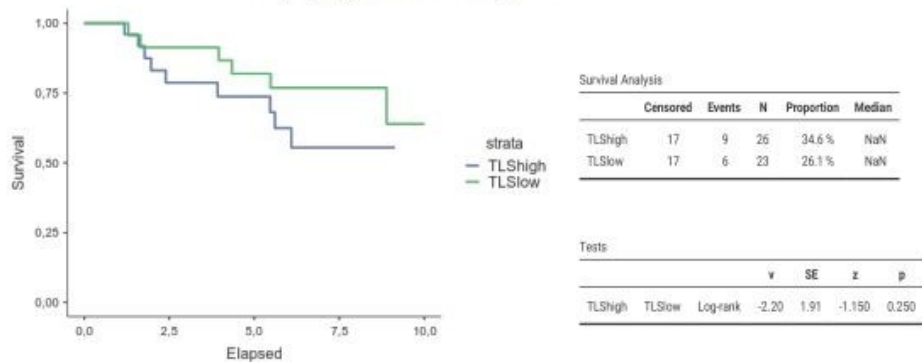
Εικόνα 47: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περιεσπασματικά TLS. Threshold High-Low - 2 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίεξ DCIS.



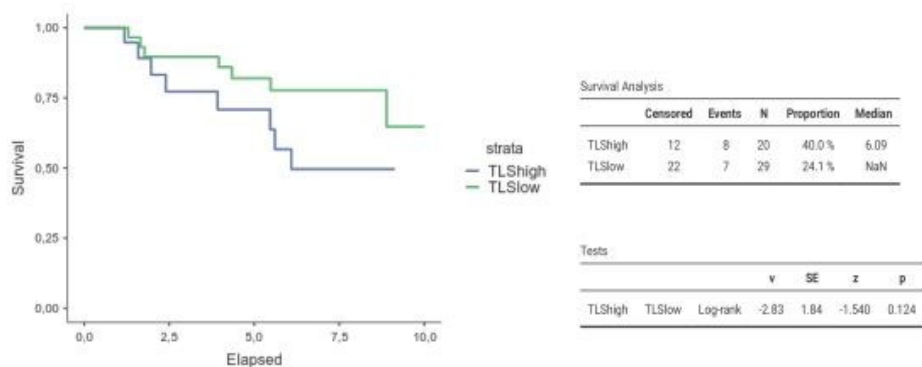
Εικόνα 48: OS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περιεσπασματικά TLS. Threshold High-Low - 3 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίεξ DCIS.



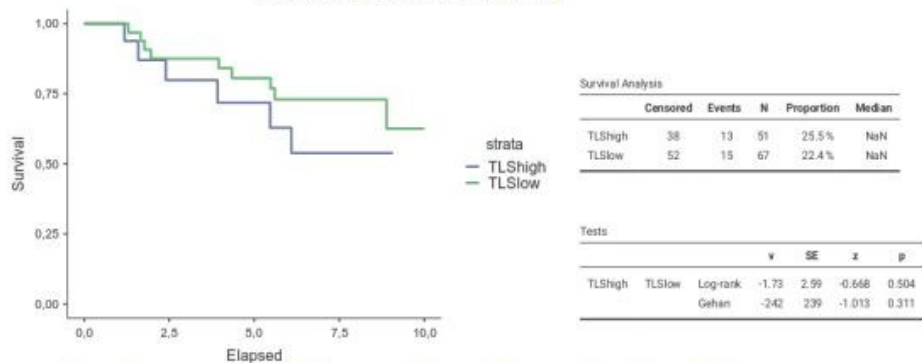
Εικόνα 49: Παρουσία aTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



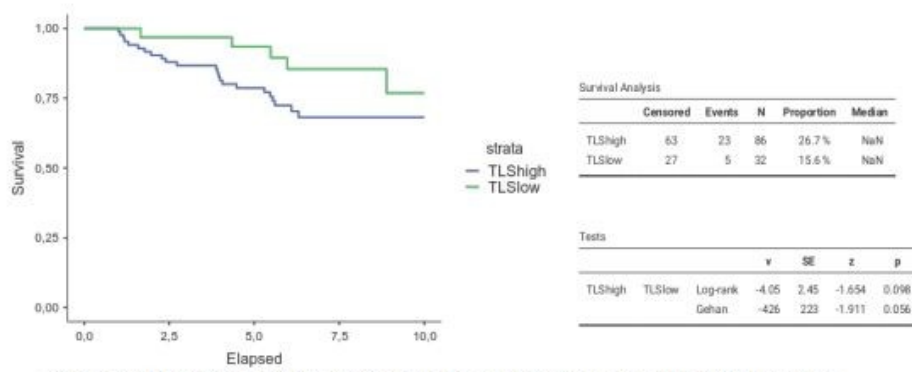
Εικόνα 50: Παρουσία aTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low- 1 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



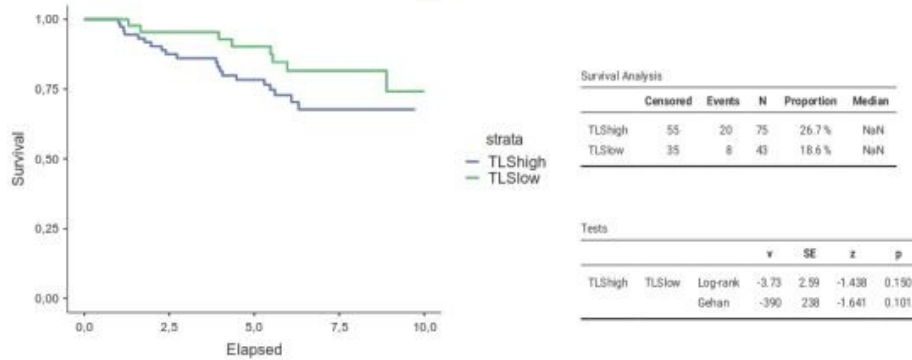
Εικόνα 51: Παρουσία aTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



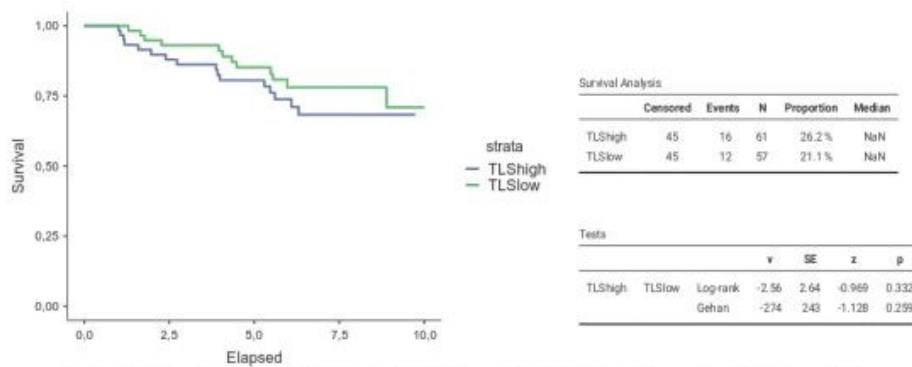
Εικόνα 52: Παρουσία aTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



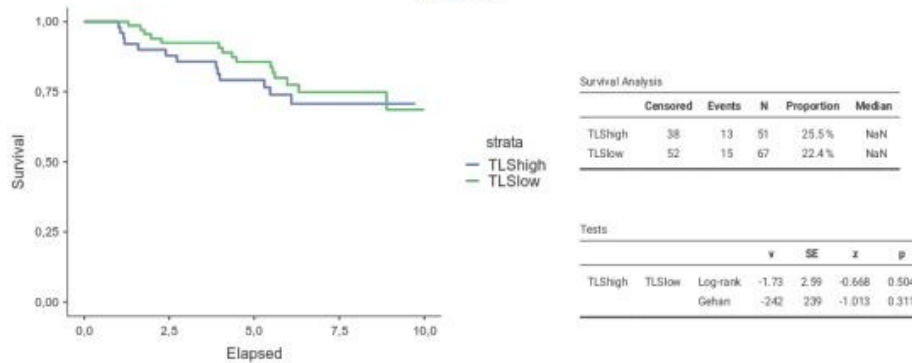
Εικόνα 53: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



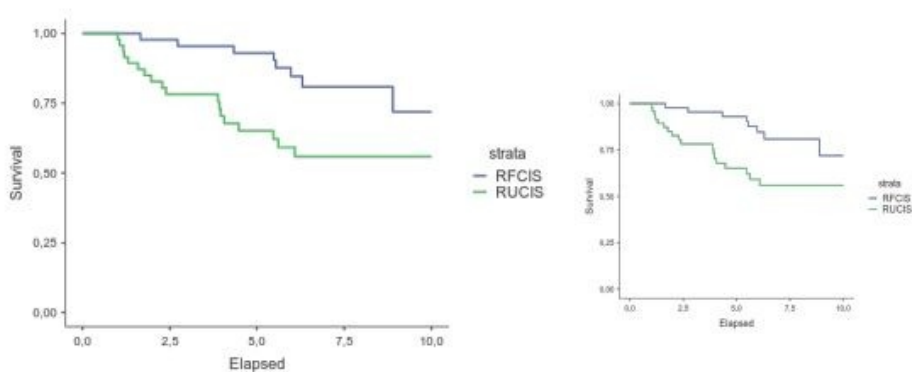
Εικόνα 54: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



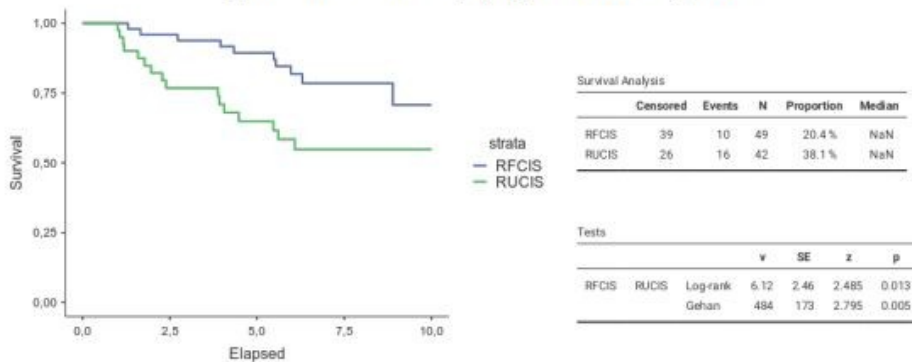
Εικόνα 55: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



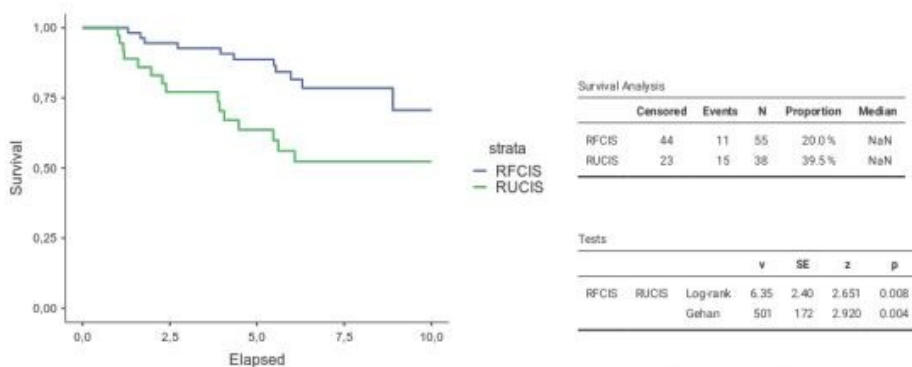
Εικόνα 56: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



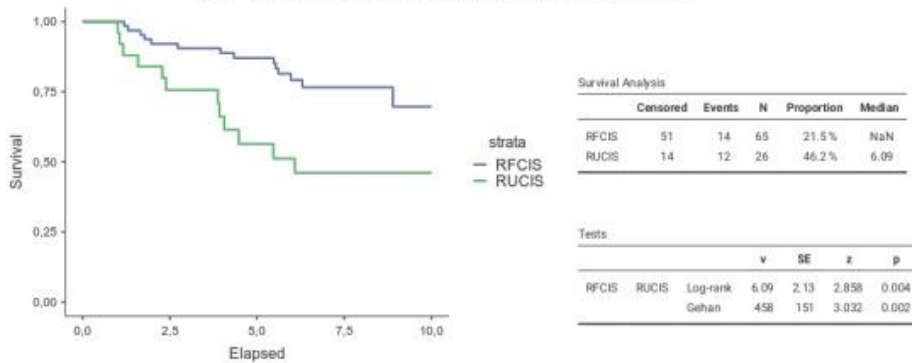
Εικόνα 57:DFS και «επισχιμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



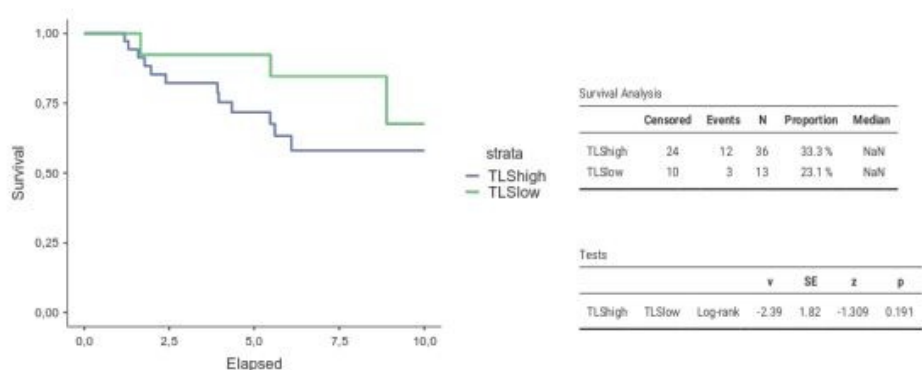
Εικόνα 58:DFS και «επισχιμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low- 1 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



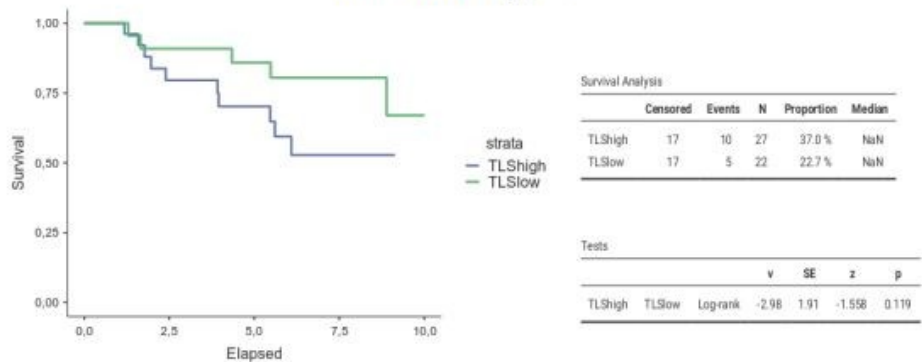
Εικόνα 59:DFS και «επισχιμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



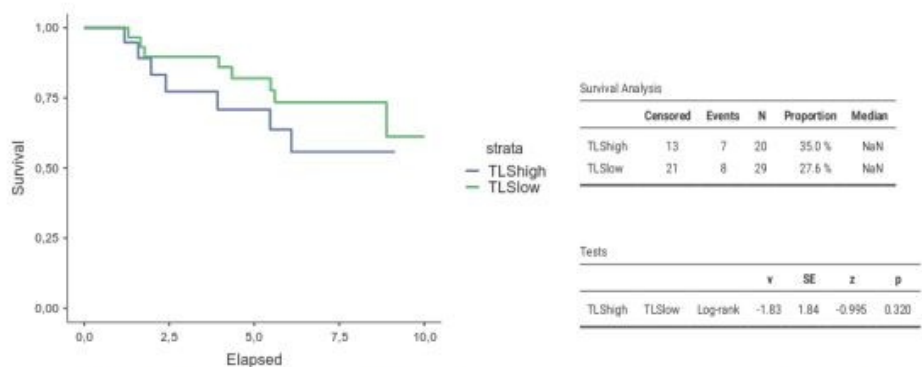
Εικόνα 60:DFS και «επισχιμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.50 TLS/10 mm. Συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



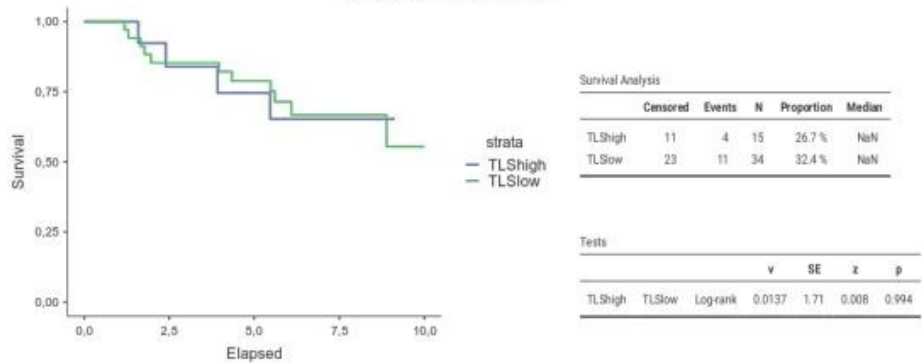
Εικόνα 61: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/cm² Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



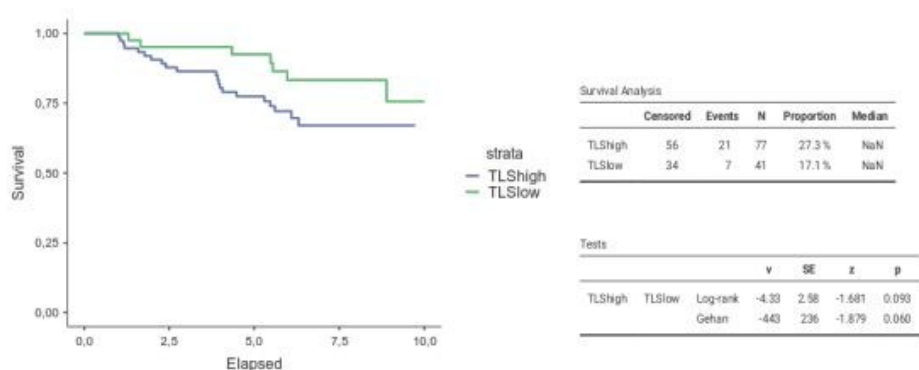
Εικόνα 62: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 2 TLS/cm² Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



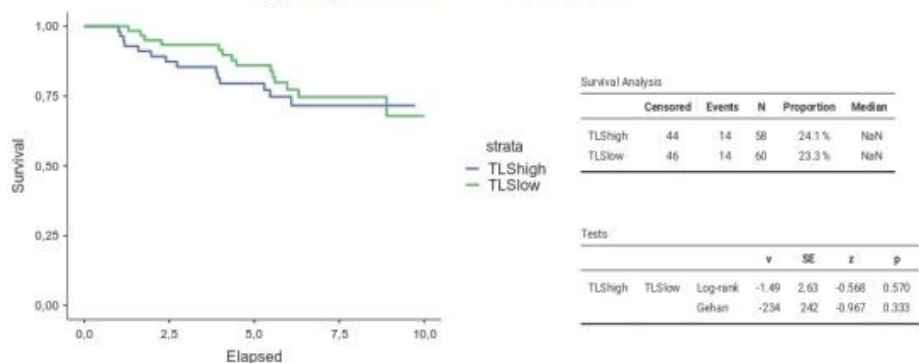
Εικόνα 63: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 3 TLS/cm² Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



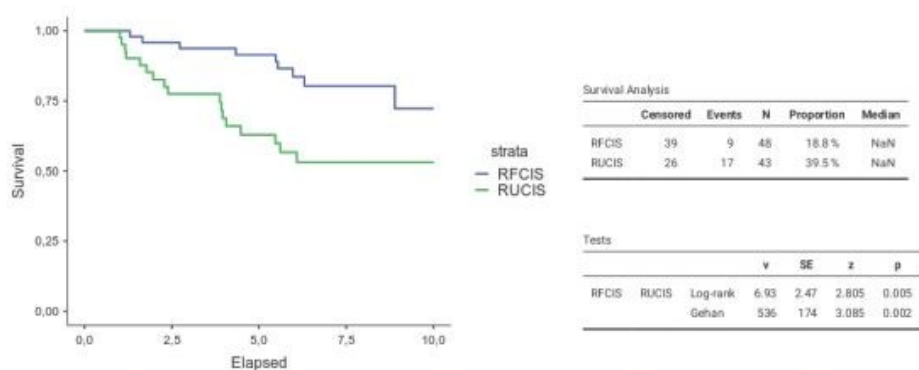
Εικόνα 64: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 4 TLS/cm² Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



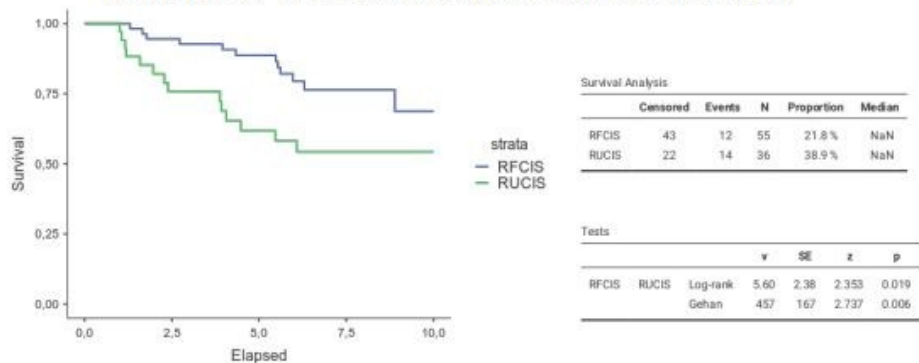
Εικόνα 65: Παρουσία TLS και DFS ανεξαρτήτως ομάδος, Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



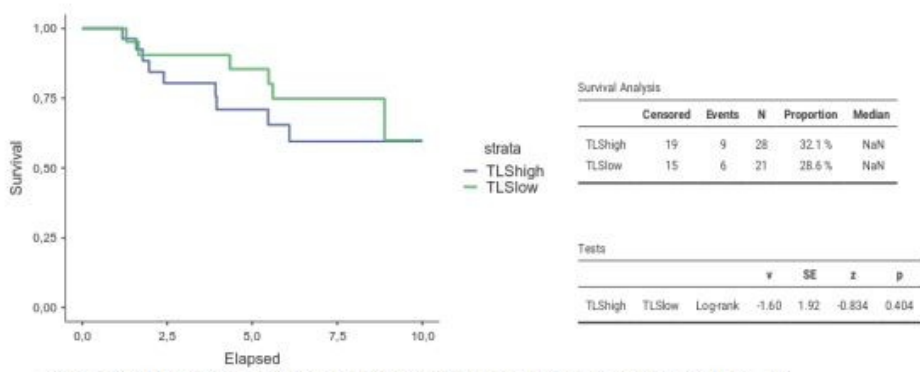
Εικόνα 66: Παρουσία TLS και DFS ανεξαρτήτως ομάδος, Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS



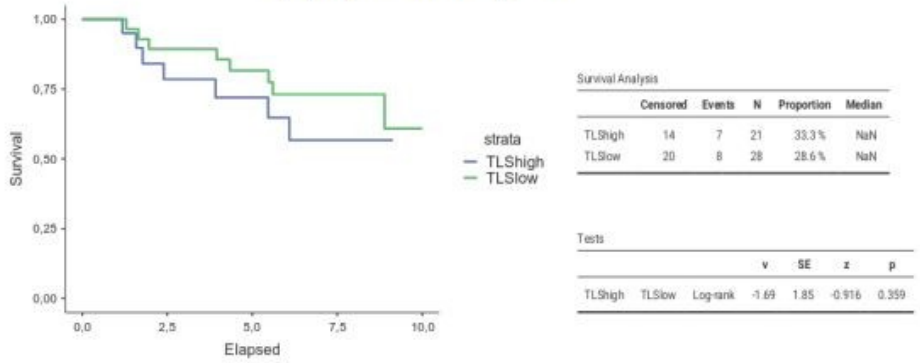
Εικόνα 67: DFS και «ενοσχιμένες» αναστοματικές υπογραφές που απορρέουν από τα περιεσπασματικά TLS. Threshold High-Low - 2 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS.



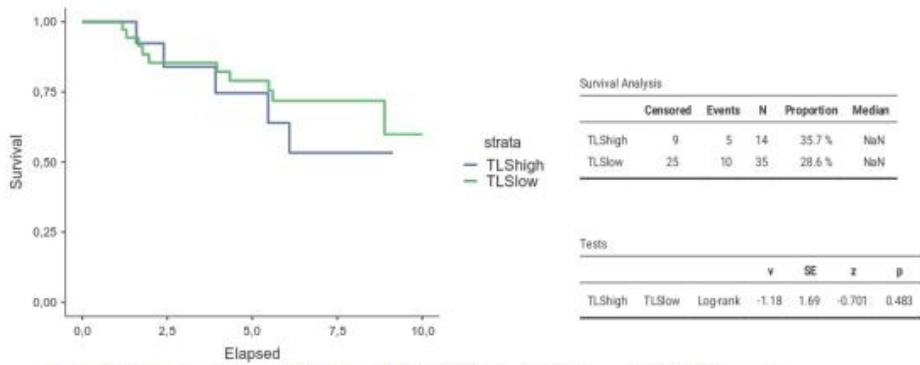
Εικόνα 68: DFS και «ενοσχιμένες» αναστοματικές υπογραφές που απορρέουν από τα περιεσπασματικά TLS. Threshold High-Low - 3 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS και τα TLS περίξ DCIS.



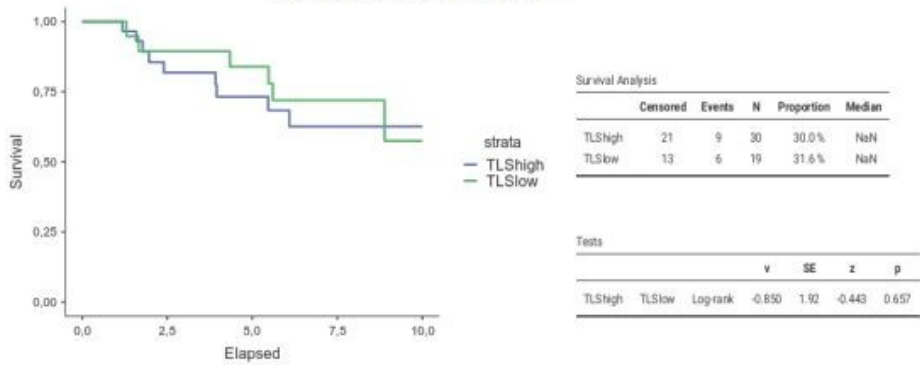
Εικόνα 69: Παρουσία αTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



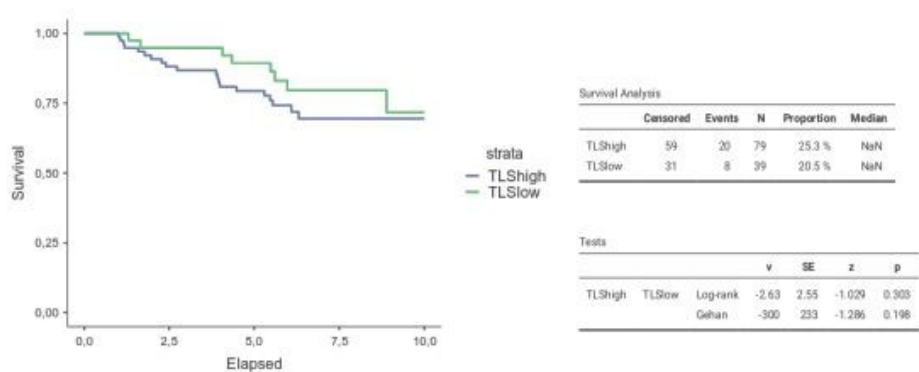
Εικόνα 70: Παρουσία αTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



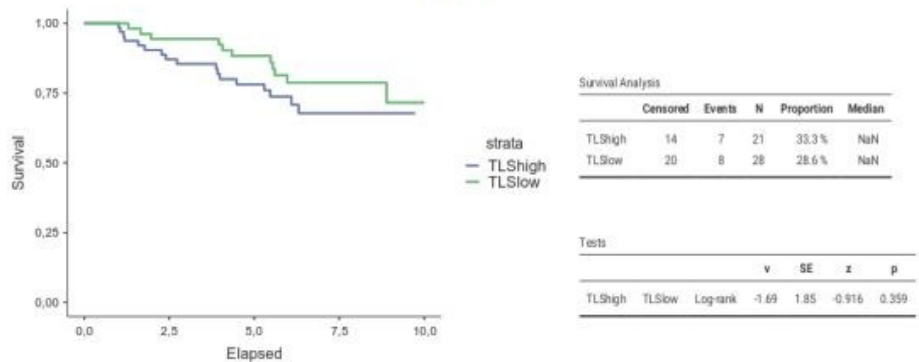
Εικόνα 71: Παρουσία αTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



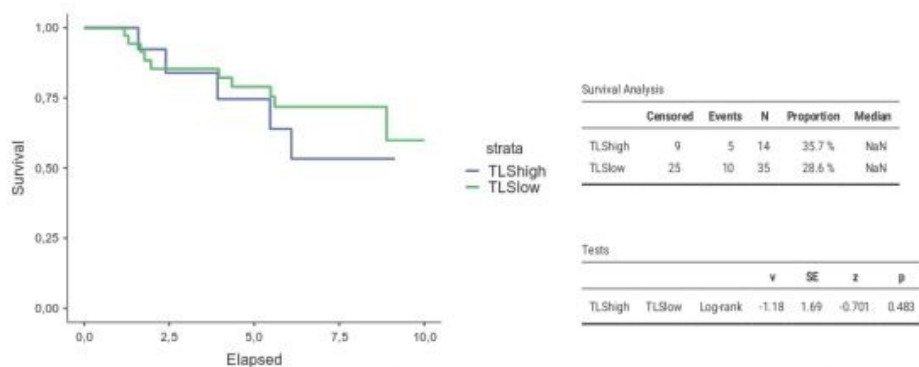
Εικόνα 72: Παρουσία αTLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περί DCIS



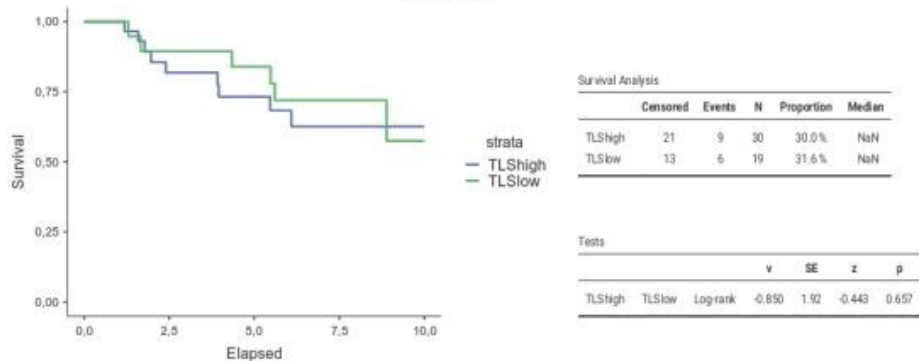
Εικόνα 73: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



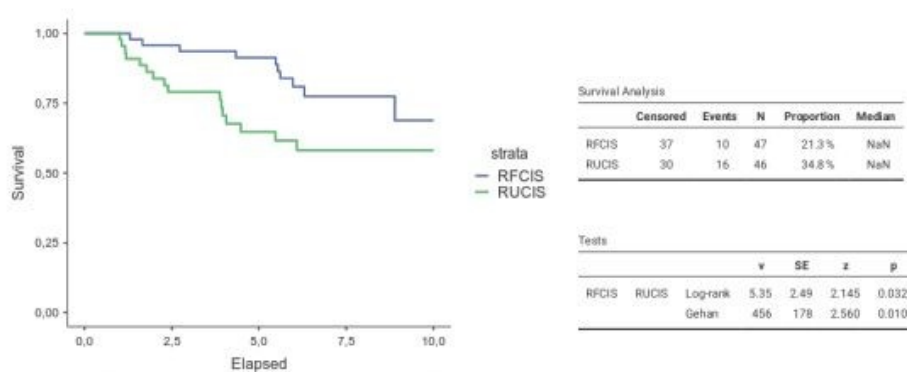
Εικόνα 74: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



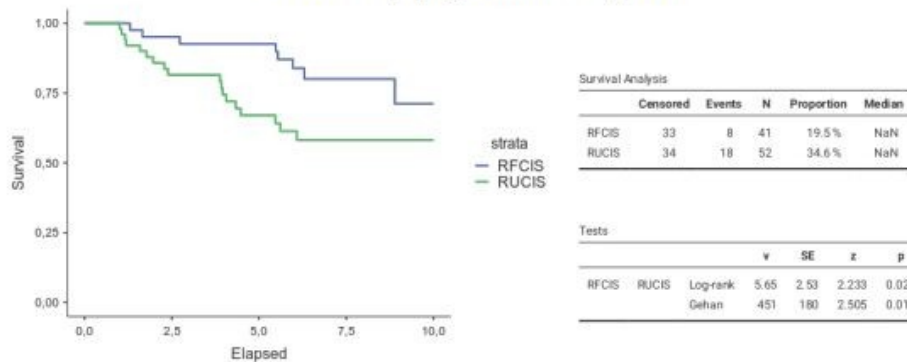
Εικόνα 75: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



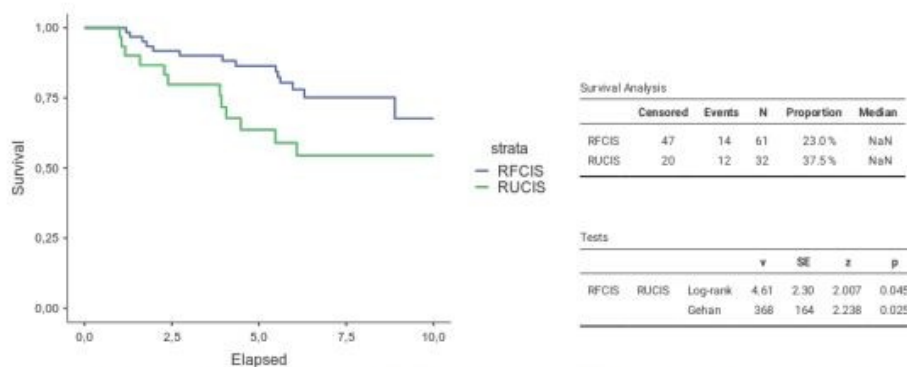
Εικόνα 76: Παρουσία αTLS και DFS. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



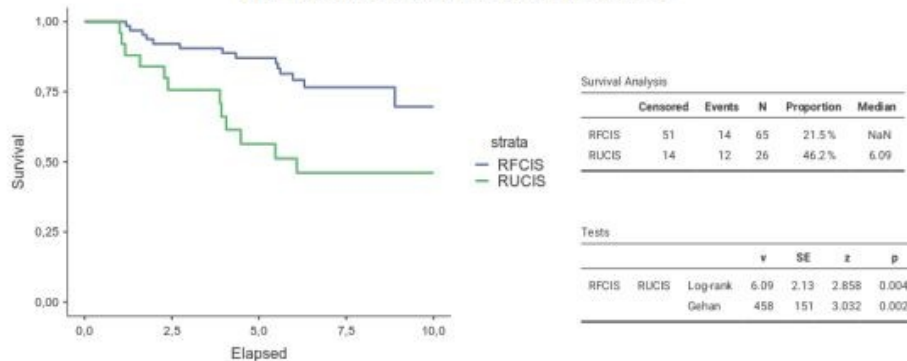
Εικόνα 77:DFS και «ενοσχυμένες» αναστολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 0.75 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



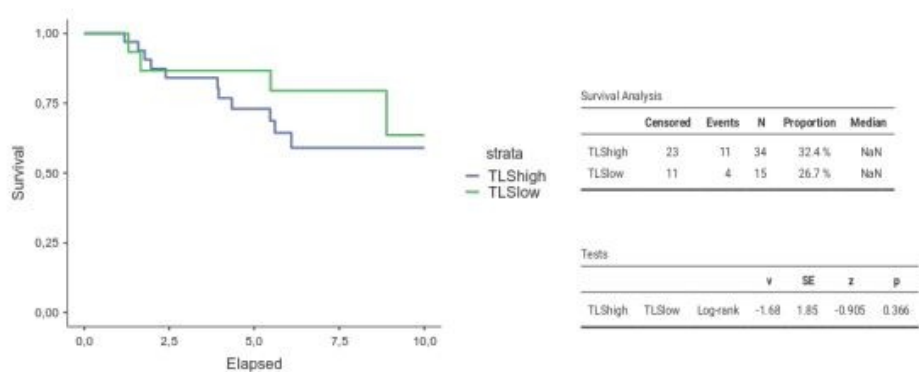
Εικόνα 78:DFS και «ενοσχυμένες» αναστολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



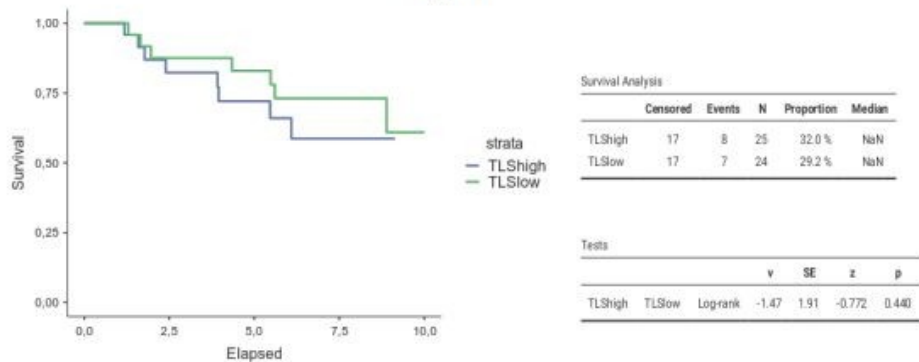
Εικόνα 79:DFS και «ενοσχυμένες» αναστολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.25 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



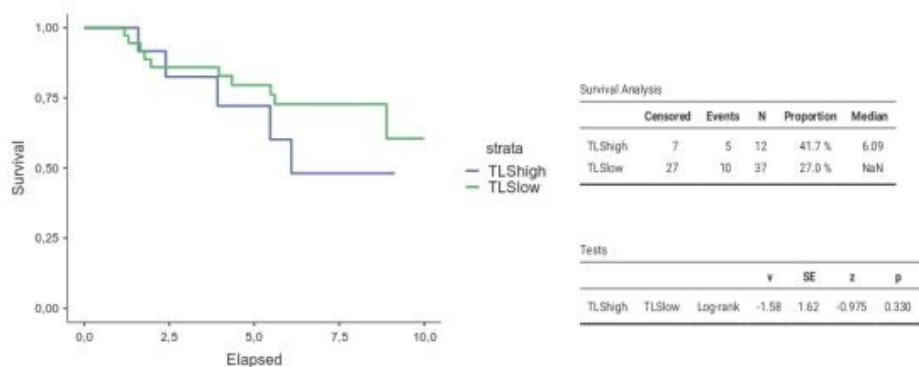
Εικόνα 80:DFS και «ενοσχυμένες» αναστολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα aTLS. Threshold High-Low - 1.5 TLS/10 mm. Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



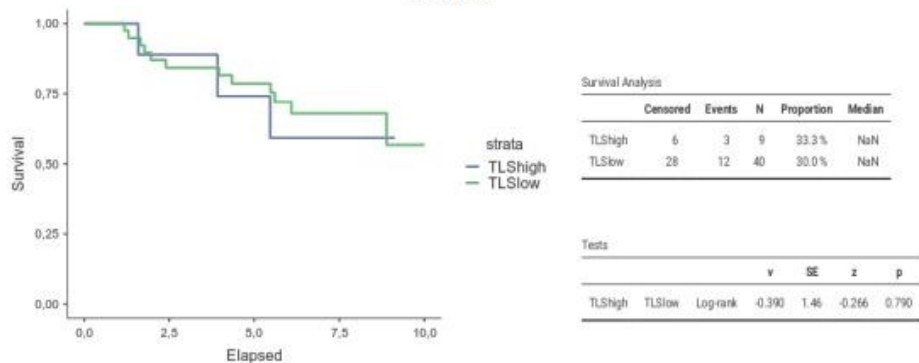
Εικόνα 81: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 1 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



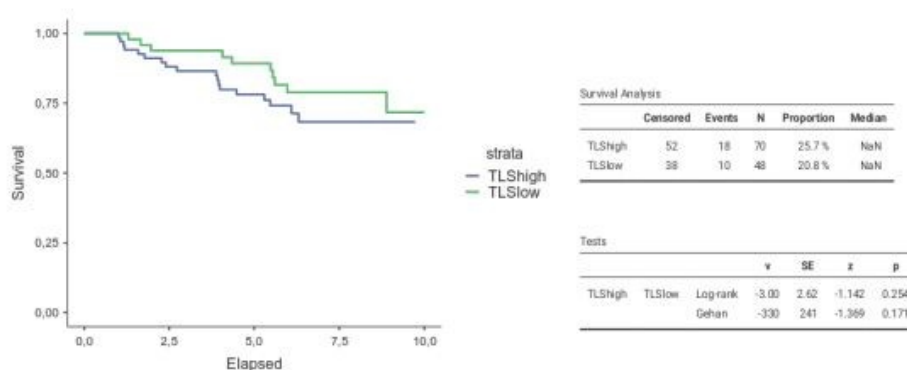
Εικόνα 82: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



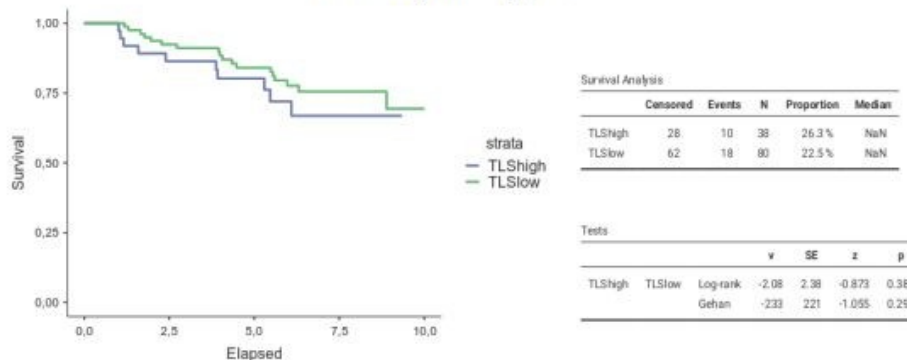
Εικόνα 83: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



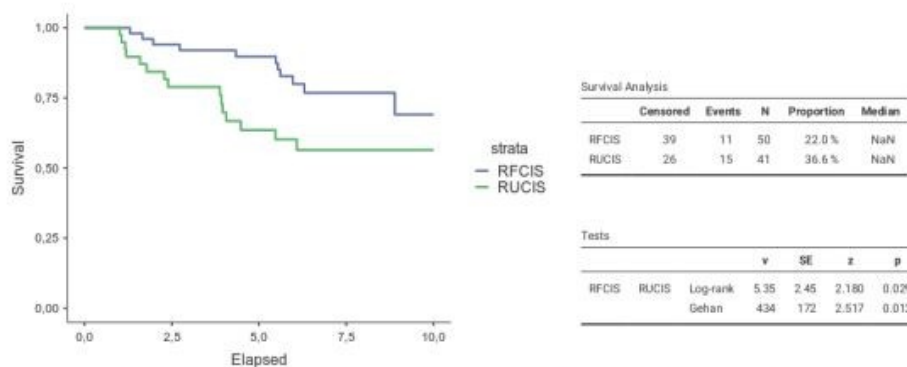
Εικόνα 84: Παρουσία TLS και DFS στην ομάδα REST. Threshold High-Low - 4 TLS/cm². Δεν συμπεριλαμβάνονται τα TLS περίξ DCIS



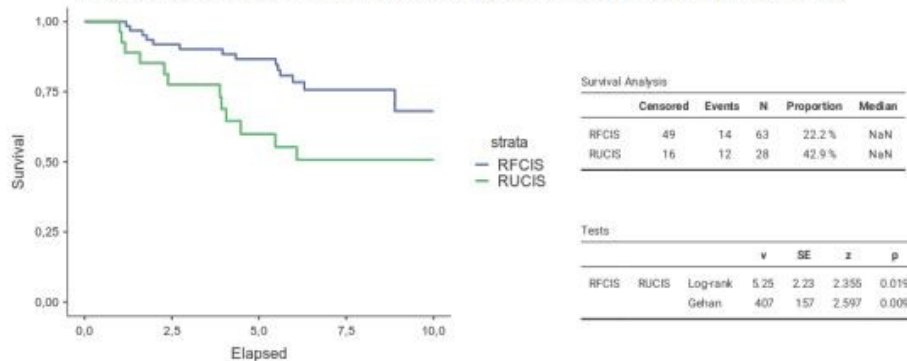
Εικόνα 85: Παρουσία TLS και DFS ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 2 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίξ DCIS.



Εικόνα 86: Παρουσία TLS και DFS ανεξαρτήτως ομάδος. Threshold High-Low - 3 TLS/cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίξ DCIS.



Εικόνα 87: DFS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περινεοπλασματικά TLS. Threshold High-Low - 2 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίξ DCIS.



Εικόνα 88: DFS και «ενισχυμένες» ανοσολογικές υπογραφές που απορρέουν από τα περινεοπλασματικά TLS. Threshold High-Low - 3 TLS/10 cm². Συμπεριλαμβάνονται τα dTLS αλλά όχι τα TLS περίξ DCIS.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

CURRICULUM VITAE

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΜΙΧΑΗΛ ΣΟΦΟΠΟΥΛΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ ΞΕΝΟΦΩΝ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΡΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ ΑΘΗΝΑ
ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ 2-5-1978
ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΝΟΣ.
ΚΙΝΗΤΟ
E-MAIL msofopoulos@gmail.com

- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ: **Πτυχίο Ιατρικής** (Πανεπιστήμιο ΜΟΝΤΕΝΑ-ΙΤΑΛΙΑ. Βαθμος: **88/110**)
- ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ : «Έρευνες στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια εξωσωματικής κυκλοφορίας» (Ricerche sullo stress ossidativo in corso di circolazione extracorporea)
- ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ: Αρ.Π.5450/30-5-2007
- ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ:
 1. Από Ιανουάριο 2009 έως Μάιο 2013 (4 έτη, 5 μήνες): Έμμισθος ειδικευόμενος στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Γ.Α.Ο.Ν.Α.«Ο Άγιος Σάββας».
 2. Από Μάιο 2013 έως Αύγουστο 2014 (1 έτος, 2 μήνες): Έμμισθος ειδικευόμενος στο εργαστήριο της Κυτταρολογίας.
- **Μεταπτυχιακός τίτλος εκπαίδευσης Μ.Π.Σ.** (9-10-2012) με τίτλο «Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: Σύγχρονη κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση και έρευνα» Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **Απόκτηση Ιατρικής ειδικότητας: Ειδικότητα Παθολογικής Ανατομικής** Αρ.Πρωτ.:14454 (28-7-2014) , Περιφέρεια Αττικής

Α΄ Προϋπηρεσία

1. **8ος-2014 έως 5ος-2015 (9 μήνες): Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης στη μονάδα δικαστικής Παθολογοανατομίας** του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
2. **18-5-2015 έως σήμερα (4 έτη και 5 μήνες): Επικουρικός Παθολογοανατόμος** στο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας»

Β΄ Επιστημονικό έργο

1. **Υποψήφιος Διδάκτορας Ιατρικής Σχολής Αθηνών**, Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θέμα διδακτορικής διατριβής **«Στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος στο καρκίνο του μαστού ως προγνωστικός δείκτης»** Αρ.Πρ. 1617005166.(14/10/2016).
2. **Μεταπτυχιακός τίτλος ειδίκευσης (Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών)** με τίτλο **«Νεοπλασματική νόσος στον άνθρωπο: Σύγχρονη κλινικοπαθολογοανατομική προσέγγιση και έρευνα»**. Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Εθνικό Και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Βαθμός: Λίαν καλώς (8,3). **Διπλωματική εργασία με θέμα «Υπερεκκριτικού Τύπου Αλλοιώσεις Μαστού»**.
3. **Δημοσιευμένες μελέτες/επιστημονικές εργασίες**
Δημοσιεύσεις σε αξιολογημένα (peer-reviewed) διεθνή περιοδικά: 11
 (Pubmed,Scopus,Google Scholar,ORCID).
Συνολικά Citations 105 (Google Scholar)

1. **Sofopoulos M†, Fortis SP†, Vaxevanis CK, Sotiriadou NN, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Vlachodimitropoulos D, Perez SA, Baxevanis CN. **The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer.** Cancer Immunol Immunother. 2019 Oct 9. doi: 10.1007/s00262-019-02407-8. **†Contributed equally first author. IF:4.900. (Τμήμα της Διδακτορικής Διατριβής)****
2. Baxevanis CN, **Sofopoulos M**, Fortis SP, Perez SA. **The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer.** Cancer Immunol Immunother. 2019 Mar 23. doi: 10.1007/s00262-019-02327-7. **IF:4.900. (Τμήμα της Διδακτορικής Διατριβής)**
3. Fortis SP, Vaxevanis CK, Mahaira LG, **Sofopoulos M**, Sotiriadou NN, Dinou A, Arnogiannaki N, Stavropoulos-Giokas C, Thanos D, Baxevanis CN, Perez SA. **Serum miRNA-based distinct clusters define three groups of breast cancer**

- patients with different clinicopathological and immune characteristics.** Cancer Immunol Immunother (2018). DOI:10.1007/s00262-018-2252-7. **IF: 4.225.**
4. Khoury N, Zingkou E, Pampalakis G, **Sofopoulos M**, Zoumpourlis V, Sotiropoulou G. **KLK6 protease accelerates skin tumor formation and progression.** Carcinogenesis. 2018 Aug 23. doi: 10.1093/carcin/bgy110. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1093/carcin/bgy110 **IF:5.072.**
 5. Deskoulidi P ,**Sofopoulos M** ,Diamantopoulos P ,Nikolaidou T ,Maltzaris N ,Theodorakopoulou M ,Klonaris C ,Arnogiannaki N ,Kotrotsiou M ,Stavrianos S. **Dermatofibrosarcoma protuberans coexisting in a patient with a vascular malformation - a rare coincidence.** J Surg Case Rep. 2017 Oct 9;2017(10):rjx192. DOI: 10.1093/jscr/rjx192. eCollection 2017 Oct.
 6. Sotirios P. Fortis†, **Michael Sofopoulos†**, Nectaria N. Sotiriadou, Christoforos Haritos, Christoforos K. Vaxevanis, Eleftheria A. Anastasopoulou, Nicole Janssen, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Graham Pawelec, Sonia A. Perez† and Constantin N. Baxevanis†. **“Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer”.** Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2017;5:39 DOI: 10.1186/s40425-017-0240-7. **†Contributed equally first author. IF 8.29 (Τμήμα της Διδακτορικής Διατριβής).**
 7. Nicole Janssen, Sotirios P. Fortis, Lisa Speigl, Christoforos Haritos, Nectaria N. Sotiriadou, **Michael Sofopoulos**, Niki Arnogiannaki ,Catherine Stavropoulos-Giokas, Amalia Dinou, Sonia Perez ,Graham Pawelec ,Constantin N. Baxevanis, Christopher Shipp. **“Peripheral T cell responses to tumour antigens are associated with molecular, immunogenetic and cellular features of breast cancer patients.”** Breast Cancer Res Treat. 2016 Oct 27 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s10549-016-4037-z. **IF: 4.085.**
 8. Dimitrios K. Nasikas, George H. Sakorafas, **Michael Sofopoulos**, Niki Arnogiannaki. **“Malignant Solitary Fibrous Tumor of the Thigh: A Case Report”.** Journal of Cancer Biology & Research 2016 Vol4 No 3.
 9. Farr OM, **Sofopoulos M**, Tsoukas MA, Dincer F, Thakkar B, Sahin-Efe A, Filippaios A, Bowers J, Srnka A, Gavrieli A, Ko BJ, Liakou C, Kanyuch N, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. **“GLP-1 receptors exist in the parietal cortex, hypothalamus and medulla of human brains and the GLP-1 analogue liraglutide alters brain activity related to highly desirable food cues in individuals with diabetes: a crossover, randomised, placebo-controlled trial.”**

Diabetologia. 2016 , Vo 59, No. 5, pages 954-965. DOI:10.1007/s00125-016-3874-y. **IF:6.023.**

10. Dimitrios K Nasikas, **Michael Sofopoulos**, Niki Arnogiannaki, and George H. Sakorafas. "**C-cell hyperplasia as an incidental finding in a patient with papillary thyroid microcarcinoma.**" International Journal of Endocrine Oncology 2015 Vol. 2, No. 4, Pages 257-262. DOI: 10.2217/ije.15.21
11. Vasileiadis I, **Sofopoulos M**, Arnogiannaki N, Georgopoulos S. "**A Merkel-cell carcinoma metastatic to the tonsil: a case report and review of the literature.**" J Oral Maxillofac Surg. 2013 Oct;71(10):1812.e1-6. DOI: 10.1016/j.joms.2013.06.196. **IF:1.7**

4. Ανακοινώσεις: 56 (23 Διεθνείς, 33 Ελληνικές) με 2 Βραβεία (1 Διεθνές και 1 Εγχώριο)

Βραβεία

1. **Outstanding Abstract Award.** Endocrine Society annual meeting, ENDO 2016 April 1- 4, 2016 Boston, MA, USA. Για την εργασία "**GLP-1 Receptors Exist in the Parietal Cortex, Hypothalamus, and Medulla of Human Brains and the GLP-1 Analog Liraglutide Administered in the Context of a Cross-over, Randomized, Placebo-Controlled Trial Alters Brain Activity in Response to Highly Desirable Food Cues in Individuals with Diabetes**". Olivia M. Farr, **Michail Sofopoulos**², Michael A. Tsoukas, Fadime Dincer, Bindiya Thakkar, Ayse Sahin-Efe, Andreas Filippaios, Jennifer Bowers, Alexandra Srnka, Anna Gavrieli, Byung-Joon Ko, Chrysoula Liakou, Nickole Kanyuch, Sofia Tseleni-Balafouta and Christos S. Mantzoros
2. **Β' Βραβείο Εφαρμοσμένης Έρευνας Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών.** 42ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο για την εργασία "**Ανοσολογικές «υπογραφές» εντός του όγκου και στο περιφερικό αίμα ως βιοδείκτες πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού.**" Σ. Φόρτης, Λ. Μαχαίρα, Χ. Χαρίτος, Ν. Σωτηριάδου, **Μ. Σοφόπουλος**, Βουτσάς, Ε. Αναστασοπούλου, Ν. Αρνογιαννάκη, Σ. Περέρζ, Κ. Μπαξεβάνης

Διεθνείς Ανακοινώσεις: 24 (13 ως 1^ο-2^ο όνομα και 10 από 3^η θέση και χαμηλότερα)

1. **The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer.** **M.Sofopoulos***, S.Fortis*, C.Vaxevanis, N.Sotiriadou, N.Arnogiannaki, A.Ardavanis, D. Vlachodimitropoulos, S. Perez, C. Baxevanis 19th international conference on progress in vaccination against cancer (PIVAC) 7-9 June 2019 Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece.

2. **Serum miRNA-based distinct clusters define three groups of breast cancer patients with different clinicopathological and immune characteristics.** Sotirios P. Fortis, Christoforos K. Vaxevanis, Louisa G. Mahaira, **Michael Sofopoulos**, Nectaria N. Sotiriadou, Amalia Dinou, Niki Arnogiannaki, Catherine Stavropoulos-Giokas, Dimitris Thanos, Constantin N. Baxevanis, Sonia A. Perez. Πρόκειται να παρουσιαστεί προφορικά και ως πόστερ στο 4th Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy. Athens November 29- December 1, 2018.
3. **A comprehensive clinicopathological evaluation of the oncosuppressor microRNA-195 expression among breast tumours.** G. Papachristopoulou, S. Tsitsiou, N. Koufopoulos, **M. Sofopoulos**, E. Pigadioti, N. Arnogiannaki, A. Scorilas. Saint Savvas Cancer Hospital, Pathology, Athens, Greece. 30th European Congress of Pathology, Bilbao 8–2 September 2018.
4. **Histiocytoid/signet ring carcinoma of the eyelid. A case report of the “Monocle Tumour”.** E. Skafida, **M. Sofopoulos**, V. Michelis, S. Tsitsiou, N. Arnogiannaki. St. Savvas Anticancer Hospital, Dept. of Pathology, Athens, Greece. 30th European Congress of Pathology, Bilbao 8–2 September 2018.
5. **Adenocarcinoma of fetal lung type: report of a case.** E. Skafida , **M. Sofopoulos**, S. Simopoulou, E. Arkoumani, N. Arnogiannaki St. Savvas Anticancer Hospital, Dept. of Pathology, Athens, Greece. 30th European Congress of Pathology, Bilbao 8–2 September 2018
6. **Glomus tumour of uncertain malignant potential. A case report.** E. Skafida , **M. Sofopoulos**, S. Simopoulou, E. Kanari, N. Arnogiannaki. St. Savvas Anticancer Hospital, Dept. of Pathology, Athens, Greece. 30th European Congress of Pathology, Bilbao 8–2 September 2018.
7. **Clear cell urothelial carcinoma. Report of a case.** E. Skafida , **M. Sofopoulos**, G. Papias, N. N. Sotiriadou, S. Simopoulou. St. Savvas Anticancer Hospital, Dept. of Pathology, Athens, Greece. 30th European Congress of Pathology, Bilbao 8–2 September 2018
8. **Tertiary Lymphoid Structures in breast cancer: Evaluating their correlation with tumor immune-cell infiltration and clinical outcome.** **Michael Sofopoulos**, Christoforos K. Vaxevanis, Sotirios P. Fortis, Nectaria N. Sotiriadou, Niki Arnogiannaki, Alexandros Ardavanis, Dimitrios Vlachodimitropoulos, Constantin N. Baxevanis, Sonia A. Perez. 3rd Symposium on Advances in Cancer Immunology and Immunotherapy. Athens 2-4 November 2017
9. **GLP-1 Receptors Exist in the Parietal Cortex, Hypothalamus, and Medulla of Human Brains and the GLP-1 Analog Liraglutide Administered in the Context**

of a Cross-over, Randomized, Placebo-Controlled Trial Alters Brain Activity in Response to Highly Desirable Food Cues in Individuals with Diabetes. Olivia M. Farr*¹, **Michail Sofopoulos**², Michael A. Tsoukas¹, Fadime Dincer³, Bindiya Thakkar⁴, Ayse Sahin-Efe⁵, Andreas Filippaios³, Jennifer Bowers³, Alexandra Srnka³, Anna Gavrieli³, Byung-Joon Ko³, Chrysoula Liakou², Nickole Kanyuch³, Sofia Tseleni-Balafouta⁶ and Christos S. Mantzoros ¹Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, ²St. Savvas Anticancer-Oncology Hospital, ³Harvard Medical School/ Beth Israel Deaconess Medical Center, ⁴Harvard Medical School/ Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, ⁵Harvard Medical School/ Beth Israel Deaconess, ⁶University of Athens, Medical School, ⁷BIDMC, Harvard, Boston, MA. **Outstanding Abstract Award.** Endocrine Society annual meeting, ENDO 2016. April 1-4, 2016 Boston, MA, USA.

10. **Linking tumor with systemic environment in the search for novel biomarkers in breast cancer** Sotirios P Fortis^{1*}, Louisa G Mahaira¹, **Michael Sofopoulos**², Nectaria Sotiriadou², Christoforos Haritos¹, John F Voutsas¹, Nikolaos Anastasopoulos¹, Niki Arnogiannaki², Christopher Shipp³, Graham Pawelec³, Sonia A Perez¹, Constantin Baxevanis¹ ¹ Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece ² Pathology Department, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece ³ Tuebingen University Hospital, Tuebingen, Germany 30th Annual Meeting and Associated Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2015) National Harbor, MD, USA. 4-8 November 2015
11. **The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) as prognostic/predictive biomarkers in patients with breast cancer (Bca)** S. P. Fortis ¹, C. Haritos¹, **M. Sofopoulos**², N. N. Sotiriadou², N. Anastasopoulos¹, M. Papamichail¹, S. A. Perez¹, C. N. Baxevanis¹ 1.Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece. 2.Saint Savas Cancer Hospital, Pathology Department, Athens, Greece.4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 6-9 September 2015
12. **Liquid biopsies as tool for prognostic/predictive biomarker discovery in Breast Cancer patients** S. P. Fortis¹, L. Mahaira¹, N. Anastasopoulos¹, C. Haritos¹, **M. Sofopoulos**², E. Iliopoulou¹, I. Kalogeropoulou¹, S. A. Perez¹, C. N. Baxevanis¹; 1. Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece 2.Saint Savas Cancer Hospital, Pathology Department, Athens, Greece. 4th European Congress of Immunology (ECI) Vienna 6-9 September 2015

13. **Intratumoral and systemic immunity as prognostic biomarkers in patients with breast cancer** Fortis S.P.¹, Sotiriadou N.², **Sofopoulos M.**², Haritos C.¹, Arnogiannaki N.², Anastasopoulos N.¹, Pawelec G.³, Papamichail M.¹, Perez S.A.¹, Baxevanis C.N.¹; 1.Cancer Immunology and Immunotherapy Center, Saint Savas Cancer Hospital, Athens, Greece, 2.Saint Savas Cancer Hospital, Pathology Department, Athens, Greece, 3.Center for Medical Research, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany Cancer immunotherapy (CIMT) 13th Annual Meeting May 11–13, 2015 Mainz, Germany
14. **A rare finding of a synchronous adenocarcinoma and leiomyosarcoma of the uterus** N.Koufopoulos¹, **M. Sofopoulos**¹, N. Arnogiannaki¹, N. Koureas², D.P. Carrer², Paraoulakis², D. Zygouris², C. Grigoriadis², N. Mylona¹, E. Terzakis² ¹ Pathology, Oncological Hospital of Athens “Saint Savvas”, Athens, Greece. ²Gynaecology, Oncological Hospital of Athens “Saint Savvas”, Athens, Greece The 18th ESGO International Meeting Liverpool, UK, October 19-22, 2013
15. **Pathological data on 19 cases of endometrioid carcinoma of the endometrium in women of reproductive age.** N. Koufopoulos¹, D.P. Carrer², N. Koureas², **M. Sofopoulos**¹, I. Paraoulakis², G. Androutsopoulos³, N. Arnogiannaki¹, D. Zygouris², G. Derdelis², E. Terzakis² ¹ Pathology, Oncological Hospital of Athens “Saint Savvas”, Athens, Greece ²Gynaecology, Oncological Hospital of Athens “Saint Savvas”, Athens, Greece ³ Gynaecology, University General Hospital of Patra, Patra, Greece The 18th ESGO International Meeting Liverpool, UK, October 19-22, 2013
16. **Mediastinal thymoma coexisting with intrapulmonary mature teratoma.** N Mylona, **M. Sofopoulos**, N. Koufopoulos, S. Tsitsiou, S. Ntoumou, N. Arnogiannaki Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece . 25th European Congress of Pathology, Lisbon 31 August – 4 September 2013
17. **Atypical pleomorphic adenoma of the lacrimal gland: Report of a case.** **M. Sofopoulos**, N. Mylona, N. Koufopoulos, A. Vacarciuc, V. Petrou, N. Arnogiannaki Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece . 25th European Congress of Pathology, Lisbon 31 August – 4 September 2013
18. **Post-radiation angiosarcoma of the breast: Report of a case.** A. Apostolaki, **M. Sofopoulos**, S. Tsitsiou, E. Pigadioti, N. Mylona, N. Arnogiannaki Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece . 24th European Congress of Pathology 8 – 12 September 2012.

19. **Giant cell tumor of the temporal bone: Report of a case.** N. Arnogiannaki, **M. Sofopoulos**, E. Pigadioti, N. Koufopoulos, A. Vacarciuc, A. Apostolaki . Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece . 24th European Congress of Pathology 8 – 12 September 2012.
20. **Oncocytoma (oxyphil adenoma) of the lacrymal caruncle.** N. Arnogiannaki, **M.Sofopoulos**, A. Apostolaki, M. Gazalidou, E. Koniaris, N. Koufopoulos, A. Vacarciuc. Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece . 23rd European Congress of Pathology 27 August to 1 Sep 2011.
21. **Sebaceous gland carcinoma of the eyelid with comedocarcinoma features.** N. Arnogiannaki, **M. Sofopoulos**, M. Gazalidou, N. Koufopoulos, S. Tsitsiou, B. Anagnostopoulou, L. Pappa. Department of Surgical Pathology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece. 23rd European Congress of Pathology 27 August to 1 Sep 2011.
22. **Basaloid squamous carcinoma of the tongue.** A. Apostolaki, N. Arnogiannaki, M. Gazalidou, S. Tsitsiou, N. Koufopoulos, **M. Sofopoulos**, A. Vacarciuc, E. Koniaris. Department of Surgical Pathology Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece. 23rd European Congress of Pathology 27 August to 1 Sep 2011.
23. **Mixed invasive cribriform and lobular carcinoma of the breast. A case report** Arnogiannaki N., Apostolaki A., Righa M., Xecotea A., Theodoropoulou G., **Sofopoulos M.**, Anagnostopoulou V., Tsitsiou S. Georgiadi E. Department of Pathology, Anticancer Oncologic Hospital "Saint Savvas", Greece , 3rd Hellenic Jordanian congress of Pathology Oct 29-31 2009.
24. **Borderline Brenner Tumours of the Ovary - Report of two cases** Arnogiannaki N., Martzoukou I., Biteli M., Negris V., Gakidis P., Michelis V., Aslanidis O, **Sofopoulos M.** Department of Pathology, Anticancer Oncologic Hospital “St. Savvas”, Athens, Greece. 22nd European Congress of Pathology 4-9 September 2009.

Ελληνικές / μη διεθνείς: 15 (ως 1^ο-2^ο όνομα)

1. **Η πιθανή προγνωστική σημασία των τριτογενών λεμφοειδών δομών (TLS) στον καρκίνο του μαστού.** Μ. Σοφόπουλος¹, Σ. Φόρτης², Χ. Βαξεβάνης², Ν. Σωτηριάδου¹, Ν. Αρνογιαννάκη¹, Α. Αρδαβάνης³, Δ. Βλαχοδημητρόπουλος⁴, Κ. Μπαξεβάνης² Σ. Πέρεζ². 1.Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», 2.Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθερα-πείας του Καρκίνου, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», 3.Α' Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», 4.Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ.45^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 15-19 Μαΐου.

2. **Ουροθηλιακό καρκίνωμα τροφοβλαστικού τύπου: παρουσίαση περιστατικού.** Ε. Σκαφίδα, **Μ. Σοφόπουλος**, Γ. Παπαχριστοπούλου, Σ. Σιμοπούλου, Ν. Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας». 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018.
3. **Τριχοβλάστωμα μαστού. Ένας ασυνήθης νεοπλασματικός όγκος σε μια σπάνια εντόπιση.** **Μ. Σοφόπουλος**, Ε. Σκαφίδα, Σ. Σιμοπούλου, Γ. Παπαχριστοπούλου, Ν. Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας». 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018.
4. **Αμυλοείδωση αρνητική στην congo-red: μια πιθανή διαγνωστική παγίδα.** Ν. Γούτας, **Μ. Σοφόπουλος**, Β. Μηλιώνης, Σ. Παπαδόδημα, Κ. Κάτσος, Χ. Σπηλιοπούλου, Δ. Βλαχοδημητρόπουλος. Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018.
5. **Διαβητική μαστοπάθεια: περιγραφή μιας περίπτωσης.** **Μ. Σοφόπουλος**, Ε. Σκαφίδα, Σ. Σιμοπούλου, Ν. Σωτηριάδου, Ν. Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας». 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018.
6. **Ορώδες καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοηθείας με μεταβατικά χαρακτηριστικά** Ε. Σκαφίδα, **Μ. Σοφόπουλος**, Ν. Σωτηριάδου, Σ. Σιμοπούλου, Ν. Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας». 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018
7. **Φλοιοεπινεφριδιακό Καρκίνωμα: τυχαίο εύρημα σε 70χρονη ασθενή** **Μ. Σοφόπουλος**, Ε. Σκαφίδα, Ν. Κουφόπουλος, Κ. Φράγκου, Σ. Σιμοπούλου, Ν. Αρνογιαννάκη. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ». 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 8-11 Ιουνίου 2016.
8. **Κακόηθες Μεσοθηλίωμα Περιτοναίου: Περιγραφή μιας περίπτωσης** **Μ. Σοφόπουλος**, Ν. Κουφόπουλος, Ε. Σκαφίδα, Π. Τζιάκου, Λ. Χάλντη, Ν. Αρνογιαννάκη. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ» 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 8-11 Ιουνίου 2016.
9. **Κοκκιοκυτταρικός όγκος μαστού** Ν.Μυλωνά, **Μ.Σοφόπουλος**, Σ.Ντούμου, Κ.Κύρκου, Λ.Χάλντη, Ν.Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α «Αγ. Σάββας». 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 18-21 Ιουνίου 2014.

10. **Καρκινοσάρκωμα η σαρκωματοειδές καρκίνωμα ουροδόχου κύστεως**
 Ν.Μυλωνά, **Μ.Σοφόπουλος**, Σ.Ντούμου, Κ.Καπάτου, Ε.Μπεχράκη,
 Ν.Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α. «Αγ. Σάββας». 14^ο
 Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 18-21 Ιουνίου 2014.
11. **Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα πνεύμονα: περιγραφή περιπτώσεως**
Μ.Σοφόπουλος, Σ.Ντούμου, Ν.Μυλωνά, Σ.Τσίτσιου, Ε.Πηγαδιώτη,
 Ν.Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α. «Αγ. Σάββας». 14^ο
 Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 18-21 Ιουνίου 2014.
12. **Άτυπο πλειόμορφο αδένωμα δακρυϊκού αδένου** Σ.Ντούμου, **Μ.Σοφόπουλος**,
 Ν.Μυλωνά, Ν.Κουφόπουλος, Σ.Καραλής, Ε.Κύρκου, Ν.Αρνογιαννάκη.
 Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α. «Αγ. Σάββας». 14^ο Πανελλήνιο
 Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 18-21 Ιουνίου 2014.
13. **Κακοήθης όγκος των νευρικών ελύτρων με οστική και ραβδομυοειδή**
διαφοροποίηση **Μ.Σοφόπουλος**, Ν.Μυλωνά, Σ.Ντούμου, Α.Βακαρτσιουκ,
 Σ.Σιμοπούλου, Ν.Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α. «Αγ.
 Σάββας». 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 18-21 Ιουνίου 2014.
14. **Βασικοκυτταροειδούς τύπου καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων του πνεύμονα**
 Ν.Αρνογιαννάκη, **Μ.Σοφόπουλος**, Σ.Τσίτσιου, Ε.Πηγαδιώτη, Α.Καλούδη,
 Κ.Αποστολάκη. Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α «Αγ. Σάββας». 13^ο
 Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 14-17 Ιουνίου 2012.
15. **Κοκκιοκυτταρικός όγκος εφηβαίου** Ν.Αρνογιαννάκη, **Μ.Σοφόπουλος**,
 Σ.Τσίτσιου, Ε.Πηγαδιώτη, Ν.Μυλωνά, Κ.Αποστολάκη. Παθολογοανατομικό
 εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α «Αγ. Σάββας». 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής
 Ανατομικής 14-17 Ιουνίου 2012.

Ελληνικές/μη διεθνείς ανακοινώσεις ως 3^ο και πλέον όνομα : 19

1. **«Μοριακές και ανοσολογικές υπογραφές»: βιοδείκτες στη σταδιοποίηση**
ασθενών με καρκίνο του μαστού» Σ. Φόρτης¹, Χ. Βαξεβάνης¹, Λ. Μαχαίρα¹, Μ.
 Σοφόπουλος², Α. Ντίνου³, Α. Σταυροπούλου-Γκικόκα³, Δ. Θάνος⁴, Κ. Μπαξεβάνης¹
 , Σ. Περέζ¹. 1.Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Γ.Α.Ο.Ν.Α.
 «Ο Άγιος Σάββας», 2.Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος
 Σάββας», 3.Ελληνική Τράπεζα Ομφαλοπλακουντιακού Αίματος, ΙΙΒΕΑΑ, Αθήνα,
 4.Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), Αθήνα. 44^ο
 Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 9-12 Μαΐου Αθήνα. **Β' Βραβείο**
Εφαρμοσμένης Έρευνας Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών

2. **Διαδερμικές στερεοτακτικές βιοψίες μαστού. Συστήματα βιοψιών: SENORX και BLES. Περιγραφή και τρόπος εφαρμογής, ενδείξεις-περιορισμοί.** Ειρ. Γεωργίου¹, Μ. Μηλάτου¹, Α. Σουλτάτος¹, Κ. Μπόκιου¹, Α. Δημητρουλάκου¹, Α. Εμμανουηλίδου¹, Μ. Σοφόπουλος², Ρ. Αγγελάτου¹. 1.Τμήμα Διαγνωστικής Μαστού, ΓΑΟΝΑ. «Άγιος Σάββας», Αθήνα, 2.Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα 6^ο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Επαγγελματικής Εκπαίδευσης στην Ακτινοδιαγνωστική. Αθήνα 6-8 Οκτωβρίου 2017.
3. **Συσχέτιση προκαρκινικών αλλοιώσεων με βαθμό επικινδυνότητας ανάπτυξης καρκίνου. του μαστού.** Εμπειρία από ογκολογικό νοσοκομείο. Ειρ. Γεωργίου¹, Μ. Μηλάτου¹, Κ. Μπόκιου¹, Κ. Ψαρράς¹, Α. Σουλτάτος¹, Ν. Κρητικός¹, Μ. Σοφόπουλος², Ρ. Αγγελάτου¹. 1.Τμήμα Διαγνωστικής Μαστού, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα. 2.Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα. 6^ο Συνέδριο Συνεχιζόμενης Επαγγελματικής Εκπαίδευσης στην Ακτινοδιαγνωστική. Αθήνα 6-8 Οκτωβρίου 2017
4. **Στερεοτακτική βιοψία μαστού: ποια η ερμηνεία και ποια τα αίτια της πιθανής παρουσίας μικροαποτιτανώσεων μετά τη βιοψία.** Ειρ. Γεωργίου¹, Κ. Μπόκιου¹, Κ. Καββαδίας¹, Γ. Κινόγλου², Μ. Κολοφράντζα¹, Μ. Σοφόπουλος³, Ρ. Αγγελάτου¹. 1.Τμήμα Διαγνωστικής Μαστού, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα. 2.Χειρουργικός Τομέας, Κλινική Μαστού, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα. 3.Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, ΓΑΟΝΑ «Άγιος Σάββας», Αθήνα. 20^ο Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο Αθήνα 4-6 Νοεμβρίου 2016
5. **Νευρίνωμα διάχτου τύπου.** Σ. Σιμοπούλου, Κ. Φράγκου, Ε. Σκαφίδα, Μ. Σοφόπουλος, Ε. Κανάρη, Ν. Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α «Ο Άγιος Σάββας». 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018
6. **Ιστολογικός προσδιορισμός της ηλικίας κύησης σε εξωμήτριο κύηση: Μύθος ή πραγματικότητα.** Κ. Κάτσος, Δ. Βλαχοδημητρόπουλος, Β. Μηλιώνης, Μ. Σοφόπουλος, Ν. Γούτας, Χ. Φανάκη, Χ. Σπηλιοπούλου. Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη 13-16 Ιουνίου 2018
7. **Κακώθες ινώδες ιστιοκυττωμα μηρού.** Νασίκας Δ.¹, Τζωρτζοπούλου Α.¹, Μπαλαλής Δ.¹, Δαμαλάς Κ.¹, Μπάμπαλη Η.¹, Λυσικάτου Ζ.¹, Σοφόπουλος Μ.², Αρνογιαννάκη Ν.², Σακοράφας Γ.¹. 1 Κλινική Χειρουργικής Όγκολογίας, 2 Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, ΑΟΝΑ. “Ο Άγιος Σάββας” 30^ο Πανελλήνιο

- Συνέδριο Χειρουργικής & Διεθνές χειρουργικό Φόρουμ Θεσσαλονικιώτικη, 9-12 Νοεμβρίου 2016
8. **Η αναγκαιότητα ανίχνευσης της B-RAF μετάλλαξης στο μεταστατικό μελάνωμα. Παρουσίαση της εμπειρίας μας και ανασκόπηση βιβλιογραφίας.** Π.Διαμαντόπουλος¹, Π.Δεσκούλιδη¹, Δ.Αγορογιάννης¹, Θ.Κορόγιαννος², Π.Γκούβερης², Μ.Σοφόπουλος³, Ν.Αρνογιαννάκη³, Θ.Πετρακοπούλου¹, Γ.Ζαρκάδας¹. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μελανώματος Λαρισα 20-23 Οκτωβρίου 2016 1 Κλινική Πλαστικής Χειρουργικής, Α.Ο.Ν.Α. “Ο Άγιος Σάββας”, 2 Β’ Παθολογική κλινική, Α.Ο.Ν.Α. “Ο Άγιος Σάββας”, 3 Παθολογοανατομικό τμήμα, Α.Ο.Ν.Α. “Ο Άγιος Σάββας”
 9. **Μετανεφρικό αδένωμα** Κ. Φράγκου, Σ. Σιμοπούλου, Ε. Σκαφίδα, Ν. Κουφόπουλος, Μ. Σοφόπουλος, Ν. Αρνογιαννάκη. Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ».15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 8-11 Ιουνίου 2016.
 10. **Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του προστάτη** Ν. Κουφόπουλος, Ε. Σκαφίδα, Μ. Σοφόπουλος, Σ. Σιμοπούλου, Μ. Θεοδωρακοπούλου, Κ. Φράγκου, Ν. Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Α.Ο.Ν.Α «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ».15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 8-11 Ιουνίου 2016.
 11. **Ανοσολογικές «υπογραφές» εντός του όγκου και στο περιφερικό αίμα ως βιοδείκτες πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού.** Σ. Φόρτης¹, Λ. Μαχαίρα¹, Χ. Χαρίτος¹, Ν. Σωτηριάδου², Μ. Σοφόπουλος², Ι. Βουτσάς¹, Ε. Αναστασοπούλου¹, Ν. Αρνογιαννάκη², Σ. Περέζ¹, Κ. Μπαξεβάνης¹ 1 Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ» 2 Παθολογοανατομικό εργαστήριο, Γ.Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ». (Β’ Βραβείο Εφαρμοσμένης Έρευνας). 42^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Αθήνα 11-14 Μαΐου 2016
 12. **Η 15ετη εμπειρία μας στην αντιμετώπιση σαρκωμάτων μαλακών μορίων - Προκαταρκτική ανακοίνωση.** Π. Δεσκούλιδη, Μ. Κοτρώτσιου, Κ. Μπενετάτος, Μ. Σοφόπουλος, Ν. Αρνογιαννάκη, Σ. Σταυριανός. 21ο Κοινό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής & Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού και Άνω Άκρου 19-21 Νοεμβρίου 2015 Ιωάννινα.
 13. **Όγκοι βάσης κρανίου** Π. Δεσκούλιδη, Μ. Σκολαρίκου, Μ. Σοφόπουλος, Κ. Μπενετάτος, Γ. Ζαρκάδας, Σ. Σταυριανός. 21ο Κοινό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επανορθωτικής Μικροχειρουργικής & Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Χεριού και Άνω Άκρου 19-21 Νοεμβρίου 2015 Ιωάννινα.

14. **Όγκοι τριχωτού κεφαλής** Π. Γεωργαντάς, Π. Δεσκούλιδη, Μ. Κοτρώτσιου, Μ. Σοφόπουλος, Γ. Ζαρκάδας, Σ. Σταυριανός, 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Πλαστικής Επανορθωτικής & Αισθητικής Χειρουργικής 5-7 Νοεμβρίου 2015, Θεσσαλονίκη
15. **Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα μαστού με κυλινδροματωειδές πρότυπο ανάπτυξης** Κ.Αποστολάκη, Σ.Τσίτσιου, Ε.Πηγαδιώτη, Μ.Σοφόπουλος, Λ.Παππά, Ν.Αρνογιαννάκη Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α «Αγ. Σάββας». 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 14-17 Ιουνίου 2012.
16. **Υαλοειδοποιούμενος δοκιδώδης όγκος θυρεοειδούς αδένα** Κ. Αποστολάκη, Ε. Πηγαδιώτη, Σ. Τσίτσιου, Μ. Σοφόπουλος, Λ. Παππά, Ν. Αρνογιαννάκη. Παθολογοανατομικό εργαστήριο Α.Ο.Ν.Α «Αγ. Σάββας». 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής 14-17 Ιουνίου 2012.
17. **Αμάρτωμα πνεύμονα περιγραφή δύο περιπτώσεων.** Ν.Αρνογιαννάκη, Α.Φειδά, Αικ.Αποστολάκη, Γ.Θεοδωροπούλου, Μ.Σοφόπουλος, Ν.Κουφόπουλος, Μ.Γαζαλίδου, Αποσ.Δούντσης, Κ.Βασιλικός. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Ελληνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο, Νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας», Αθήνα 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής Θεσσαλονίκη 16-19 Ιουνίου 2010.
18. **Σπάνιες μορφές λειομυμάτων της μήτρας, περιγραφή έξι περιπτώσεων** Ν.Αρνογιαννάκη, Αικ.Αποστολάκη, Α.Φειδά, Μ.Γαζαλίδου, Μ.Σοφόπουλος, Γ.Θεοδωροπούλου, Ν.Κουφόπουλος, Μ.Ρήγα, Π.Γακίδης. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Ελληνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο, Νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας», Αθήνα. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής Θεσσαλονίκη 16-19 Ιουνίου 2010.
19. **Πρωτοπαθές λέμφωμα ωθήκης, περιγραφή μιας περίπτωσης** Ν.Αρνογιαννάκη, Αικ.Αποστολάκη, Α.Φειδά, Γ.Θεοδωροπούλου, Μ.Σοφόπουλος, Ι.Μαρτζούκου, Α.Ξεκοτέα, Α.Βακαρτσιούκ. Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, Ελληνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο, Νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας», Αθήνα. 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής Θεσσαλονίκη 16-19 Ιουνίου 2010.

5. Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα: 1

Συμμετοχή ως παθολογοανατόμος στο ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο «**Η ανοσολογική “ταυτότητα” εντός του όγκου και στο περιφερικό αίμα σαν βιοδείκτες πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού**», επιχορηγούμενο από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας: με κωδικό ΓΓΕΤ GER_1968 (ακρωνύμιο ISPEBREAST), από το οποίο έχουν προκύψει 8 ανακοινώσεις (5 διεθνείς και 3 εγχώριες) και 3 εργασίες που έχουν δημοσιευθεί στο περιοδικό **Breast Cancer Research, Cancer Immunol Immunother** και στο **J. Immunother. Cancer**.

Γ' Εκπαιδευτική δραστηριότητα ως εκπαιδευόμενος

1. Μετεκπαίδευση σε Κέντρο/Κέντρα Ελλάδας ή εξωτερικού μετά τη λήψη τίτλου ειδικότητας:

Μετεκπαίδευση διάρκειας 9 μηνών (Αύγουστος 2014 - Μάιος 2015) στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε νεκροψίες-νεκροτομές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις νεκροτομικών παρασκευασμάτων.

2. Παρακολούθηση μετεκπαιδευτικών δραστηριοτήτων

Μετά τη λήψη τίτλου ειδικότητας: Accreditation: 543 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (ΣΙΕ-CME-CPD) 451 από συνέδρια/σεμινάρια και 92 από από διαδικτυακή (online) παρακολούθηση και μετέπειτα εξέταση σεμιναρίων της ακαδημίας United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP). Συμπεριλαμβάνονται:

Πανελλήνια συνέδρια Παθολογικής Ανατομικής

Πανευρωπαϊκά συνέδρια Παθολογικής Ανατομικής

Πριν από τη λήψη του τίτλου της ειδικότητας: Accreditation: 401 μόρια Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης (ΣΙΕ-CME-CPD) στα οποία συμπεριλαμβάνονται:

Εκπαιδευτικό πρόγραμμα Μοριακής Παθολογικής Ανατομικής (12/2009-6/2013-Έξι εξάμηνα υπό μορφή ημερίδων με έξι διαλέξεις ανά ημερίδα). 1^η Ενότητα: Αρχές Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας. 2^η Ενότητα: Τεχνικές Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας. 3^η Ενότητα: Μοριακή Ιστοπαθολογία / Παθολογική Ανατομική.

Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Α' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής (πολυάριθμα)

Πανελλήνια Συνέδρια Παθολογικής Ανατομικής (3)

Πανευρωπαϊκά συνέδρια Παθολογικής Ανατομικής (2)

Δ' Άλλες πληροφορίες:

Ξένες γλώσσες

Ιταλικά (Άριστα – Πανεπιστημιακό επίπεδο)

Αγγλικά (Πολύ Καλά-Advanced Certificate)

Γνώση Η/Υ

Linux OS (Ubuntu), Windows OS (XP,Vista,7),

Open/LibreOffice Impress, Open/LibreOffice Writer, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, GNU Image Manipulation Program (GIMP). Automatic Camera Tamer (ACT-1) Version 2 photomicrographic process software. Leica LAS EZ photomicrographic software. ImageJ (cell/particle measurement and analysis). Jamovi statistical software

Ταυτότητα ORCID: orcid.org/0000-0001-8084-4307

Researchgate: https://www.researchgate.net/profile/Michail_Sofopoulos

Μέλος επιστημονικών εταιριών

- Ελληνική Εταιρία Παθολογικής Ανατομικής
- Ευρωπαϊκή Εταιρία Παθολογικής Ανατομικής - European Society of Pathology (ESP)
- Διεθνής Εταιρία Δερματοπαθολογίας- International Society of Dermatopathology (ISDP)
- Διεθνής Εταιρία Παθολογίας Μαστού - International Society of Breast Pathology (ISBP)
- Εταιρία Παθολογίας Γαστρεντερικού “Rodger C. Haggitt” - Rodger C. Haggitt Gastrointestinal Pathology Society (GIPS)



Researchgate QR Code



ORCID QR Code