

Uzlinová metastáza karcinomu z Merkelových buněk bez kožního primárního ložiska – kazuistické sdělení

Arpád Szabó¹, Igor Richter^{2,7}, Dana Frydrychová³, Martina Saláková^{4,5}, Tomáš Jirásek^{1,6}

¹ Ústav patologie 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

² Komplexní onkologické centrum, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

³ Kožní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

⁴ Národní referenční laboratoř pro papilomaviry a polyomaviry, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha.

⁵ Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

⁶ Oddělení patologie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

⁷ Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice, Praha

SOUHRN

Karcinom z Merkelových buněk je vzácným maligním kožním nádorem s agresivním chováním, který ve většině případů bývá asociovaný s infekcí polyomavirem karcinomu z Merkelových buněk (MCPyV). Ve výjimečných případech se nádor manifestuje jako metastáza do lymfatické uzliny bez jednoznačného průkazu primárního kožního ložiska.

V této práci prezentujeme případ 42letého pacienta s tříselnou lymfadenopatií, s histologickým nálezem karcinomu z Merkelových buněk. Imunohistochemicky byla v nádoru prokázána exprese chromograninu-A, synaptofyzinu a tečkovitá pozitivita cytokeratinu 20. Molekulárně genetickým vyšetřením byla pomocí metody real-time PCR detekována přítomnost genomu MCPyV v nádorových buňkách. Dermatologické vyšetření ani staging pomocí PET CT ložisko primárního nádoru v jiné lokalizaci u pacienta neprokázalo.

Klíčová slova: Karcinom z Merkelových buněk – metastáza do lymfatické uzliny – nádor neznámého primárního původu

Lymph node metastasis of Merkel cell carcinoma without known cutaneous primary - case report

SUMMARY

Merkel cell carcinoma is a rare cutaneous tumor with an aggressive clinical course. In most cases it is associated with Merkel cell polyomavirus infection. Exceptionally, the tumor can present as a lymph node metastasis without a discernible cutaneous primary.

In this report we present the case of a 42 year-old man with inguinal lymphadenopathy, histologically consistent with Merkel cell carcinoma. Tumor cells expressed immunohistochemically chromogranin-A, synaptophysin and displayed dot-like positivity for cytokeratin 20. The genome of MCPyV in neoplastic cells was detected using real-time PCR. A cutaneous primary has not been identified neither during the dermatologic examination, nor with PET CT scan.

Keywords: Merkel cell carcinoma – lymph node metastasis – tumor of unknown primary origin

Cesk Patol 2017; 53(3): 135-138

Karcinom z Merkelových buněk (MCC) patří mezi vzácné primární kožní malignity. Vyskytuje se přednostně v oblastech vystavených slunečnímu záření, průměrný věk pacientů je 69 let. K charakteristickým vlastnostem nádoru patří exprese znaků neuroendokrinní diferenciace a paranukleární tečkovitá pozitivita cytokeratinu 20 (1,2). V patogenezi MCC hraje důležitou roli infekce polyomavirem karcinomu z Merkelových buněk (MCPyV) (3). Karcinom z Merkelových buněk má agresivní klinický průběh, s častým výskytem uzlinových metastáz a s diseminací do vzdálených orgánů (1).

V naší práci prezentujeme případ pacienta s karcinomem z Merkelových buněk s postižením inguinální lymfatické uzliny (unknown primary Merkel cell carcinoma, UPMCC), kdy dermatologické vyšetření ani staging pomocí PET/CT původ nádoru v oblasti kůže neprokázalo.

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Arpád Szabó

Ústav patologie 3. LF UK a FNKV

Šrobárova 50, 100 34 Praha 10

e-mail: arp.ad.szabomudr@yahoo.com

KLINICKÝ NÁLEZ

Muž narozen v roce 1973, dosud zdravý, pozoroval od ledna 2015 v oblasti pravého třísla hmatnou nebolestivou rezistenci. Podle sonografického vyšetření se jednalo o zvětšenou lymfatickou uzlinu. V březnu 2015 byla provedena exstirpace této uzliny. Následně bioptické vyšetření odhalilo karcinom z Merkelových buněk. Parafinové řezy nádoru byly vyšetřeny v Národní referenční laboratoři pro papilomaviry a polyomaviry Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT), kde byla nalezena přítomnost polyomaviru (MCPyV). Pacient v rámci stagingu onemocnění dále podstoupil CT vyšetření, celotělový PET/CT a octreoscan bez dalších známek tumorózního postižení. Klinické vyšetření dermatovenerologem neprokázalo možný primární zdroj nádoru v oblasti kůže, anoskopické vyšetření bylo též negativní. Na podkladě klinických vyšetření bylo stanoveno klinické stadium IIIB (T0 pN1b M0). U pacienta byla indikována radioterapie na oblast pravého třísla a zevních ilických lymfatických uzlin vpravo, plánovaná dávka 1.8/45 Gy v normofrakcionačním režimu. Pacient absolvoval léčbu do července 2015. Tolerance byla dobrá, pouze v pravém tříse se vyvinula akutní postradiační dermatitida druhého stupně, která do čtvrtého týdne od ukončení

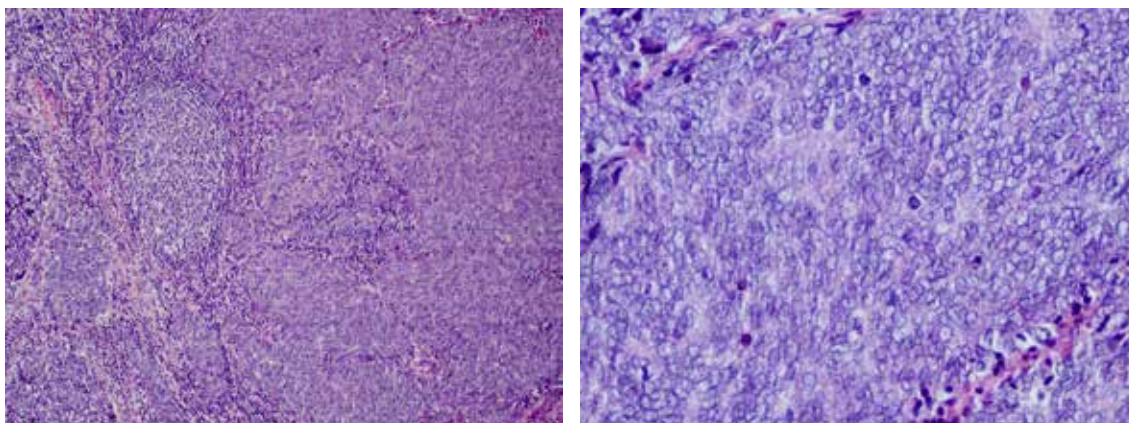
radioterapie odezněla. Při opakovaném vyšetření byla v prosinci 2015 provedena PET/CT bez patologie. Pacient je t. č. plně aktivní, bez obtíží. Poslední recentní sonografické vyšetření pravého třísla ze srpna 2016 neprokázalo recidivu onemocnění.

MATERIÁL A METODY

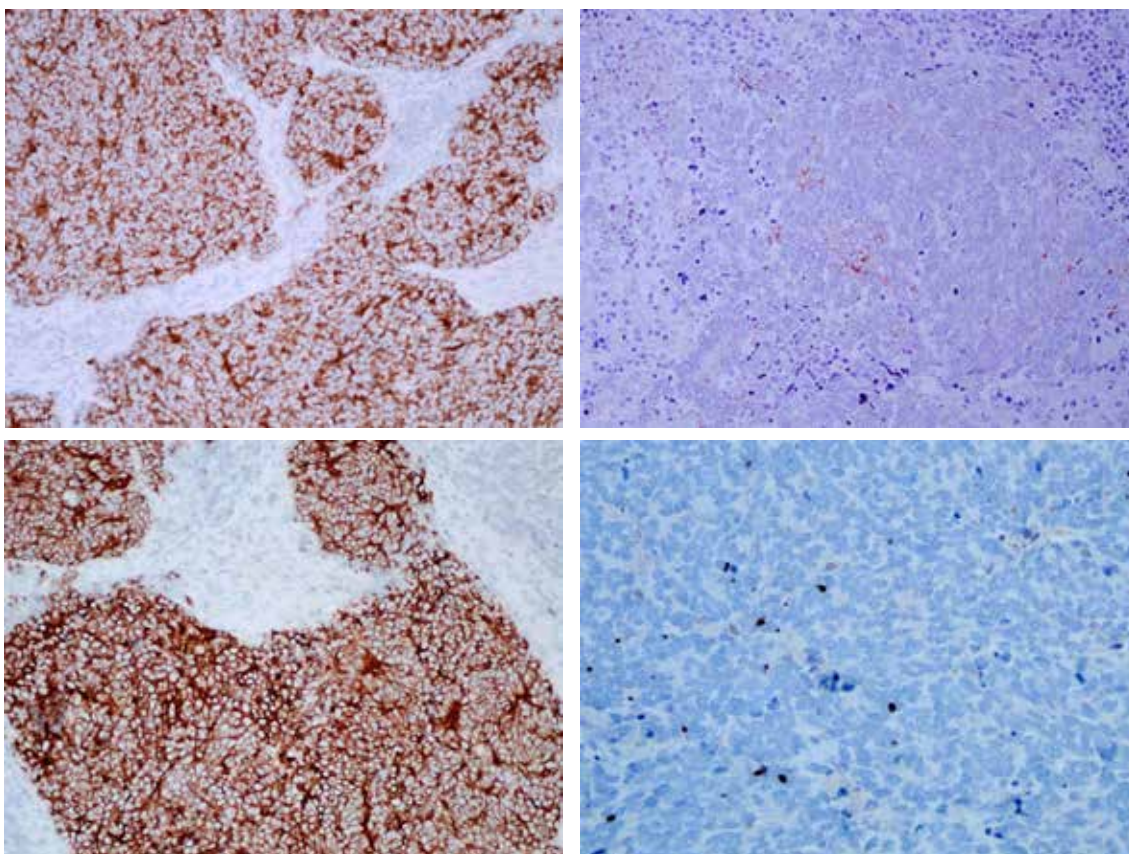
Chirurgicky odebraná tkáň byla fixována v 10% neutrálním formolu a zalita do parafínu. Histologické řezy byly barveny hematoxylinem a eosinem. Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno v automatu Ventana Benchmark Ultra (Roche, Basilej, Švýcarsko), jako chromogen byl použit 3, 3 - diaminoben-

zidin tetrachlorid (DAB), k vizualizaci jader pak Mayerův hematoxylin. Pro imunohistochemický průkaz byly použity následující protilátky: chromogranin-A (DAK-A3, ředění 1:1200, Abcam, Cambridge, UK), synaptofyzin (SP11, předředěná, Roche), CD56 (123C3 předředěná, Roche), cytokeratin 20 (SP33, předředěná, Roche), cytokeratin (CAM 5.2, předředěná, Roche), Ki-67 (30-9, ředění 1:100, Dako, Glostrup, Dánsko), TTF1 (SP141, předředěný, Roche), LCA (RP2/18, předředěná, Roche) a S100 (králičí polyklonální, předředěná, Roche).

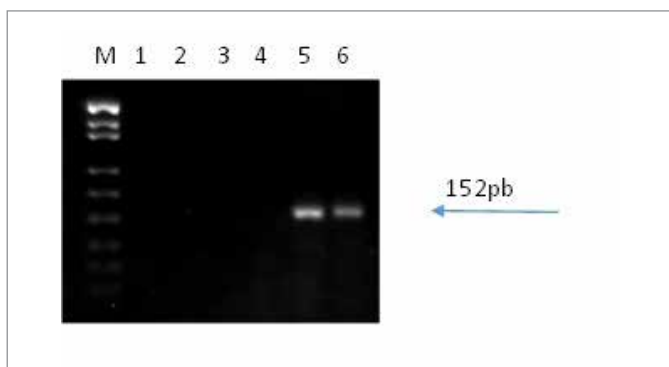
DNA byla izolována z jednoho parafínového řezu tloušťky 20 µm pomocí kitu Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Kvantifikace MCPyV DNA byla provedena pomocí real-



Obr. 1. Mikroskopicky je lymfatická uzlina infiltrována nádorem tvořeným středně velkými solidně uspořádanými elementy s hyperchromním jádrem. Jsou přítomny četné mitotické figury. **A** - Hematoxylin-eosin, 100x. **B** - Hematoxylin-eosin, 400x.



Obr. 2. Imunohistochemický nálezn. **A** - silná pozitivita synaptofysinu v nádoru. **B** - ložisková pozitivita chromograninu A. **C** - membránová pozitivita CD56. **D** - fokální paranukleární pozitivita cytokeratinu 20. **E** - Ki-67. (původní zvětšení 200x, 200x, 200x, 400x, 400x)



Obř. 3. Reverzní transkripci a PCR s primery a pr3bami pro amplifikaci mRNA LT antigenu MCPyV: M hmotnostn3 marker pUC18/Mspl, 1-4 p3edstavuj3 negativn3 kontrolu kr3jení, kontrolu izolace, kontrolu DN3zov3n3í a negativn3 kontrolu PCR, 5 testov3n3 vzorek, 6 pozitivn3 kontrola RNA z karcinomu z Merkelov3ch bun3k. Velikost RT-PCR produktu je 152pb.

time PCR s pou3it3m primer3 a TaqMan pr3b navr3en3ch pro oblast velk3ho T-antigenu, mal3ho T-antigenu a pozdn3 oblasti VP1 genu (4,5). Pro normalizaci po3tu kopi3 virov3ho genomu byla pou3ita real-time PCR s primery a pr3bou pro lidsk3 RN3za P gen, kter3 se v diploidn3 bu3ce vyskytuje ve dvou kopi3ch. Standardn3 křivky byly vytvořeny des3tkov3m řed3n3m standard3 s odpov3daj3c3 sekvenc3 pro MCPyV a RN3za P, kter3 obsahovaly zn3m3 po3et kopi3 př3slušn3 DNA. Po3et virov3ho genomu na bu3ku byl vypo3ten ze standardn3ch křivek pro MCPyV a d3len3m polovinou po3tu RN3za P genu ve vzorku. Detekce prob3hala na př3stroji RotorGene 3000 (Qiagen, Hilden, Spolkov3 republika N3mecko). Jako standard pro MCPyV byl pou3it plazmid pCR.MCV350 (3), plazmid se sekvenc3 RN3za P genu byl př3praven zaklonov3n3m PCR produktu do pCR-BluntII-TOPO vektoru. Všechny PCR reakce byly prov3d3ny v duplik3tech v celkov3m objemu 15 μ l (6). cDNA byla př3pravena reverzn3 transkripci s 500ng izolovan3 RNA, kter3 byla nejprve ošetřena DN3zou (Jena Bioscience, Jena, Spolkov3 republika N3mecko), a n3sledn3 byla provedena reverzn3 transkripci s M-MLV reverzn3 transkript3zou (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Integrita cDNA byla ov3řena amplifikaci beta-globinov3ho genu (7). PCR s primery specifick3mi pro mRNA velk3ho T-antigenu (Forw 5'TTC AAA AGA AGC TGC TTA AA 3', v pozici na genomu MCPyV350 295-314, Rev 5'ATA TAG GGG CCT CGT CAA CC 3', v pozici 860-879) byla provedena pomoc3 Ampli Taq Gold polymer3zy (Life Technologies (Termo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA) (3).

V3YSLEDKY

Chirurgem exstirpovan3 tk3ň z prav3ho třísla byla tvořena lymfatickou uzlinou rozm3ř3 22x15x7 mm. Histologicky byla lymfatick3 uzlina t3m3ř v cel3m rozsahu spotřebov3na malign3m n3dorem, kter3 byl m3st3 nekrotick3, rostouc3 ve form3 solidn3ch 3ep3. N3dorov3 bu3ky byly st3ředn3 velk3, s m3ch3řkov3t3m j3drem s chudš3 cytoplasmou, s př3t3mno3t3 hojn3ch mitotick3ch figur (obr. 1).

Imunohistochemicky vykazoval n3dor expresi synaptofyzinu, chromograninu-A i CD56. Imunodetekce cytokeratin3 CAM5.2 a CK 20 vykazovala paranukle3rn3 te3kovitou pozitivitu. N3dorov3 bu3ky neexprimovaly S-100, TTF-1 a LCA (obr. 2).

MCPyV DNA byla ve vzorku detekov3na pomoc3 všech tř3 pou3it3ch real-time PCR. Virov3 n3lo3 byla 5 kopi3 MCPyV DNA na bu3ku. Všechny pou3it3 detek3n3 syst3my vykazovaly shodn3 v3sledky. Virov3 mRNA velk3ho T antigenu byla ve vzorku př3t3mna.

DISKUZE

Karcinom z Merkelov3ch bun3k (MCC) p3edstavuje vz3cn3 a vysoce agresivn3 ko3n3 n3dor. Př3pady prezentuj3c3 se jako uzlinov3 po3tizen3 bez prokazateln3ho ko3n3ho n3doru (UPMCC), b3vaj3 ješt3 vz3cn3jš3 a jsou popisov3ny v literatuře ve form3 individu3ln3ch kazuistik, nebo mal3ch soubor3 pacient3. Heath a spol. uv3d3j3 27 pacient3 (14 %) s UPMCC v souboru 195 p33pad3 MCC (8). Deneve a spol. identifikovali 38 p33pad3 UPMCC (12 %) v souboru 321 nemocn3ch s MCC (9).

V3yskyt UPMCC nen3 doposud objasn3n3. Nej3ast3j3 b3vaj3 po3tizen3 lymfatick3 uzliny inguin3ln3, axil3rn3 a kr3n3. Ot3zka, zda se jedn3 o prim3rn3 tumor lymfatick3 uzliny, nebo o metast3zu ko3n3ho MCC, kter3 podlehl regresi, z3st3v3 nezodpov3zen3. Spont3nn3 a kompletn3 regrese ko3n3ho MCC je vz3cn3m jevem a nejsp3še nem3že b3t vysv3tlen3m pro vznik všech p33pad3 UPMCC (10). Vzhledem k z3sadn3m rozd3l3m v klinick3m obrazu nelze vylou3it, že se jedn3 o n3dorov3 onemocn3n3 l3š3c3 se od ko3n3ho MCC. Překvapiv3 je t3ž siln3 asociace UPMCC s jin3mi malignitami. Pan a spol. popisuj3 např3klad u 8 z 22 pacient3 multisyst3mov3 nebo agresivn3 n3dorov3ho onemocn3n3 p3ed diagn3zou UPMCC (11). P3vodn3 bu3ka, ze kter3 ko3n3 MCC vych3z3, je rovn3ž p3edm3tem diskuze. Toker jako prvn3 popsal MCC k3že v roce 1972 pod n3zvem trabekul3rn3 karcinom k3že (12); na z3klad3 podobnosti v elektronmikroskopick3m obraze byl o 6 let pozd3j3 postulov3n p3vod z Merkelov3ch bun3k (13). Merkelov3 bu3ky exprimuj3 znaky neuroendokrinn3 diferenciace a cytokeratin 20. Jedn3 se ale o postmitotick3 elementy, kter3 nebv3vaj3 infikov3ny MCPyV. MCC vznik3 pravd3podobn3 z m3n3 diferencovan3ch bun3k, odpov3daj3c3ch nejsp3še epiderm3ln3m nebo derm3ln3m kmenov3m bu3k3m (14,15). P3vod z prekursorov3ch element3 je t3ž vysv3tlen3m pro vysokou morfologic3kou heterogenitu MCC.

Diagn3za MCC vych3z3 z mikroskopick3ho obrazu a imunohistochemick3ho p3ř3kazu znak3 neuroendokrinn3 diferenciace. Ve v3tš3n3 p33pad3 b3v3 rovn3ž pozorov3na paranukle3rn3 te3kovit3 pozitivita cytokeratinu 20. Pro diagn3zu UPMCC je nezbytn3 klinicko-patologick3 korelace n3lezu s vylou3en3m prim3rn3ho ko3n3ho lo3iska. D3ležit3 je vylou3en3 metastatick3ho po3tizen3 uzliny z jin3 prim3rn3 lokalizace, na prvnm3 m3st3 malobun33n3m karcinomem plic, kter3 vykazuje pozitivitu TTF-1 a b3v3 zpravidla cytokeratin 20 negativn3 (1,2).

V3znam infekce MCPyV u pacient3 s UPMCC je v r3zn3ch publik3c3ch interpretov3n r3zn3. Pan a spol. (11) popisuj3 polyomavirusovou infekci v tumorech pouze u 4 z 13 pacient3, de Biase a spol. (16) ale prok3zali infekci MCPyV u všech p3ti UPMCC.

Pacienti s UPMCC v lymfatick3 uzlin3 spadaj3 do stadia IIIB dle 7. vyd3n3 AJCC. U prim3rn3ch ko3n3ch MCC je uzlinov3 metast3za asociov3na se špatnou progn3zou, s p3tilet3m p3e3it3m 42 % ve stadiu IIIA a 26 % ve stadiu IIIB (17). V r3mci stagingu pacient3 s MCC se začín3 dost3vat do pop3ed3 vyšetř3n3 sentinelov3 lymfatick3 uzliny, obraz histologick3ho r3stu n3dorov3 metast3zy m3že t3ž ovlivňovat progn3zu pacienta (18). Pozoruhodn3 je, že v porovn3n3 s ko3n3m MCC s uzlinovou metast3zou maj3 pacienti s UPMCC patrn3 lepš3 progn3zu, s medi3nem p3e3it3 18-104 m3s3c3 (9,19,20). Vzhledem k mal3mu dostupn3mu souboru pacient3 je však vypov3daj3c3 hodnota 3daj3 o p3e3it3 omezen3.

Vzhledem k tomu, že UPMCC se vyskytuje jen zř3dka, nebyl prozat3m dosažen konsenzus ohledn3 ide3ln3ho terapeutick3ho postupu. Nemocn3 byli v r3zn3ch souborech l33en3 kombin3c3 lok3ln3 excize, radik3ln3 lymfadenektomie, oz3řen3 a adjuvantn3 chemoterapie. Kotteas a spol. v jejich souhrnu 90 p33pad3 z literatury identifikuj3 nej3př3zniv3jš3 terapeutick3 33inek radik3ln3 lymfadenektomie s adjuvantn3 radioterapi3 (21). V3znam chemoterapie na celkovou d3lku p3e3it3 u pacient3 l33en3ch radi-

kální lymfadenektomií a radioterapií nebyl v důsledku malého rozsahu sledovaných souborů blíže hodnotitelný.

Cílem předloženého sdělení je poukázat na neobvyklou jednotku, jejíž diagnóza vyžaduje úzkou klinicko-patologickou a laboratorní spolupráci. Autoři by rádi upozornili i na možnost a dostupnost molekulární detekce polyomaviru karcinomu z Merkelových buněk v České republice, a to i z tkáně zpracované parafinovou technikou.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem OPPK č. CZ.2.16/3.1.00/24024, financovaným z Evropského fondu pro regionální rozvoj (Praha & EU – Investujeme do vaší budoucnosti). Práce byla podpořena programem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy „Národní programem udržitelnosti II (projekt BIOCEV-FAR) LQ1604“ a projektem „BIOCEV“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109).

PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

LITERATURA

1. **LeBoit P, Burg G, Weedon D, et al.** Skin Tumours, World Health Organization Classification of Tumours (4th ed.). Lyon: IARCpress; 2006: 272-273.
2. **Jirásek T, Matěj R, Pock L, Knotková I, Mandys V.** Karcinom z Merkelových buněk – imunohistochemická studie v souboru 11 pacientů. *Cesk Patol* 2009; 45(1): 9-13.
3. **Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS.** Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319(5866): 1096-1100.
4. **Toracchio S, Foyle A, Sroller V, Reed JA, Wu J, Kozinetz CA, Butel JS.** Lymphotropism of Merkel cell polyomavirus infection, Nova Scotia, Canada. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(11):1702-1709.
5. **Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, et al.** Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4645-4653.
6. **Saláková M, Košlabová E, Vojtěchová Z, Tachezy R, Šroller V.** Detection of human polyomaviruses MCPyV, HPyV6, and HPyV7 in malignant and non-malignant tonsillar tissues. *J Med Virol* 2016; 88(4): 695-702.
7. **Rotnáglóvá E, Tachezy R, Saláková M, et al.** HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers. *International Journal of Cancer* 2011; 129: 101-110.
8. **Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, Nghiem P.** Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58(3): 375-381.
9. **Deneve JL, Messina JL, Marzban SS, et al.** Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(7): 2360-2366.
10. **Cirillo F.** Spontaneous Regression of Primitive Merkel Cell Carcinoma. *Rare Tumors* 2015; 7(4): 5961.
11. **Pan Z, Chen Y, Wu X, et al.** Merkel cell carcinoma of lymph node with unknown primary has a significantly lower association with Merkel cell polyomavirus than its cutaneous counterpart. *Mod Pathol* 2014; 27(9): 1182-1192.
12. **Toker C.** Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 1972; 105(1): 107-110.
13. **Tang CK, Toker C.** Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. *Cancer* 1978; 42(5): 2311-2321.
14. **Erović I, Erović BM.** Merkel cell carcinoma: the past, the present, and the future. *J Skin Cancer* 2013; Article ID 929364.
15. **Tilling T, Moll I.** Which are the cells of origin in Merkel cell carcinoma? *J Skin Cancer* 2012; Article ID 680410.
16. **de Biase D, Ragazzi M, Asioli S, Eusebi V.** Extracutaneous Merkel cell carcinomas harbor polyomavirus DNA. *Hum Pathol* 2012; 43(7): 980-985.
17. **Wang TS, Byrne PJ, Jacobs LK, Taube JM.** Merkel cell carcinoma: update and review. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30: 48-56.
18. **Ko JS, Prieto VG, Elson PJ, et al.** Histological pattern of Merkel cell carcinoma sentinel lymph node metastasis improves stratification of Stage III patients. *Mod Pathol* 2016; 29(2): 122-130.
19. **Chen KT, Papavasiliou P, Edwards K, et al.** A better prognosis for Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Am J Surg* 2013; 206(5): 752-757.
20. **Tarantola TI, Vallow LA, Halyard MY, et al.** Unknown primary Merkel cell carcinoma: 23 new cases and a review. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68(3): 433-440.
21. **Kotteas EA, Pavlidis N.** Neuroendocrine Merkel cell nodal carcinoma of unknown primary site: management and outcomes of a rare entity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 94(1): 116-121.