

О.В. Пославська

**МЕТАСТАЗИ КАРЦИНОМИ
З КЛІТИН МЕРКЕЛЯ
З ПОГЛЯДУ ДІАГНОСТИКИ ПУХЛИН
НЕВІДОМОЇ ПЕРВИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра патологічної анатомії і судової медицини
вул. В. Вернадського 9, Дніпро, 49084, Україна
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»
Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine
V. Vernadsky str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
e-mail: alexandra.poslavskaya@gmail.com

Цитування: Медичні перспективи. 2019. Т. 24, № 1. С. 40-45

Cited: Medicni perspektivi. 2019;24(1):40-45

Ключові слова: карцинома з клітин Меркеля, рак без первинної локалізації, CK20, ImageJ

Ключевые слова: карцинома из клеток Меркеля, рак без первичной локализации, CK20, ImageJ

Key words: Merkel cell carcinoma, cancer without primary localization, CK20, ImageJ

Реферат. Метастазы карциномы из клеток Меркеля с точки зрения диагностики опухолей неизвестной первичной локализации. Пославская А.В. Карцинома из клеток Меркеля (ККМ) – редкая злокачественная первичная неоплазия кожи с эпителиальной и нейроэктодермальной дифференцировкой. Проблемой ККМ, которая обуславливает актуальность её исследования, часто является высокая частота локального рецидива, регионального метастазирования в лимфатические узлы и дальнейшая гематогенная и/или дистанционная лимфогенная диссеминация. Материалы и методы. В работе проведен ретроспективный анализ биопсийного материала 6 пациентов с изолированным метастазом ККМ возрастом от 29 до 82 лет (среднее $63,11 \pm 16,24$; медиана 62,5). Для контрольной группы были отобраны 9 случаев послеоперационного материала первичных опухолей кожи с ККМ пациентов возрастом от 27 до 76 лет (среднее $52,17 \pm 12,72$; медиана 53,5) с целью определения дифференциально-диагностических критериев. Результаты исследования. Карциномы без первичной локализации могут быть интерпретированы как метастазы ККМ, если они демонстрируют фенотип Cytokeratin, Pan AE1/AE3 (парануклеарно +) / CK20 (парануклеарно +) / Vimentin (-) / CD45 (-) / S100 (-) / Chromogranin A (+) / Synaptophysin (+), а также обладают ядрами, площадь и периметр которых превышают в 2 раза показатели обычных лимфоцитов (все $p > 0,05$). Выводы. Метастатические ККМ без первичной локализации, в сравнении с местнораспространяющимися, чаще демонстрируют низкодифференцированные мелко-клеточные и переходные формы, которые требуют дополнительного проведения иммуногистохимического исследования с целью исключения метастазов карцином другого происхождения.

Abstract. Metastases of Merkel cell carcinoma in terms of diagnosing carcinomas with unknown primary localization. Poslavska O.V. Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare malignant primary skin neoplasia with epithelial and neuroectodermal differentiation. The problem of MCC, which determines the relevance of its research, is often a high frequency of local recurrence, regional lymph node metastasis and further hematogenous and/or distant lymphogenous dissemination. Materials and methods. A retrospective analysis of the biopsy material of 6 patients with isolated MCC metastasis aged from 29 to 82 years (average 63.11 ± 16.24 ; median 62.5) was carried out. For the control group, 9 cases of postoperative material of primary skin tumors with MCC of patients aged from 27 to 76 years (average 52.17 ± 12.72 ; median 53.5) were selected to determine the differential diagnostic criteria. The results of the study. Carcinomas without primary localization may be interpreted as MCC if they demonstrate phenotype Cytokeratin, Pan AE1/AE3 (paranuclearly +) / CK20 (paranuclearly +) / Vimentin (-) / CD45 (-) / S100 (-) / Chromogranin A (+) / Synaptophysin (+), with morphometric parameters of the area and perimeter, which is 2 times the size of ordinary lymphocytes, (all $p > 0.05$). Findings. Metastatic MCC without primary localization, in comparison with locally spreading, often exhibit low-differentiated small-cell and transitional forms, which require additional immunohistochemical study to exclude carcinomas of other origin.

Карцинома з клітин Меркеля (ККМ) є рідкісною злоякісною первинною неоплазмою

шкіри з епітеліальною та нейроектодермальною диференціацією. Пухлинні клітини ККМ ділять

морфологічні, імуногістохімічні та ультраструктурні особливості з диференційованими клітинами Меркеля. Але прямий гістогенетичний зв'язок є недоведеним, і деякі дослідники вважають їх пухлинами з плюрипотентних клітин-попередників. Вони належать до шкірних м'якотканинних неоплазій. Вперше описані в 1972 році Цирілом Токером як трабекулярна карцинома. Інші синоніми включають нейроендокринну карциному шкіри, первинну дрібноклітинну карциному шкіри та шкірну АПУДому. Причиною розвитку вважається ККМ-асоційований поліомавірус [4].

За даними ВООЗ, на 2017 рік у США налічується приблизно 1500 нових випадків ККМ, що зросло від 460 спостережень за 2011 рік (таким чином, більше ніж у 3 рази за 6 років). Частіше зустрічається в чоловіків, ніж у жінок 2:1. ККМ дуже агресивна, більше ніж 1/3 пацієнтів із цим діагнозом помирає, що в 2 рази перевищує смертність від меланому. Треба відзначити, що до 37% пацієнтів мають вузлову форму, але 6-12% презентують відділені метастази. Ці пухлини типово виникають на відкритих для сонця ділянках шкіри дорослих похилого віку (медіана віку 69 років). Анатомічне та географічне розповсюдження карциноми з клітин Меркеля залежить від сонячного опромінення як головного фактора. Відносно велика поширеність цих неоплазм зустрічається в пацієнтів з хронічною імуносупресією [5, 7].

Голова та шия ушкоджується в 50%, кінцівки – у 40%. Тулуб та геніталії беруть на себе менше ніж 10% випадків, ураження слизової також було описано. Більшість пухлин є солідними безболісними підвищеними вузлами або ущільненими бляшками червоного, фіолетового або тілесного кольору, іноді з виразкою. Більшість ККМ менше 2 см у діаметрі, що інколи ускладнює знаходження першоджерела при дисемінації процесу. Складність діагностики викликає необхідність імуногістохімічного дослідження, а діагностичний пошук включає базальноклітинну карциному, меланому, лімфому, екринну карциному, низькодиференційовану плоскоклітинну карциному, метастатичну нейробластому, первинну примітивну нейроектодермальну пухлину та метастази нейроендокринної карциноми [6, 8].

Проблемою ККМ, що зумовлює актуальність цього дослідження, є висока частота локального рецидиву, регіонального метастазування в лімфатичні вузли та подальшого гематогенного і/або дистанційного лімфогенного розповсюдження. Метастази ККМ без виявленого первинного осередку належать до 20% сприятливих фено-

типів, що мають кращий прогноз, порівняно з іншими 80% фенотипами раків без первинної локалізації [3]. Але клінічна діагностика після такого гістологічного діагнозу обов'язково включає повне обстеження, виключаючи інші можливі первинні локалізації та наявність множинних метастазів.

Мета – дослідити комплекс морфологічних, морфометричних та імуногістохімічних характеристик випадків ізольованих метастазів карциноми з клітин Меркеля, порівняно з первинними пухлинами шкіри такого походження, для вдосконалення діагностичних алгоритмів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі проведено ретроспективний аналіз гістологічних, морфометричних та імуногістологічних характеристик біопсійного матеріалу 6 пацієнтів (4 чоловіки та 2 жінки) з ізольованими метастазами карцином з клітин Меркеля віком від 29 до 82 років (середнє $63,11 \pm 16,24$; медіана 62,5), на базі морфологічного відділу лікувально-діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м. Дніпро) за період 2015-2017 рр. Для контрольної групи порівняння гістологічних та морфометричних характеристик були відібрані 9 випадків післяопераційного матеріалу первинних пухлин шкіри карцином з клітин Меркеля пацієнтів (5 жінок та 4 чоловіків) віком від 27 до 76 років (середнє $52,17 \pm 12,72$; медіана 53,5). Локалізації первинного матеріалу були розподілені так: 4 ділянки щік, 3 у ділянці стегна, 1 – шкіра гомілки та 1 – передпліччя.

Для морфометричного методу була використана камера мікроскопа Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition, інформативні поля зору були зафіксовані у форматі .jpg й оброблені в програмі ImageJ з визначенням периметра, площі та круглості ядер (рис. 1), згідно з методикою, описаною в інших публікаціях [1, 2]. Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно з протоколами компанії TermoScientific (TS), (США). У зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США). Характеристики моноклональних антитіл занесені в таблицю 1.

Статистичний аналіз параметрів площин, периметрів та коефіцієнта круглості клітин проводили в програмах ImageJ та Microsoft Excel з розрахунком мінімального, максимального, медіани, середнього арифметичного та стандартного відхилення.

Первинні моноклональні антитіла

Первинні антитіла	Клон (розведення)	Локалізація реакції
Cytokeratin, Pan	AE1/AE3(1:50)	Цитоплазма
Vimentin	Ab-2/sp20 (1:200)	Цитоплазма
Chromogranin A	sp12 (1:400)	Цитоплазма
Synaptophysin	sp11 (1:200)	Цитоплазма
Cytokeratin 7 (CK7)	RCK105 (1:100)	Цитоплазма
Cytokeratin 20 (CK20)	Ks 20.8 (1:100)	Цитоплазма

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Первинні карциноми з клітин Меркеля були представлені дрібноклітинними «блакитно-клітинними» неоплазіями, що складались з однакових клітин з круглим або овальним ядром і бідною цитоплазмою. Чітка ядерна мембрана відокремлювала дисперсний хроматин та ядерця. Привертала увагу численні мітотичні фігури та нуклеарні фрагменти (пікноз, рексис), також були представлені окремі диференційовані витягнуті клітини. Пухлини були розташовані в центрі дерми і в 4 з 9 випадків (44,44%) розповсюджувались у підшкірну клітковину. Тільки в 1 з випадків був залучений епідерміс (педже-тоїдний вигляд ураження), але в інших спостереженнях виникало виражування епідермісу.

У більшості спостережень неоплазми формували дифузні сітки та солідні гнізда в дермі. На периферії мали місце трабекулярні патерни, у вигляді «сіток» та «гірлянд», у 2 з 9 (22,22%) формувались псевдорозетки. Дерма навколо пухлин у 6 з 9 (66,67%) демонструвала десмопластичну реакцію та зональні пухлинні некрози з ангіолімфатичним залученням. За гістологічними формами первинні ККМ розподілились на три групи: трабекулярні ККМ – 4 з 9 (44,44%), перехідні – 3 з 9 (33,33%), мілкоклітинні – 2 з 9 (22,22%). Показники морфометричного дослідження були занесені в таблицю 2.

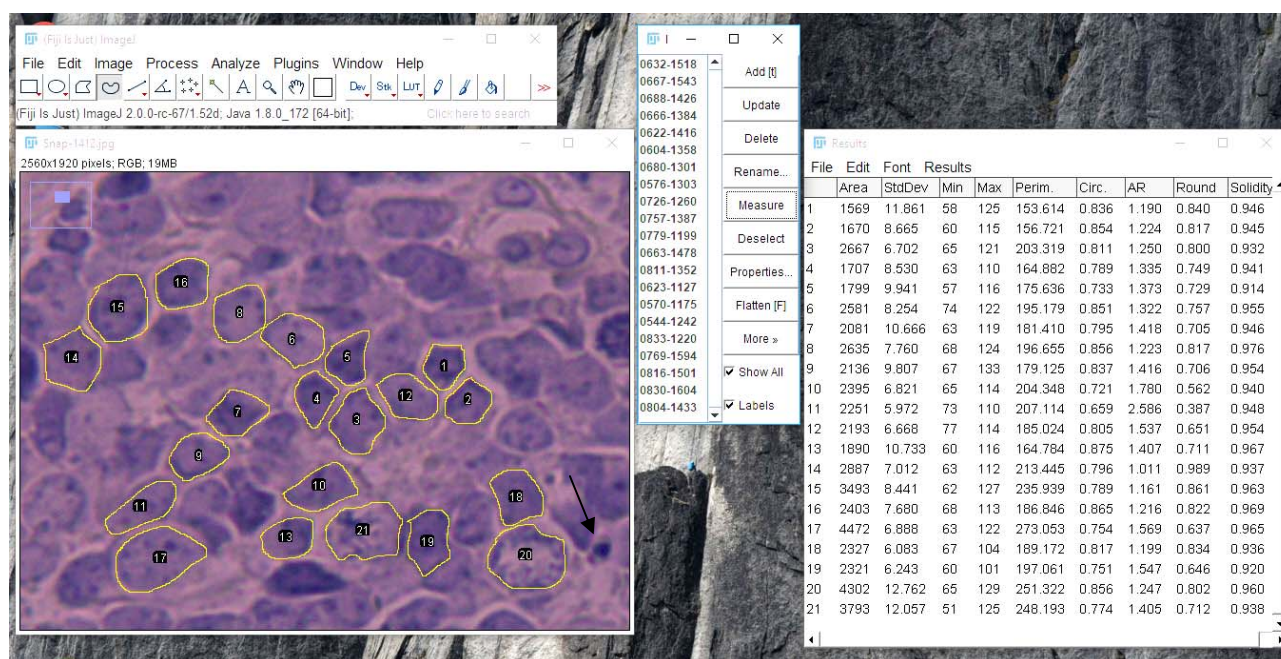


Рис. 1. Особливості будови клітин первинної карциноми Меркеля: дослідження морфометричних показників (площі, периметра та показника «круглості» ядер) програмою ImageJ: ядра вуглуватої форми, з чіткою ядерною мембраною, що відокремлює дисперсний хроматин та ядерця. Стрілкою позначені нуклеарні фрагменти (пікноз, рексис)



Показники морфометричного дослідження спостережень метастазів та первинних карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ

Типи первинних пухлин яєчників	Площа (мкм ²) $\chi \pm SD$	Периметр (мкм) $\chi \pm SD$	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ) $\chi \pm SD$
Первинна карцинома з клітин Меркеля	37,263 \pm 5,689	23,067 \pm 1,523	0,795 \pm 0,045
Метастаз карцином з клітин Меркеля	34,862 \pm 5,933	22,454 \pm 2,093	0,802 \pm 0,064
p	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Примітка: $\chi \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, статистично вірогідна різниця вважалась при $p < 0,05$.

Всі карциноми з клітин Меркеля продемонстрували епітеліальну та нейроендокринну диференціацію. Специфічним виявилось парануклеарне точкове імуногістохімічне зафарбовування СК20 цитокератинів, яке в половині спостережень мало шапочноподібне навколоядерне забарвлення. Позитивна реакція виявлялась також на маркери синаптофізин та хро-

могранін, CD117. І була цілком негативна на панлейкоцитарний антиген CD45, Vimentin, S100.

Усі метастатичні ураження були проаналізовані за патернами гістологічної будови і відповідали «епітеліоїдній» морфології та фенотипу Cytokeratin, Pan AE1/AE3 (парануклеарне +) / CK20 (парануклеарне +) / Vimentin (-) / CD45 (-) / S100 (-) після первинної ІГХ панелі антитіл (рис. 2).

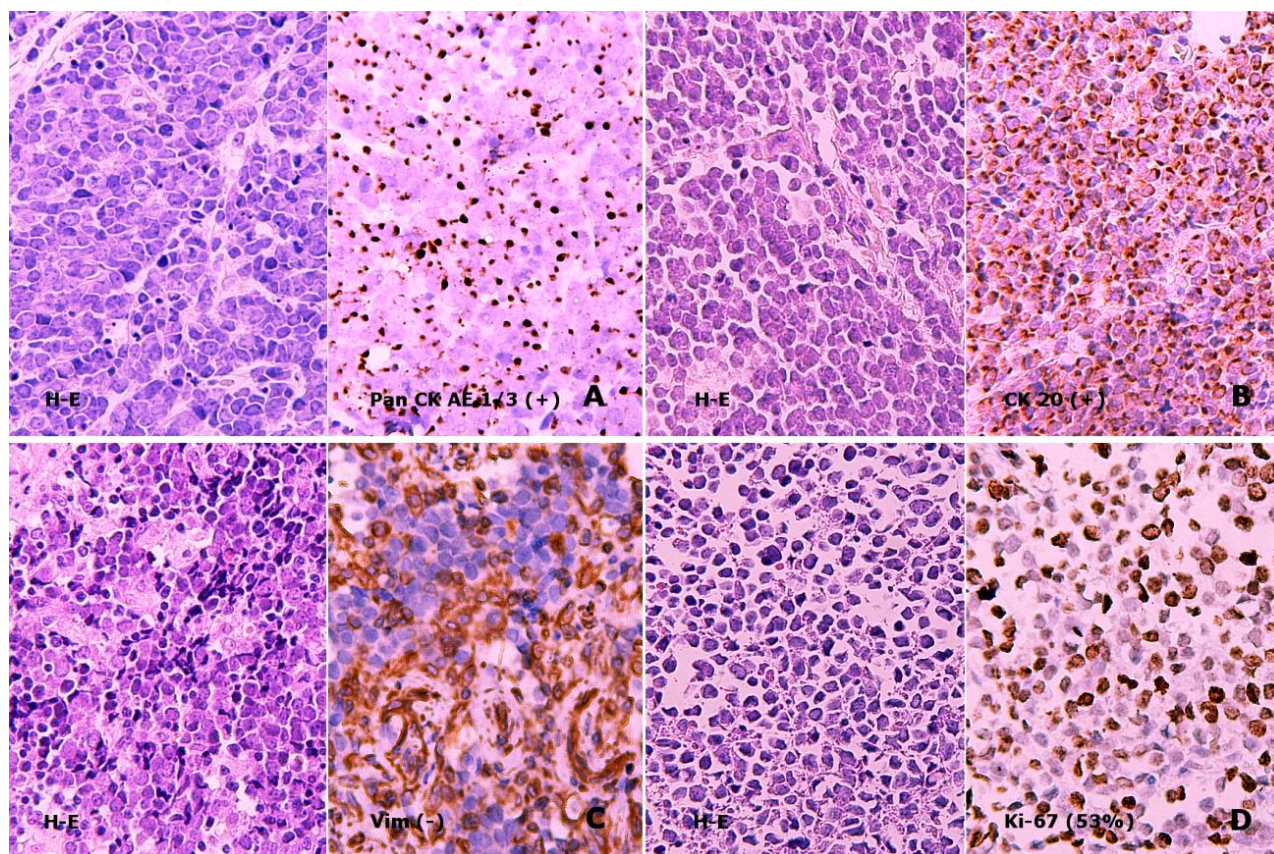


Рис. 2. Приклади метастатичного ураження лімфатичних вузлів карциномою Меркеля без первинної локалізації. А. Г-Е / парануклеарне точкове імуногістохімічне зафарбовування Cytokeratin, Pan AE1/AE3, ІГХ, додаткове зафарбовування гематоксином Майєра ($\times 400$). В. Г-Е / шапочноподібне навколоядерне зафарбовування СК20, ІГХ, додаткове зафарбовування гематоксином Майєра ($\times 400$). С. Г-Е / негативна реакція Vimentin у пухлинних клітинах і позитивна в лімфоїдних клітинах оточення, ІГХ, додаткове зафарбовування гематоксином Майєра ($\times 400$). D. Г-Е / Інтрануклеарна реакція з Ki-67, проліферативна активність до 53%, ІГХ, додаткове зафарбовування гематоксином Майєра ($\times 400$)

Морфологічні типи метастатичних карцином з клітин Меркеля включали 2 перехідні форми та 4 дрібноклітинні карциноми, що значно рідше демонстрували трабекулярні патерни чи псевдорозетки, натомість мали солідні поля морморфних клітин із внутрішньосудинною інвазією та стромальною реакцією. Різниця в розподілі гістологічних форм первинних та метастатичних ККМ знайшла своє відображення в зменшенні розмірів клітин метастатичних ККМ, але статистично достовірної різниці між групами

дослідження виявити за показниками їх морфометричного дослідження програмою ImageJ виявлено не було (всі $p > 0,05$) (табл. 2).

З метою диференціальної діагностики ККМ з іншими карциномами, морфометричні показники первинних та метастатичних карцином з клітин Меркеля були порівняні із Vimentin-позитивними лімфоїдними клітинами оточення (табл. 3). Виявлено двократну різницю в площі та периметрі пухлинних клітин ККР обох груп та звичайних лімфоцитів ($p(1) < 0,05$, $p(2) < 0,05$).

Таблиця 3

Показники морфометричного дослідження спостережень метастазів та первинних карцином з клітин Меркеля в програмі ImageJ

Типи первинних пухлин яєчників	Площа (мкм ²) $\chi \pm SD$	Периметр (мкм) $\chi \pm SD$	Коефіцієнт «круглості» (параметр ImageJ) $\chi \pm SD$
Первинна карцинома з клітин Меркеля (1)	37,263±5,689	23,067±1,523	0,795±0,045
Метастаз карцином з клітин Меркеля (2)	34,862±5,933	22,454±2,093	0,802±0,064
Лімфоцити лімфатичного вузла	16,738±2,693	15,993±1,541	0,746±0,098
p	p(1)<0,05, p(2)<0,05	p(1)<0,05, p(2)<0,05	p(1)>0,05, p(2)>0,05

Примітка: $\chi \pm SD$ – середнє значення \pm стандартне відхилення, статистично вірогідна різниця вважалась при $p < 0,05$.

За даними попередніх досліджень, карцинома з клітин Меркеля часто має делецію на короткому плечі хромосоми 1 (1p36) і є загальною для інших нейроендокринних пухлин, таких як меланома та нейробластома. Численні інші хромосомні поломки є описаними, наприклад, трисомія за 6 хромосомою, приблизно до 50% пухлин. Таким чином, деякі дослідники вважають, що ця пухлина походить з примітивних епідермальних стоволових клітин, що можуть стати епідермісом або нейроендокринними клітинами.

За сукупністю факторів ризику, прогресія карциноми з клітин Меркеля включає більш похилий вік, локалізацію на голові та шиї, розмір більше 2 см, імуносупресію та прогресію захворювання. Гістопатологічні та імуногістохімічні фактори ризику демонструють більше ніж 10 мітотичних фігур на великому збільшенні, дрібноклітинну гістологічну форму, ангіолімфатичну інвазію та імунореактивність на CD44.

ВИСНОВКИ

1. Карциноми без первинної локалізації можуть бути трактовані як метастаз карциноми з

клітин Меркеля, якщо вони демонструють фенотип Cytokeratin, Pan AE1/AE3 (парануклеарно +) / CK20 (парануклеарно +) / Vimentin (-) / CD45 (-) / S100 (-) / Chromogranin A (+) / Synaptophysin (+), а також мають ядра, площа та периметр яких перевищують у 2 рази відповідні показники звичайних лімфоцитів (всі $p > 0,05$).

2. Метастатичні карциноми з клітин Меркеля, порівняно з первинними, частіше демонструють низькодиференційовані дрібноклітинні та перехідні форми, що вимагають додаткового проведення імуногістохімічного дослідження з метою виключення метастазів карцином іншого походження.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Розробка діагностичних та прогностичних критеріїв новоутворень різних локалізацій з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу» (номер державної реєстрації 0116U002827, термін виконання 2016-2018).



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Пославська О. В., Шпонька І. С., Грищенко П. О., Алексеєнко О. А. Морфометричний аналіз панцітокератин-негативних неопластичних ушкоджень лімфатичних вузлів ший. *Медичні перспективи*. 2018. Т. 23, № 1. С. 30-37.
2. Пославська О. В. Визначення лінійних розмірів та площ окремих морфологічних об'єктів на мікрофотографіях за допомогою програми ImageJ. *Морфологія*. 2016. Т. 10, № 3. С. 377-381.
3. Vajdic C. M., Goldstein D. Cancer of unknown primary site. *Aust Fam Physician*. 2015. Vol. 44, N 9. P. 640-643.
4. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs / D. Schadendorf, et al. *Eur. J. Cancer*. 2017. Vol. 71. P. 53-69.
5. Merkel cell carcinoma: clinical presentation, prognostic factors, treatment and survival in 32 patients / C. Car-
- neiro, et al. *Rev Bras Cir Plást*. 2013. Vol. 28, N 2. P. 196-200.
6. Merkel Cell Carcinoma of skin – current controversies and recommendations. A. Assouline, et al. *Rare Tumors*. 2011. Vol. 3. P. e23.
7. Prognostic Factors in Merkel Cell Carcinoma: A Retrospective Single-Center Study in 90 Patients / M. Rastrelli, et al. *Cancers*. 2018. Vol. 10. P. 350.
8. Recent Insights and Advances in the Management of Merkel Cell Carcinoma / P. Banks, et al. *Am. Society of Clinical Oncology*. 2016. Vol. 12, N 7. P. 637-646.
9. Tai P., Joseph Au. Skin cancer management – updates on Merkel cell carcinoma. *Ann Transl Med*. 2018. Vol. 6, N 14. P. 282.

REFERENCES

1. Poslavska OV, Shponka IS, Gritsenko PO, Alekseenko OA. [Morphometric analysis of pancytokeratin-negative neoplastic damages of the lymphatic nodes of the neck]. *Medicni perspektivi*. 2018;23(1):30-37. Ukrainian.
2. Poslavskaia OV. [Determination of linear dimensions and square surfaces areas of morphological objects on micrographs using ImageJ software]. *Morphologia*. 2016;10(3):377-81. Ukrainian.
3. Vajdic CM, Goldstein D. Cancer of unknown primary site. *Aust Fam Physician*. 2015;44(9):640-3.
4. Schadendorf D, Lebbe C, zur Hausen A, Avril M-F, Hariharan S, Bharmal M, Becker JC. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *European Journal of Cancer*. 2017;71:53-69.
5. Carneiro C, Sbalchiero JC, Neto BRC, Bracco G, Graziosi, de Paiva Dumaresq F. Merkel cell carcinoma: clinical presentation, prognostic factors, treatment and survival in 32 patients. *Rev Bras Cir Plást*. 2013;28(2):196-200.
6. Assouline A, Tai P, Joseph K, Lian JD, Krzisch C, Yu E. Merkel Cell Carcinoma of skin – current controversies and recommendations. *Rare Tumors*. 2011;3:e23.
7. Rastrelli M, Ferrazzi B, Cavallin F, Sileni VCh, Pigozzo J, Fabozzi A, Tropea S, Vecchiato A, Costa A, Parisi A, Rossi CR, Fiore PD, Alaibac M. Prognostic Factors in Merkel Cell Carcinoma: A Retrospective Single-Center Study in 90 Patients. *Cancers*. 2018;10:350.
8. Banks PD, Sandhu Sh, Gyorki DE, Johnston ML, Rischin D. Recent Insights and Advances in the Management of Merkel Cell Carcinoma. *American Society of Clinical Oncology*. 2016;12(7):637-46.
9. Tai P, Au J. Skin cancer management – updates on Merkel cell carcinoma. *Ann Transl Med*. 2018;6(14):282.

Стаття надійшла до редакції
30.01.2019

