

**PENGEKSPRESAN ANAPLASTIK LIMFOMA
KINASE DALAM NEUROBLASTOMA**

NUR ATIQA BINTI ROSHIDI

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

PENGEKSPRESAN ANAPLASTIK LIMFOMA KINASE DALAM
NEUROBLASTOMA



NUR ATIQA BINTI ROSHIDI

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH SARJANA SAINS
PERUBATAN (PATOLOGI)

FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR

2019

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

15 Ogos 2019

NUR ATIQA BINTI
ROSHIDI
P73265

**PERAKUAN TESIS SARJANA / DOKTOR FALSAFAH
(CERTIFICATION OF MASTERS / DOCTORAL THESIS)**

Nama Penuh Pengarang
(Author's Full Name) : NUR ATIQA BINTI ROSHIDI

No. Pendaftaran Pelajar
(Student's Registration No.) : P73265 Sesi Akademik
(Academic Session) : _____

Tajuk Tesis
(Thesis Title) : PENGEKSPRESAN ANAPLASTIK LIMFOMA
KINASE DALAM NEUROBLASTOMA

Merujuk kepada Klausa 4.2 Dasar Harta Intelek Pelajar UKM (Tambahan), tesis adalah hak milik pelajar. Saya mengaku tesis ini sebagai:

(With regard to Clause 4.2 of the UKM Student Intellectual Property Policy (Supplementary), the thesis is the student's property. I hereby declare this thesis as:)

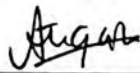
- ☐ **RAHSIA
(CONFIDENTIAL)** Mengandungi maklumat rahsia di bawah AKTA RAHSIA RASMI 1972
(Consisting of classified information under the OFFICIAL SECRETS ACT 1972)
- ☐ **TERHAD
(RESTRICTED)** Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan
(Consisting of RESTRICTED information which has been determined by the organisation/body where the research was conducted)
- ☒ **AKSES
TERBUKA
/TIDAK TERHAD
(OPEN ACCESS/
NON-
RESTRICTED)** Saya membenarkan tesis ini diterbitkan secara akses terbuka, teks penuh atau dibuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(I allow this thesis to be published through open access, full text or copied for study, learning and research purposes only.)

Bagi kategori Akses Terbuka/Tidak Terhad, saya membenarkan tesis (Sarjana/Doktor Falsafah) ini di simpan di Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)* dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

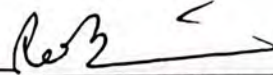
(For the Open Access/Non-Restricted category, I allow this (Master's/Doctoral) Thesis to be kept in the Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) Library with the following usage conditions:)

1. Perpustakaan UKM mempunyai hak untuk membuat salinan untuk tujuan pengajian, pembelajaran, penyelidikan sahaja.
(UKM Library has the right to reproduce the thesis for study, learning and research purposes only.)
2. Perpustakaan Universiti Kebangsaan Malaysia dibenarkan membuat satu (1) salinan tesis ini untuk tujuan pertukaran antara institusi pengajian tinggi dan mana-mana badan/ agensi kerajaan, tertakluk kepada terma dan syarat.
(UKM Library is allowed to make one (1) copy of this thesis for exchange purpose among higher education institutions and any government body/agency, subject to terms and conditions.)

DISAHKAN OLEH:
(VERIFIED BY:)



TANDATANGAN PELAJAR
(STUDENT'S SIGNATURE)



TANDATANGAN PENYELIA /
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE
SIGNATURE)

901116-02-5292

KAD PENGENALAN /
NO. PASPORT
(IDENTITY CARD/PASSPORT
NO.)

PROF. MADYA DR. REENA RAHAYU MOZIN

NAMA PENYELIA/
PENGURUSI JK SISWAZAH
(SUPERVISOR'S /CHAIRPERSON
SUPERVISION COMMITTEE NAME)

Tarikh/ 15/8/19
Date:

Tarikh/ 15/8/19
Date:



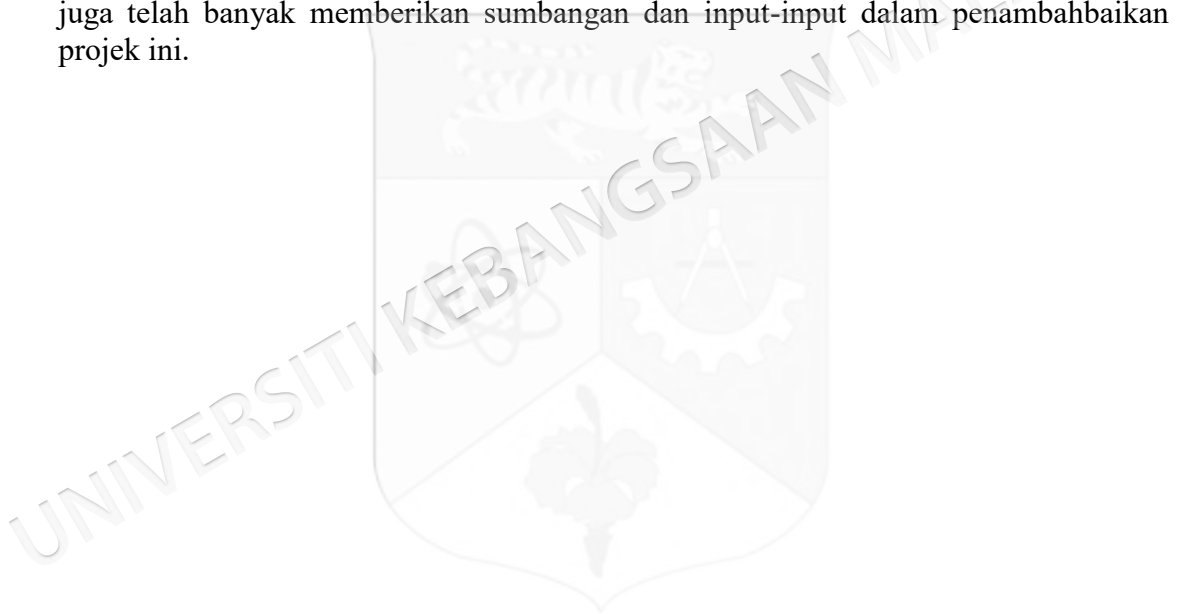
PENGHARGAAN

Bersyukur ke hadrat Illahi dengan limpah dan kurnianya dapat saya menyiapkan tesis ini.

Setinggi-tinggi penghargaan di ucapkan kepada penyelia saya Prof Madya Dr. Reena Rahayu Md Zin diatas tunjuk ajar dan bimbingan beliau kepada saya untuk menyiapkan tesis ini.

Terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada kedua-dua ibu bapa saya yang menjadi sumber inspirasi kepada saya untuk tidak berputus asa dalam menyambung pengajian saya.

Jutaan terima kasih kepada pegawai sains histopatologi, Cik Faridah Abd Rahman, Pn Noor Azlin, Cik Maya Sabrina, staf-staf di histo dan patologi, Terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada Dr. Aznim Hani Ramlan yang menjadi teman seperjuangan dalam projek neuroblastoma ini, Dr. Zubaidah Zakaria dari IMR yang juga telah banyak memberikan sumbangan dan input-input dalam penambahbaikan projek ini.



ABSTRAK

Neuroblastik tumor merangkumi sejenis tumor pepejal yang bersifat heterogenes yang mempunyai kecenderungan untuk bertukar dari peringkat malignan untuk peringkat benigna. Anaplastik Limfoma Kinase (ALK) baru-baru ini telah dikenal pasti sebagai onkogen utama dalam perkembangan neuroblastoma terutama pada neuroblastoma sporadik dan neuroblastoma keturunan. Kajian bertujuan adalah untuk menentukan korelasi antara pengekspresan protein ALK dan aberasi genetik dengan faktor-faktor prognostik dalam neuroblastoma. Kajian retrospektif telah dijalankan dengan menggunakan blok tisu parafin arkib kes yang telah didiagnosis dengan neuroblastoma dan sampel telah diambil dari Hospital Canselor Tuanku Muhriz dan Hospital Kuala Lumpur dari tahun 2002 hingga 2013. Teknik immunohistokimia (IHC) dan penghibridan in situ berfluoresen (FISH) ALK telah dilakukan ke atas 47 kes neuroblastoma. Hubungkait antara pengekspresan gen ALK dan alterasi genetik ALK dengan neuroblastoma serta parameter klinikopatologikal dianalisis menggunakan ujian χ^2 . Sebanyak 11/50 kes (23.4%) adalah positif untuk pengekspresan protin ALK dan 22/47 (46.8%) adalah kes adalah positif untuk perubahan genetik ALK. Selain itu, terdapat korelasi signifikan antara pengekspresan protein ALK dan aberasi genetik ALK ($p=0.044$) yang menunjukkan hubungkait dan juga dengan tahap pengredan rendah neuroblastoma ($p=0.015$). Walau bagaimanapun, tiada hubungan yang signifikan antara pengekspresan protein ALK dengan umur (0.793), status MKI (0.147), dan jenis subtaip (0.73). Penemuan dalam kajian kami menekankan peranan menyasarkan potensi gen ALK dalam neuroblastoma dengan menggunakan teknik IHC ALK dan FISH ALK sebagai ujian saringan untuk mengesan perubahan gen ALK dalam neuroblastoma.

EXPRESSION OF ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE IN NEUROBLASTOMA

ABSTRACT

Neuroblastic tumor encompasses a heterogeneous type of solid tumor which has propensity to regress from malignant to benign stage. Anaplastic Lymphoma Kinase recently has been identified as a major oncogene in Neuroblastoma development especially in sporadic and hereditary neuroblastoma. The aim of this study was to determine the correlation between ALK protein expression and genetic aberration with prognostic factors in neuroblastoma. Retrospective study was carried out using archival paraffin tissue blocks of cases diagnosed with neuroblastoma and samples were collected from Hospital Cencelor Tuanku Muhriz and Hospital Kuala Lumpur from year 2002 to 2013. Immunohistochemistry and Fluorescence in situ hybridization for ALK was performed on 47 analyzable cases of neuroblastoma. The association of ALK with neuroblastoma and clinicopathological parameters was analysed using the chi square test. A total of 11/50 (23.4%) cases are positive for ALK protein expression and 22/47(46.8%) are cases are positive for genetic alteration. Besides that, there are significant ALK protein expression and genetic alteration which shows p value (0.044) and staging (0.015). However, there was no significant correlation between ALK protein expression with age (0.793), MKI status (0.147), and grading (0.573). Although NMYC amplification has been recognized as gold standard in clinical setting, ALK on the other hand have not been established as major prognostic information in neuroblastoma diagnosis. The findings in our study highlight a potential role of targeting ALK in neuroblastoma by using ALK FISH and ALK IHC as screening tools to detect ALK alterations.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI ILUSTRASI	x
SENARAI TATANAMA	xi
SENARAI SIMBOL	xii
BAB I PENGENALAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif Kajian	3
1.2.1 Objektif Umum	3
1.2.2 Objektif Khusus	3
1.3 Hipotesis	4
1.3.1 Hipotesis Kajian	4
1.3.2 Hipotesis Nul	4
1.4 Pernyataan Masalah	4
BAB II ULASAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Statistik Neuroblastoma dalam Populasi Malaysia	5
2.2 Neuroblastoma	7
2.2.1 Sistem Klasifikasi Neuroblastoma Antarabangsa (INSS)	9
2.2.2 Lokasi Utama Tumor dan Metastasis	11
2.2.3 Ciri-Ciri Histologi	12
2.2.4 Prognosis	15
2.3 Anaplastik Limfoma Kinase (ALK)	17
2.3.1 Peningkatan Salinan Nombor ALK pada Neuroblastoma	21
2.3.2 Amplifikasi ALK pada Neuroblastoma	21
2.4 Kaedah bagi Mengenalpasti ALK pada Neuroblastoma	22

2.4.1	Imunohistokimia (IHC)	23
2.4.2	Penghibridan <i>in situ</i> Berfluoresens (FISH)	23

BAB III

METODOLOGI

3.1	Pengenalan	25
3.2	Bahan Spesimen	25
3.2.1	Bahan Biologi	26
3.2.2	Bahan Kimia	26
3.2.3	Penyediaan Reagen	26
3.3	Metodologi Kajian	28
3.3.1	Pengumpulan Spesimen	28
3.3.2	Pengiraan Sampel Saiz	29
3.3.3	Pewarnaan Haematoksilin dan Eosin (H&E)	30
3.3.4	Pewarnaan Imunohistokimia (IHC)	30
3.3.5	Penghibridan <i>in situ</i> Berfluoresen (FISH)	32
3.3.6	Analisis Slaid Penghibridan <i>in situ</i> Berfluoresen (FISH)	35
3.4	Interpretasi Keputusan	35
3.4.1	Imunohistokimia ALK	35
3.4.2	Analisa Slaid Penghibridan <i>in situ</i> Berfluoresen (FISH)	36
3.5	Analisa Statistik	39

BAB IV

KEPUTUSAN

4.1	Data Klinikopatologikal	40
4.2	Pengekspresan Protin <i>ALK</i> dan Faktor Prognostik	41
4.3	Alterasi Genetik <i>ALK</i> serta Faktor Prognostik	44
4.4	Korelasi di Antara Alterasi Genetik <i>ALK</i> dan Pengekspresan Protin ALK	45

BAB V

PERBINCANGAN

5.1	Data Klinikopatologikal	51
5.2	Pengekspresan Protin ALK	53
5.3	Alterasi Genetik ALK	56
5.3.1	Amplifikasi	57
5.3.2	Penambahan Bilangan Nombor Salinan Gen ALK	57
5.3.3	Normal	58
5.4	Korelasi di antara Alterasi Genetik ALK dan Pengekspresan Protin ALK	58

BAB VI	KESIMPULAN	
6.1	Dapatan Kajian	60
6.2	Kajian Lanjutan	60
6.3	Batasan Kajian	61
RUJUKAN		62
Lampiran A	Carta Alir Teknik Haematoksilin dan Eosin (H&E)	70
Lampiran B	Carta Alir Teknik Immunohistokimia (IHC)	72
Lampiran C	Carta Alir Teknik Penghibridan <i>In Situ</i> Berfluoresen (FISH)	76
Lampiran D	Jadual Penskoran FISH	81
Lampiran E	Data SPSS	87
Lampiran F	Abstrak Pembentangan Poster	97
Lampiran G	Penerbitan	99

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
Jadual 2.1	Senarai kanser otak dan sistem saraf di Malaysia 2007 (Kementerian Kesihatan Malaysia 2007)	5
Jadual 2.2	Sistem Klasifikasi Neuroblastoma Antarabangsa (INSS) menurut Brodeur et al,1993	9
Jadual 2.3	Tapak utama neuroblastoma dalam kalangan 1967 pesakit berdasarkan tahap penyakit (Nai Kong et al, 2005)	11
Jadual 3.1	Senarai peralatan yang digunakan dalam penyelidikan ini	25
Jadual 3.2	Senarai peralatan yang digunakan dalam penyelidikan ini	26
Jadual 3.3	Senarai bahan kimia yang telah digunakan dalam penyelidikan ini	26
Jadual 3.4	Kaedah penyediaan reagen	27
Jadual 3.5	Kes positif yang mempunyai aberasi gen ALK dalam neuroblastoma mengikut kajian terdahulu	29
Jadual 3.6	Skor pewarnaan immunohistokimia	35
Jadual 3.7	Analisis laid penghibridan <i>In Situ</i> Berfluoresen (FISH) Bagi Kes Neuroblastoma	37
Jadual 3.8	Interpretasi menurut M. Piqueras et al, 2012	38
Jadual 4.1	Data klinikopatologikal	41
Jadual 4.2	Pengekspresan protin ALK dan faktor prognostik	42
Jadual 4.3	Alterasi genetik ALK serta faktor prognostik	45
Jadual 4.4	Pengekspresan protin ALK dan perubahan gen	49

SENARAI ILUSTRASI

No. Rajah		Halaman
Rajah 2.1	Histologi tumor neuroblastik perifer a. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang), subjenis tidak diferensiasi. b. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang), subjenis kurang diferensiasi. c. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang, subjenis diferensiasi. d. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang) dengan indeks mitosis-karyorrhexis yang tinggi (MKI) (Nai-Kong et al, 2012)	13
Rajah 2.2	Klasifikasi Patologi Neuroblastoma Antarabangsa (Shimada et al. 1999b)	16
Rajah 2.3	Struktur aktivasi pengekspresan gen ALK	19
Rajah 2.4	Perubahan struktur utama dan pembentukan protein gabungan ALK yang paling banyak dikaji di dalam pesakit kanser yang positif ALK (Bengt Hallberg and Ruth Palmer 2013)	20
Rajah 3.1	Kaedah penskoran ALK IHC diadaptasi daripada Passoni et al, 2009.	36
Rajah 3.2	Contoh analisa menggunakan mikroskop berfluoresen	39
Rajah 4.1	H & E morfologi, ungkapan protein IHC dan nombor salinan gen ALK Rajah. 4.1 A-C menunjukkan morfologi neuroblastoma (HE × 20). D-F menunjukkan ALK IHC corak pewarnaan dalam neuroblastoma (IHC × 20). D: tiada pewarnaan immunohistokimia boleh melihat pada membran, E pewarnaan perang pada membran ALK manakala F menunjukkan pewarnaan perang yang terang membran. G-I menunjukkan bilangan alterasi gen ALK FISH dalam neuroblastoma (FISH × 100). G: bilangan salinan normal, sel dengan 2 ALK isyarat / CEP2. H: Penambahan bilangan salinan ALK dengan setiap sel dengan purata antara 3-9 isyarat ALK / CEP2. I: amplifikasi gen ALK dengan purata sel-sel 11-26 isyarat	47
Rajah 4.2	Korelasi protin ALK dan alterasi genetik ALK	50

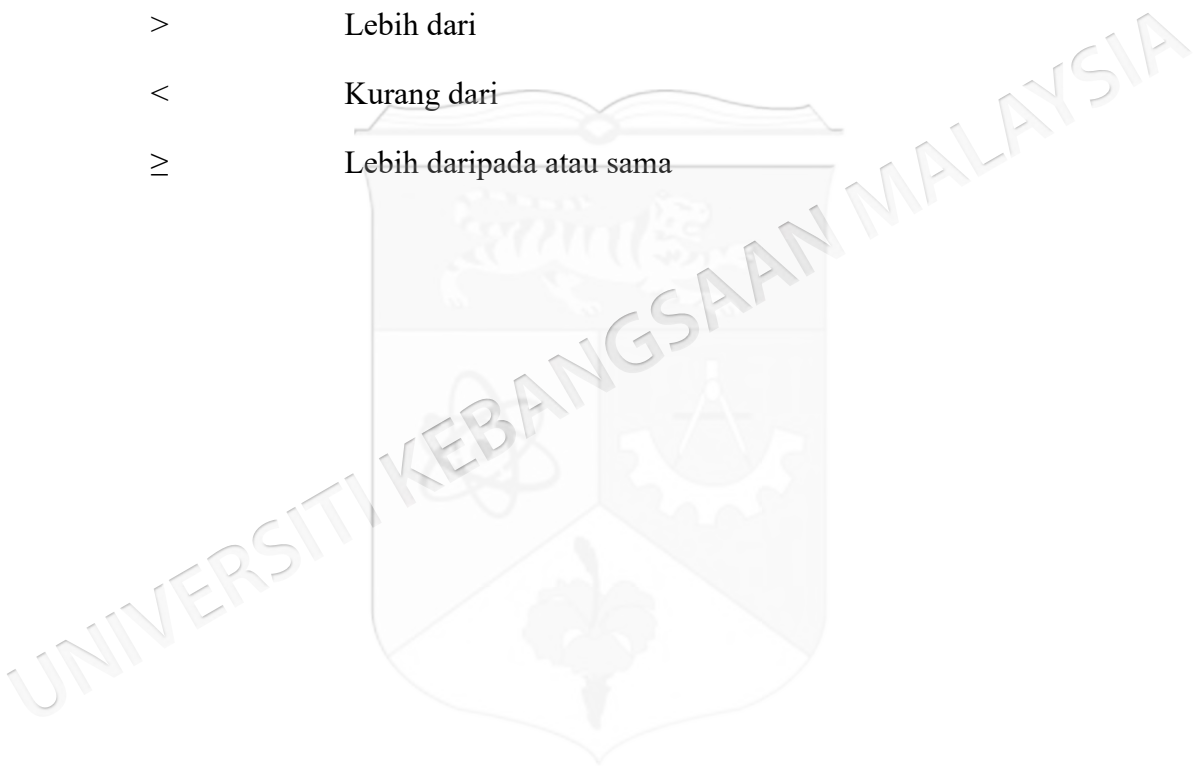
SENARAI TATANAMA

ALK	Anaplastik Lymphoma Kinase
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FISH	Fluorescene In Situ Hybridization
H&E	Haematoxylin And Eosin
IHC	Immunohistochemistry
INSS	International Neuroblastoma Staging System
MKI	Mitosis Karyohekxis Index
NBL	Neuroblastoma
SNP	Single Nucleotide Polymorphism



SENARAI SIMBOL

°C	Degree celcius
μl	Microlit
μm	Mikrometer
mL	Mililiter
L	Liter
%	Peratus
>	Lebih dari
<	Kurang dari
≥	Lebih daripada atau sama



BAB I

PENGENALAN

1.1 PENGENALAN

Neuroblastoma (NBL) adalah kanser yang berlaku secara eksklusif pada kanak-kanak sahaja. Kejadian neuroblastoma yang telah direkodkan sepanjang tahun telah membuktikan bahawa kes neuroblastoma meningkat melepasi kadar leukemia akut dan juga tumor otak primer. Sejak diperkenalkan pada tahun 1910 oleh J. H. Wright, neuroblastoma telah mencatatkan kadar kematian paling tinggi walaupun terapi intensif telah diberikan kepada pesakit. Secara klinikal, neuroblastoma adalah satu penyakit yang heterogen. Beberapa tumor menunjukkan regresi spontan manakala yang lain adalah sangat agresif dan sering menyebabkan prognosis yang tidak baik. Ciri klinikal pesakit adalah berbeza dalam kebanyakan kes neuroblastoma walaupun ianya dipercayai hanya ditemui pada medulla adrenal atau di sepanjang ganglia simptomatik (Brodeur et al, 2003).

Di Malaysia, terdapat sebanyak 4.9 kes per juta penduduk bagi setiap tahun telah dilaporkan (Lim et al, 2008). Laporan Pendaftaran Kanser Kebangsaan 2007 telah mencatatkan 24 kes neuroblastoma dengan peratusan keseluruhan adalah sebanyak 5.1% (Zainal et al, 2011). Daripada data ini, neuroblastoma secara histologinya adalah keenam yang paling biasa dilaporkan untuk kanser sistem otak dan saraf di Malaysia (Zainal et al, 2011).

Sebanyak 40% kes didiagnosis semasa fasa pertama iaitu 3 bulan pertama kehidupan dengan usia median adalah 17 bulan. Neuroblastoma diklasifikasikan sebagai tumor neural yang berasal daripada saraf yang biasanya bermula pada tisu sistem saraf simfetik dan paling lazim adalah kelenjar adrenal atau jaringan

simpatetik paraspinal. Neuroblastoma bermetastasis di dalam kira-kira separuh kes dan ciri klinikal adalah berbeza bergantung kepada jenis penyakit. Sebagai contoh, sel kanser yang bermetastatik ke tulang, sumsum tulang dan hati mengakibatkan simptom termasuklah pancytopenia, kerengsaan, penurunan berat badan dan sakit tulang (Maris et al, 2010)

Penglibatan ALK di dalam pelbagai jenis kanser manusia telah dikenalpasti sejak penemuan ALK pada tahun 1997 (Pulford et al, 1997) yang telah mengenal pasti translokasi t (2; 5) (p23; q35) pada limfoma sel besar anaplastik (ALCL). Translokasi ALK juga telah dikenalpasti di dalam kanser paru-paru sel bukan kecil (NSCLC) (Manabu et al, 2007). Ia membentuk gen gabungan yang terdiri daripada bahagian gen *echinoderm mikrotubule* yang berkaitan dengan protein 4 (EML4) dan kinase limfoma anaplastik gen (ALK) di dalam sel kanser paru-paru sel bukan kecil.

Penglibatan ALK yang pertama di dalam neuroblastoma telah dikenalpasti oleh Moose et al pada 2008 (Moose et al, 2008). Mutasi titisan germa dan somatik telah dikenalpasti pada kedua-dua kes neuroblastoma familial dan sporadik. Pengenalpastian mutasi yang menyebabkan peningkatan fungsi gen (*gain of function*) dan amplifikasi ALK juga telah dikesan (Moose et al, 2008). Penemuan ini telah membawa kepada penemuan hasil penyelidikan yang lebih luas dimana fungsi ALK dan laluan bagi perkembangan neuroblastoma telah dikenalpasti. Kajian lanjut yang dilakukan oleh Subramaniam et al, 2010 dan Wang et al 2013 juga telah mengenalpasti aberasi genetik seperti peningkatan jumlah salinan gen (*copy number gain*) dan amplifikasi.

Menurut Osajima 2005, fungsi protein ALK di dalam neuroblastoma belum dapat dikenalpasti sepenuhnya. Namun, terdapat dapatan kajian yang mengaitkan protein ALK dengan prognosis kanser paru-paru anaplastik.

Ekspresi ALK yang tinggi dan aberasi juga telah dikaitkan dengan prognosis pesakit neuroblastoma di barat (Passoni et al, 2009). Walau bagaimanapun, sumbangan ALK yang normal kepada perkembangan pembentukan neuroblastoma masih tidak dapat difahami dengan baik. Kajian intensif telah dilakukan terutamanya

untuk mengkaji korelasi di antara mutasi aktivasi pada domain tyrosine kinase (TK) ALK dan hasil klinikal telah menunjukkan prognosis yang lemah dalam NBL. Walau bagaimanapun, mutasi pada domain tyrosine kinase (TK) dalam neuroblastoma adalah terhad. Menurut De Brouwer dan rakan sekerja, hanya 6.9% mutasi tidak bererti dan 1.7% amplifikasi fokal pada gen ALK telah dikesan di kalangan 709 pesakit neuroblastoma.

Di dalam kajian ini, kadar kekerapan ekspresi protein ALK dikaji melalui teknik imunohistokimia dan frekuensi perubahan genetik ALK dalam kalangan pesakit neuroblastoma juga dikaji melalui teknik hibridasi *in situ* fluoresen. Di samping itu, kami juga berusaha untuk mengenal pasti hubungan di antara prognostik dengan ekspresi protein dan perubahan genetik.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1.2.1 Objektif Umum

Objektif utama kajian ini adalah untuk mengkaji ekspresi protein ALK dan perubahan genetik pada gen ALK menggunakan teknik imunohistokimia (IHC) dan juga penghibridan *in situ* berfluoresen (FISH) dan perkaitannya dengan prognostik penyakit neuroblastoma pada pesakit di Malaysia.

1.2.2 Objektif Khusus

1. Untuk mengkaji ekspresi protein ALK di dalam penyakit neuroblastoma menggunakan teknik imunohistokimia (IHC)
2. Untuk mengkaji perubahan genetik ALK pada pesakit neuroblastoma dengan menggunakan teknik penghibridan *in situ* berfluoresen (FISH).
3. Untuk menentukan terdapat perbezaan signifikan di antara ekspresi protein ALK dan perubahan genetik gen ALK dalam pesakit neuroblastoma yang boleh dijadikan nilai prognostik.

1.3 HIPOTESIS

1.3.1 Hipotesis Kajian

Terdapat perbezaan di antara ekspresi protein ALK dan perubahan genetik gen *ALK* di mana semakin tinggi salinan nombor gen *ALK* semakin tinggi ekspresi protein ALK.

1.3.2 Hipotesis Nul

Tidak terdapat perbezaan di antara darjah ekspresi protein ALK dan status perubahan genetik gen ALK.

1.4 PERNYATAAN MASALAH

Dalam kajian ini, kami ingin mengenalpasti ekspresi protein ALK menggunakan imunohistokimia dan juga abnormaliti genetik gen *ALK* (peningkatan salinan nombor gen, amplifikasi gen) menggunakan teknik penghibridan *in situ* berfluoresen pada pesakit neuroblastoma. Hubungan di antara faktor prognostik termasuklah seperti penemuan histopatologi, umur, peringkat diagnosis dan indeks mitosis-karioheksis di dalam neuroblastoma di Malaysia juga akan dikenalpasti.

BAB II

ULASAN KEPUSTAKAAN

2.1 STATISTIK NEUROBLASTOMA DALAM POPULASI MALAYSIA

Di Malaysia, terdapat lima jenis kanser yang paling lazim berlaku di kalangan kanak-kanak berumur 0 hingga 14 tahun, iaitu: leukemia, kanser otak, kanser sistem saraf, limfoma, kanser tulang dan mata serta kanser ovari. Berdasarkan laporan yang dikeluarkan oleh Daftar Kanser Kebangsaan pada tahun 2007, kes-kes yang melibatkan neuroblastoma (NOS) adalah dikategorikan sebagai kanser otak dan saraf. Pada tahun 2007, sejumlah 471 kes kanser otak dan saraf telah dikenalpasti, dan 24 (5.1%) daripadanya adalah terdiri daripada kes neuroblastoma. Jumlah kes didapati meningkat berbanding tahun 2003, di mana hanya 7 kes neuroblastoma sahaja yang dilaporkan (Daftar Kanser Kebangsaan). Ini menjadikan neuroblastoma adalah salah satu daripada 6 jenis kanser otak dan saraf yang paling biasa ditemui di Malaysia (Kementerian Kesihatan Malaysia 2007). (Jadual 2.1)

Jadual 2.1 Senarai kanser otak dan sistem saraf di Malaysia 2007 (Kementerian Kesihatan Malaysia 2007)

ICD	Histologi	Nombor	%
C70-72 Otak dan Sistem saraf			
9530	Meningioma, malignan	77	16.3
9473	Tumor neuroectodermal primitif, NOS	6	1.3
9470	Medulablastoma, NOS	21	4.5
9450	Oligodendroglioma	12	2.5
9440	Glioblastoma, NOS	66	14.0
9421	Pilositik astrositoma	1	0.2
9480	Serebelar sarkoma, NOS	2	0.4
9460	Oligodendroblastoma	1	0.2
9505	Ganglioglioma, anaplastik	4	0.8
9539	Meningeal sarkomatosis	2	0.4
9508	Atipikal teratoid/ rhabdoid tumor	1	0.2

Bersambung...

..sambungan

9538	Papilari meningioma	1	0.2
9501	Medulaepitelioma, NOS	1	0.2
9500	Neuroblastoma, NOS	24	5.1
9531	Meningothelial meningioma	1	0.2
9537	Transisi meningioma	1	0.2
9442	Gliosarkoma	9	1.9
9451	Oligodendroglioma, anaplastik	3	0.6
9441	Sel gergasi glioblastoma	2	0.4
9560	Neurilemoma, malignan	16	3.4
9401	Astrositoma, anaplastik	3	0.6
9430	Astroblastoma	2	0.4
9400	Astrositoma, NOS	45	9.6
9394	Miksopapilari ependimoma	1	0.2
9393	Papilari ependimoma	3	0.6
9540	Tumor sarung saraf perifer, malignan	5	1.1
9391	Ependimoma, NOS	10	2.1
9390	Karsinoma koroid pleksus	1	0.2
9382	Glioma bercampur	2	0.4
9380	Glioma, malignan	39	8.3
9561	Tumor sarung saraf perifer, malignan, rhabdomyoblas.	1	0.2
9364	Tumor neuroektoderma perifer	1	0.2
9150	Hemangioperisitoma, malignan	1	0.2
8003	Tumor malignan, jenis sel gergasi	1	0.2
8002	Tumor malignan jenis sel kecil	1	0.2
8000	Neoplasma, malignan	54	11.5
8001	Sel tumor, malignan	23	4.9
8010	Karsinoma, NOS	1	0.2
8140	Adenokarsinoma, NOS	5	1.1
8260	Adenokarsinoma papilari, NOS	1	0.2
8481	Adenokarsinoma penghasilan musin	1	0.2
8500	Karsinoma duktus penyusupan	1	0.2
8070	karsinoma sel skuamus	1	0.2
8800	Sarkoma, NOS	3	0.6
8802	Sarkoma sel gergasi (kecuali tulang)	1	0.2
8806	Tumor sel bulat desmoplastik	1	0.2
9064	Germinoma	4	0.8
9080	Teratoma, malignan, NOS	3	0.6
9081	Teratokarsinoma	1	0.2
9085	Tumor sel germa bercampur	1	0.2
9120	Hemangiosarkoma	2	0.4
9170	Limfangiosarkoma	1	0.2

471

Kanser adalah penyakit yang kronik dan proses pencarian maklumat tentang kanser adalah kompleks. Namun, menurut laporan yang dikeluarkan oleh Daftar Kanser Kebangsaan pada tahun 2007, insiden kanser yang dilaporkan melibatkan populasi yang besar di Malaysia, termasuk: di Semenanjung Malaysia, Sabah dan Sarawak (Kementerian Kesihatan Malaysia 2007).

Tumor malignan yang lazim dikenalpasti di kalangan kanak-kanak di bawah umur 4 tahun adalah leukemia akut, blastoma/embrioma (neuroblastoma, hepatoblastoma, retinoblastoma, nefroblastoma atau Wilms tumor), glioma dan teratoma. Manakala, tumor malignan yang selalunya dikenalpasti di kalangan kanak-kanak yang lebih tua (melebihi 4 tahun dan kurang dari 14 tahun) adalah limfoma, sarkoma tisu lembut, sarkoma osteogenik, sarkoma Ewing dan kanser tiroid (Harsh Mohan, 2015). Insiden kanser didefinisikan sebagai bilangan kes pertama yang dilaporkan bagi populasi tertentu sepanjang tempoh tertentu.

2.2 NEUROBLASTOMA

Tumor neuroblastik perifer al kanak-kanak terdiri daripada kumpulan neoplasma yang kompleks. Justeru itu, adalah penting bagi ahli patologi untuk menjalankan pencirian imunohistokimia dan biologi molekul agar diagnosis yang tepat dapat diberikan. Ini seterusnya menentukan prognosis neoplasma pediatrik tersebut (Frederic et al, 1998). Neuroblastoma atau juga dikenali sebagai *sympathicoblastoma* adalah tumor malignan bagi sel krista neural. Ia sering didiagnos di kalangan kanak-kanak yang berusia 5 tahun ke bawah (Mohan et al, 2015.)

Manifestasi klinikal penyakit neuroblastoma dikaitkan dengan pertumbuhan setempat tumor yang pesat, penyebaran metastasis atau perkembangan sindrom hormon. Simptom setempat bagi neuroblastoma pula adalah seperti: pengembungan abdomen, demam, penurunan berat badan dan dedar (Mohan et al, 2015). Kadar risiko neuroblastoma adalah berbeza. Pesakit dengan kadar risiko yang rendah tidak perlu menjalani terapi yang kerap atau tidak perlu menjalani terapi langsung. Akan tetapi, bagi pesakit dengan risiko penyakit yang tinggi, kadar kematian adalah >50%, meskipun mereka telah menjalani terapi bermultimod. Tumor malignan boleh terjadi di beberapa tapak lokasi. Tumor ini terhasil disebabkan oleh keabnormalan genetik. Malignansi pada bayi fetal dan neonatal mempunyai kecenderungan untuk merosot secara spontan atau matang. Selain itu, tumor malignan juga mempunyai ciri-ciri histologi yang unik. Ia mempunyai penampilan yang primitif atau embrio berbanding penampilan pleomorfik-anaplastik. Tumor malignan boleh dirawat menggunakan

kemoterapi atau radioterapi, namun risiko malignansi kedua boleh terjadi (Harsh Mohan, 2015).

Neuroblastoma mempunyai keheterogenan yang unik. Ia boleh menjalani regresi spontan, dari tahap malignan kepada benigna yang menarik minat para penyelidik pediatrik. Namun, berdasarkan kategori risiko baru dalam Kumpulan Risiko Neuroblastoma Antarabangsa (INRG), pesakit hanya boleh dikenalpasti sebagai risiko rendah jika tumor adalah bebas daripada amplifikasi MYCN atau aberasi kromosom segmental (*segmental chromosome aberration*, SCA) (Cohn et al, 2009). Tumor neuroblastoma mempunyai tingkah laku klinikal yang heterogenus, bermula dari kemerosotan spontan kepada heterogeniti yang luas dalam tingkah laku klinikal, bermula dari regresi spontan hingga haluan klinikal yang agresif dan kematian akibat penyakit.

Kepelbagaian klinikal ini berkait rapat dengan keabnormalan genetik yang dikenalpasti pada tumor. Sekurang-kurangnya tiga subjenis utama penyakit adalah berkait rapat dengan genetik, sebagai contohnya hiperdiploid/ berhampiran tumor triploid yang pada umumnya dikaitkan dengan kesan yang lebih positif, tumor yang terhasil daripada amplifikasi MYCN (*MYCN amplification*, MNA) mempunyai prognosis yang teruk (Brodeur et al, 1984), dan tumor yang terjadi disebabkan oleh kehilangan material kromosom 11q homozigot pula dikaitkan dengan kemandirian pesakit yang teruk (Attiyeh et al, 2005, Spitz et al, 2003).

Setiap subjenis genetik ini juga mempunyai profil ekspresi gen global yang sangat berbeza (McArdle et al, 2004, Wang et al, 2006). Penambahan kromosom yang tidak seimbang terjadi dalam setiap subjenis genetik, di mana beberapa subjenis mempunyai taburan yang tidak rawak. Contohnya, kehilangan kromosom distal 1p berlaku kerap dalam tumor MNA, manakala kehilangan kromosom 3p berlaku terutamanya dalam subjenis 11q (Breen et al, 2000, Plantaz et al, 2001, and Vandesompele et al, 1998). Ketidakseimbangan kromosom yang paling lazim adalah penambahan kromosom 17q dimana ia berlaku pada frekuensi tinggi dalam semua subjenis neuroblastoma tahap berisiko dan telah dikaitkan dengan fenotip klinikal yang teruk dalam kebanyakan kajian (Bown et al, 2001).

2.2.1 Sistem Klasifikasi Neuroblastoma Antarabangsa (INSS)

Sistem Klasifikasi Neuroblastoma Antarabangsa (INSS) adalah sistem klasifikasi yang paling lazim digunakan dalam menentukan tahap keterukan neuroblastoma pesakit. Jadual 1.2 menunjukkan sistem klasifikasi adalah berdasarkan reseksi kasar tumor setempat. INSS telah digunakan untuk mengklasifikasikan tahap keterukan penyakit neuroblastoma di kalangan pesakit sewaktu diagnosis dan digunakan selepas prosedur pembedahan yang terawal dijalankan.

Pesakit dengan neuroblastoma mempunyai nod yang melekat (perekatan nod yang bersambung, dan dibuang dengan tumor utama) dan positif terhadap tumor. Tumor yang merentasi garis tengah (atau timbul di garis tengah), tetapi telah sepenuhnya dikeluarkan, adalah tahap 1. Ia diandaikan bahawa tiada penglibatan nodus limfa atau penyakit metastatik terjadi pada tahap ini (Brodeur et al, 1993)

Jadual 2.2 Sistem Klasifikasi Neuroblastoma Antarabangsa (INSS) menurut Brodeur et al, 1993

Tahap	Definisi
1	Tumor setempat dengan eksisi menyeluruh secara kasar, dengan atau tanpa penyakit lebih mikroskopik; diwakili oleh nod limfa ipsilateral yang negatif terhadap tumor secara mikroskopik (nod yang melekat dan dibuang bersama tumor utama mungkin positif)
2A	Tumor setempat dengan eksisi tidak menyeluruh; diwakili oleh nod limfa ipsilateral tidak lekat dan negatif terhadap tumor secara mikroskopik.
2B	Tumor setempat dengan eksisi yang menyeluruh atau tidak menyeluruh, nod limfa ipsilateral tidak lekat positif terhadap tumor. Nod limfa kontralateral yang membesar mestilah negatif secara mikroskopik.
3	Tumor unilateral yang tidak boleh dipotong memasuki garis tengah dengan atau tanpa nod limfa kawasan; atau tumor unilateral setempat yang terlibat dengan nod limfa kontralateral; atau tumor garis tengah dengan perluasan bilateral menerusi kehadiran atau penglibatan nod limfa
4	Sebarang tumor utama yang tersebar ke nod limfa jauh, tulang, tulang sumsum, hati, kulit dan/atau organ lain (kecuali seperti yang dinyatakan untuk tahap 4S)
4S	Tumor utama setempat (seperti yang dinyatakan untuk tahap 1, 2A atau 2B), penyebarannya terhad kepada kulit, hati, dan/atau tulang sum sum (terhad untuk bayi < 1 tahun)

Bagi penyakit neuroblastoma tahap 2A dan 2B, kedua-duanya hanya mewakili 10% hingga 15% dari jumlah kes yang sedia ada. Perbezaan di antara 2 tahap ini masih dikekalkan, kerana kini tiada penemuan yang menyokong penggabungan kedua-dua tahap tersebut. Nod limfa bagi ipsilateral tidak lekat bagi tahap 2A mestilah diuji negatif terhadap tumor secara mikroskopik, manakala bagi tahap 2B, nod limfa bagi ipsilateral tidak melekat adalah tumor positif. Seterusnya, nod limfa kontralateral

yang membesar pula perlulah diuji sebagai negatif secara mikroskopik (Brodeur et al, 1993)

Perubahan paling penting yang berlaku pada tahap 3 adalah perubahan semula garis tengah. Sebelum ini, tumor sebelah boleh menyeberangi garis tengah secara teknikal jika ia menyerang salur spina menerusi foramina neural atau meluas hingga ke garis tengah anterior tulang belakang. Akan tetapi, tumor tersebut secara klinikalnya adalah berbeza daripada tumor besar, di mana tumor masih boleh memasuki garis tengah, mengelilingi salur darah utama dan struktur penting yang lain. Oleh itu, kolumnar tulang belakang dianggap sebagai garis tengah. Hanya tumor yang meluas sehingga badan vetebral yang bertentangan disebabkan oleh serangan berjangkit sahaja yang dikelaskan sebagai tahap 3. Walaupun masih terdapat kes yang samar-samar, mereka masih boleh dianggap berada pada tahap 3 kerana mereka telah dikenalpasti sebagai tahap 3 berdasarkan klasifikasi yang lama.

Tumor yang boleh dijalankan reseksi secara kasar, timbul pada garis tengah dari ganglia pelvik atau organ Zuckerkandl. Ia dianggap sebagai tahap 1. Tumor garis tengah yang meluas sehingga kolumna tulang belakang dan tidak boleh dijalankan reseksi akan dianggap sebagai tumor tahap 2A. Penglibatan nod limfa ipsilateral menjadikannya tahap 2B, manakala penglibatan nod limfa bilateral menjadikannya tahap 3. Tumor garis tengah yang memasuki secara bilateral dan tidak boleh dijalankan reseksi akan dianggap sebagai tahap 3. Tumor yang terdiri daripada mana-mana saiz dengan pengumpulan cecair dalam abdomen yang malignan atau implan peritoneal akan menjadi tahap 3 (tetapi tumor torasik dengan efusi pleura akan menjadi tahap 2B) (Brodeur et al, 1993).

Definisi tahap 4S telah dijelaskan oleh kuantiti sejauh mana penglibatan tulang sumsum. Tahap 4S secara amnya dikaitkan dengan bayi, yang ditakrifkan sebagai kurang dari 1 tahun. Hampir kesemua pesakit tahap 4S mempunyai sel-sel malignan sebanyak 1%, dan tumor terlibat yang mempunyai anggaran melebihi 1% dianggap sebagai tahap 4. (Brodeur et al, 1993). Oleh itu, bayi dengan tumor tahap 1 atau tahap 2 yang mempunyai sumsum lebih dari 10% akan menjadi tahap 4, dan bayi yang

berada pada tahap 3 tumor dengan tahap penglibatan sumsum yang dikenalpasti menerusi kaedah konvensional akan dianggap sebagai tahap 4 (Brodeur et al, 1993).

2.2.2 Lokasi Utama Tumor dan Metastasis

Tumor utama berasal dari semua tapak ganglion simpatetik atau paraganglion: terutamanya di sepanjang rangkaian paravertebral simpatetik, di dalam medula adrenal, di dalam organ Zuckerkandal, dan di dalam *ganglion stellatum* pada servikal vertebra ketujuh. Neuroblastoma dengan tingkah laku klinikal yang kurang baik mempunyai kecenderungan tinggi untuk pertumbuhan invasif setempat dan penyebaran metastatik melalui sistem limfa dan sistem peredaran darah (Shwab et al, 1983; Brodeur et al 1984 dan Seeger et al 1985.)

Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.3, pada tahap 4S dan tahap 4 neuroblastoma, pertambahan punca adrenal berlaku. Namun insiden neuroblastoma tahap 4S dan tahap 4 pada tapak lokasi serviks adalah jarang berlaku. Dengan teknik pengimejan yang lebih canggih, bilangan tumor utama yang tidak dapat dikenalpasti berkurangan dari 5% pada tahun 1980-an hingga 2% pada tahun 2000-2003. Bagi penyakit setempat, insiden torasik utama adalah selalunya lebih tinggi daripada punca adrenal. Namun, yang masih tidak jelas adalah bagi penyakit neuroblastoma servikal, di mana ia jarang dikaitkan dengan metastatik jauh. Sedangkan, hampir 90% daripada pesakit dengan penyakit metastatik mempunyai tapak utama tumor di bahagian abdomen (Nai Kong et al, 2005).

Jadual 2.3 Tapak utama neuroblastoma di kalangan 1967 pesakit berdasarkan tahap penyakit (Nai Kong et al, 2005)

Tapak utama	Tahap INSS			
	1-3 %	4 %	4s %	All %
Servikal	3.9	0.7	2.6	2.6
Torasik	19.5	8.4	12.2	14.7
Adrenal	41.4	62.3	63.8	51.3
Abdomen (bukan adrenal)	33.2	23.0	17.8	27.9
Tapak yang bergabung	1.8	2.9	1.0	2.1
Lain-lain	0.2	0.1	0	0.2
Tidak dapat dikenalpasti	0	2.5	2.6	1.2
Jumlah	100	100	100	100

Metastasis melibatkan taburan yang tidak rawak dan corak taburan adalah berbeza di antara tahap 4 yang sangat progresif dan tahap 4 yang sangat regresif. Tapak utama metastasis pada tahap 4 adalah termasuk tulang sum-sum, tulang dan nod limfa. Manakala, bagi bayi yang berda pada tahap 4, tapak metastasis selalunya melibatkan hati, kulit dan tulang sum-sum. Secara ringkasnya, bagi penyakit neuroblastoma tahap 4 yang terjadi kepada bayi bahagian tulang selalunya adalah tidak terlibat. Berdasarkan kajian lalu yang dijalankan oleh Monte dan rakan-rakan pada tahun 1983, metastasis melibatkan tulang biasanya lebih tertumpu kepada tulang muka, termasuk dan mungkin melibatkan pembentukan krest neural asal.

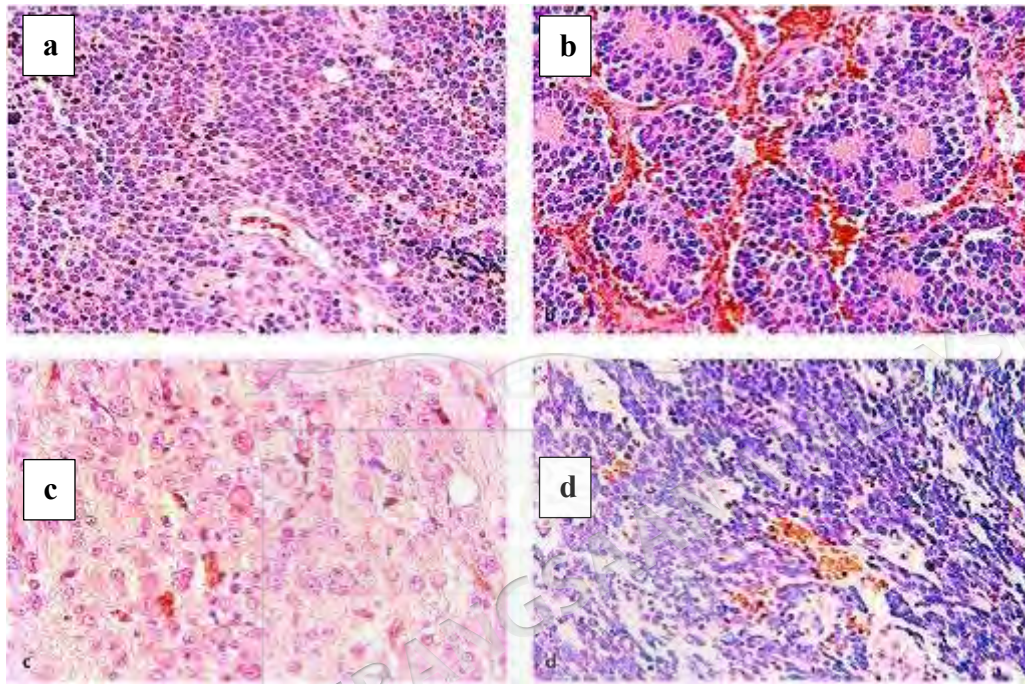
2.2.3 Ciri-Ciri Histologi

Pada tahun 1984 Shimada dan rakan-rakannya telah mencadangkan satu sistem klasifikasi yang membuat penilaian indikator morfologi yang berkait rapat dengan umur (Shimada et al. 1984). Urutan kematangan telah ditentukan menggunakan dua jenis indikator morfologi, iaitu: grad diferensiasi neuroblastik dan tahap perkembangan stroma Schwannian. Mereka mendapati terdapat peningkatan jumlah sel *karyorrhectic* dalam tumor agresif, lalu memperkenalkan konsep indeks mitosis-*karyorrhectic*.

Pada tahun 1994, sebuah jawatankuasa Patologi Neuroblastoma Antarabangsa telah ditubuhkan untuk menghasilkan klasifikasi yang signifikan dari segi prognostik dan relevan dari segi biologi. Klasifikasi ini akan digunakan secara meluas di seluruh dunia. Jawatankuasa ini telah menentukan terminologi dan kriteria morfologi Tumor Neuroblastik Periferi (PNT) buat pertama kalinya, manakala analisis dan validasi kedua-dua klasifikasi ini telah dicadangkan oleh Shimada et al, (1984) dan Joshi et al (1992, 1996). Pada tahun 1999, jawatankuasa telah membangunkan Klasifikasi antarabangsa berdasarkan klasifikasi Shimada yang asal dengan pengubahsuaian yang kecil (Shimada et al. 1999a,b).

Menurut kajian yang dijalankan oleh Shimada dan rakan-rakan dalam Rajah 2.1 pada tahun 1984, PNT telah dikelaskan kepada empat kategori morfologi asas (Shimada 1999a): neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang); ganglioneuroblastoma, bercampur (stroma Schwannian yang banyak);

ganglioneuroma (stroma Schwannian yang dominan); dan ganglioneuroblastoma, nodular (komposit, stroma Schwannian yang banyak / stroma yang dominan dan stroma Schwannian yang kurang).



Rajah 2.1 Histologi tumor neuroblastik perifer a. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang), subjenis tidak diferensiasi. b. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang), subjenis kurang diferensiasi. c. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang, subjenis diferensiasi. d. Neuroblastoma (stroma Schwannian yang kurang) dengan indeks mitosis-karyorrhexis yang tinggi (MKI) (Nai-Kong et al, 2012)

Tiga kategori pertama dan subjenis mereka adalah berdasarkan pada perubahan morfologi mengikut urutan kematangan. Di antara kategori ini, ganglioneuroma tidak dianggap sebagai entiti yang berasingan, tetapi sebagai tumor yang telah matang sepenuhnya. Ia juga membentuk kontinum biologi bagi semua PNT, ia adalah model yang menggambarkan ganglioneuroma adalah hasil regresi neuroblastoma. Ketika pemeriksaan, tumor umumnya adalah sentiasa lembut. Kesan pemotongan dari subjenis yang tiada perbezaan atau kurang biasanya mengalami pendarahan, manakala tumor dalam subjenis diferensiasi selalunya berwarna kuning dan tanpa mengalami pendarahan.

Neuroblastoma atau stroma Schwanian yang kurang dalam kategori ini adalah terdiri daripada sel-sel yang membentuk lobus kecil yang dipisahkan oleh septa fibrovaskular nipis, di mana sel-sel Schwann (atau prekursornya) dapat dikesan menggunakan antibodi S-100 yang menunjukkan sel yang positif (Shimada et al, 1985). Tiga subjenis, iaitu, tidak diferensiasi, kurang diferensiasi dan dibezakan mengikut gred diferensiasi neuroblastik yang ketara.

Subtaip neuroblastoma yang tidak diferensiasi adalah subjenis yang jarang ditemui. Tisu tumornya terdiri daripada sel-sel neuroblastik yang tidak diferensiasi, dan tanpa neuropil atau roset yang dapat dikenali. Ujian tambahan seperti imunohistokimia, mikroskop elektron, dan analisis molekul/sitogenetik adalah diperlukan agar diagnosis dapat dibuat. Neuroblastoma, subjenis yang kurang diferensiasi biasanya mudah didiagnosis kerana terdapat bilangan neuropil dan roset yang berbeza daripada jenis Homer-Wright. Kebanyakan sel-sel tumor adalah tidak diferensiasi, di mana hanya kurang daripada 5% populasi sel yang mempunyai morfologi diferensiasi.

Neuroblastoma dengan subjenis diferensiasi selalunya mempunyai neuropil yang banyak. Lebih dari 5% sel tumor adalah neuroblas yang telah menjalani diferensiasi. Mereka dicirikan dengan differensiasi sejajar pada nukleus (besar, terletak eksentrik dengan corak vesikel kromatin, nukleolus tunggal dan sitoplasma (eosinofilik/ amfofilik (*amphophilic*) dengan diameter lebih 2 kali ganda dari nukleus).

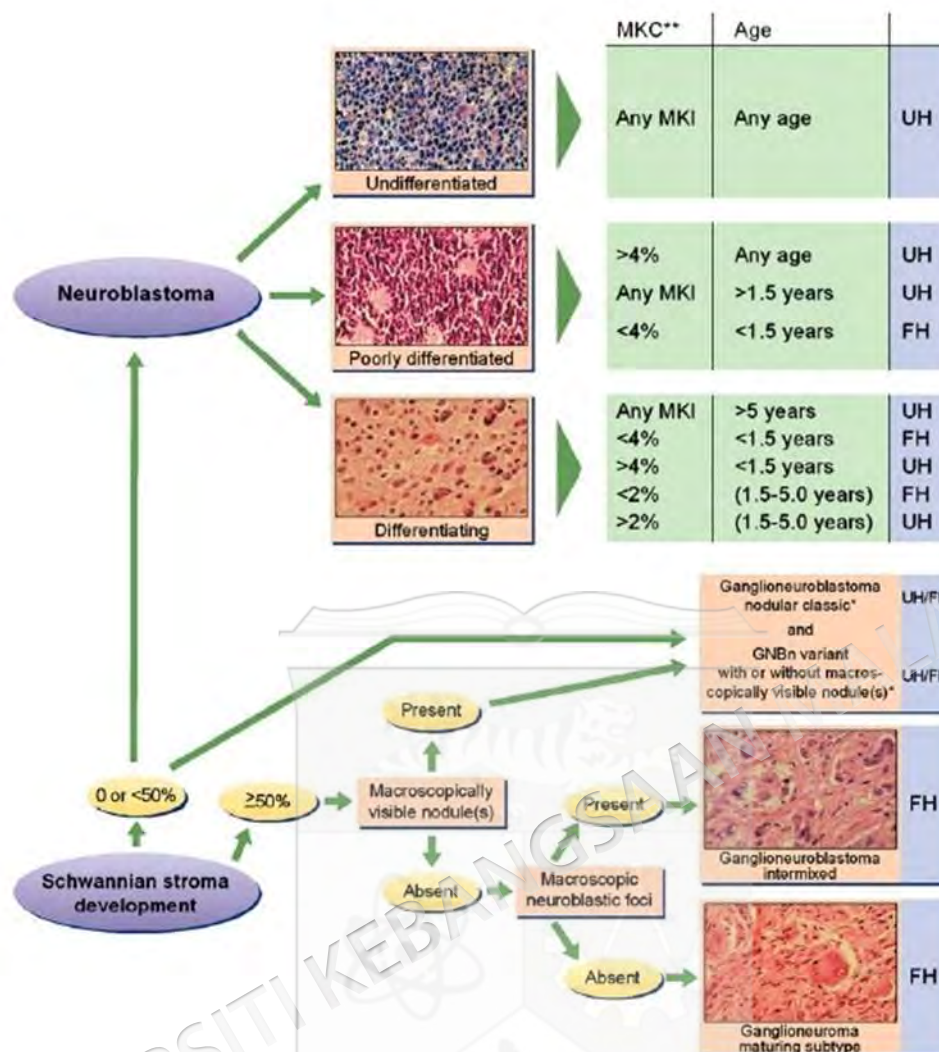
Pada tahun 1992 Joshi dan rakan sekerja (Joshi et al, 1996) telah mencadangkan pengredan histologi dengan menggunakan kadar mitosis (Mitosis ratio (MR); 10/10 medan kuasa tinggi yang rendah, >10/10 bidang berkuasa tinggi yang tinggi) dan kalsifikasi (kehadiran atau tanpa kehadiran). Dalam laporan mereka, mereka mencadangkan sebuah kumpulan risiko dengan menggabungkan gred histologi dan umur pesakit sewaktu diagnosis (risiko rendah: pesakit dalam semua peringkat umur dengan tumor yang mempunyai resolusi Mitosis ratio (MR) dan kalsifikasi, dan pesakit 1 tahun dengan Mitosis ratio (MR) rendah atau kalsifikasi, risiko tinggi: pesakit > 1 tahun dengan Mitosis ratio (MR) rendah atau kalsifikasi, dan

pesakit dalam semua peringkat umur dengan Mitosis ratio (MR) tinggi dan tiada kalsifikasi. Mereka kemudiannya menerbitkan penggredan histologi yang diubahsuai dengan penggantian kadar mitosis dengan Indeks Mitosis Karyoheksis, MKI (Joshi et al. 1996).

MKI didefinisikan sebagai pengiraan bilangan sel tumor dalam proses mitosis dan dalam proses karyorrheksis, ia harus menggambarkan purata bilangan sel bagi kesemua bahagian dalam tumor yang sedia ada. Sel-sel karyoheksis menunjukkan bahan nuklear yang lebih padat dan terfragmen, ianya disertai dengan sitoplasma eosinofilik yang lebih padat. Nukleus hiperkromatik tunggal tanpa kromatin yang terfragmen tidak terlibat dalam pengiraan MKI. Salah satu daripada tiga kelas MKI telah dirujuk kepada tumor neuroblastoma. Kesemua ini adalah kelas MKI yang rendah ($<2\%$ atau <100 dari 5000 sel-sel mitosis dan *karyorrhectic*), MKI sederhana ($2-4\%$ atau $100-200$ dari 5000 sel-sel mitosis dan *karyorrhectic*), dan MKI yang tinggi ($>4\%$ atau >200 daripada 5000 sel-sel mitosis dan *karyorrhectic*).

2.2.4 Prognosis

Rajah 2.2 menunjukkan Klasifikasi Patologi Neuroblastoma Antarabangsa (sistem Shimada), di mana ia membezakan kumpulan histologi yang menggalakkan dan tidak menggalakkan (Shimada et al.1999b). Prognosis neuroblastoma bergantung kepada beberapa jenis pembolehubah; pemboleh ubah yang mempunyai keadaan yang menggalakkan ialah seperti umur kanak-kanak dibawah dua tahun, lokasi tumor di ekstra-abdomen berbanding dengan jisim- abdominal. Histologi tumor dengan schwanian atau differentiasi ganglionik, pesakit dalam tahap klinikal 1 (tumor berada pada organ asal) atau tahap 2 (tumor yang telah merebak secara konsisten ke bahagian lain tetapi tidak melepasi garis tengah) serta ciri genetik yang menggalakkan seperti hiperdiploidi, kekurangan amplifikasi onkogen N-MYC dan ketiadaan ekspresi telomerase (Harsh Mohan, 2015).



Rajah 2.2 Klasifikasi Patologi Neuroblastoma Antarabangsa (Shimada et al. 1999b)

Tumor dalam kumpulan histologi yang menggalakkan berada dalam kerangka konseptual di mana urutan kematangan adalah berkait rapat dengan umur, dari subjenis kurang diferensiasi (<1.5 tahun sewaktu didiagnosis) kepada subjenis diferensiasi (<5 tahun). Neuroblastoma stroma Schwannian yang kurang) kepada ganglioneuroblastoma, bercampur (stroma Schwannian stroma yang banyak) kepada ganglioneuroma (stroma Schwannian yang dominan). Tumor neuroblastoma dalam kumpulan ini sepatutnya mempunyai MKI rendah (untuk pesakit <5 tahun) atau sederhana (bagi mereka <1.5 tahun). Namun sebaliknya, tumor dalam kumpulan histologi yang tidak menggalakkan mempunyai histologi yang tidak matang untuk usia pesakit dan ini termasuk subjenis yang tidak diferensiasi (pada mana-mana peringkat umur), subjenis yang kurang diferensiasi (≥ 1.5 tahun), dan semua subjenis

(≥ 5 tahun) neuroblastoma. Di antara tumor neuroblastoma, tumor yang mempunyai MKI yang tinggi (pada mana-mana peringkat umur) atau MKI sederhana (≥ 1.5 tahun) dikenalpasti sebagai histologi yang kurang menggalakkan (Peuchmaur et al. 2003; Umehara et al. 2000).

2.3 ANAPLASTIK LIMFOMA KINASE (ALK)

Anaplastik Limfoma Kinas (ALK) adalah pertama kali dikenal pasti pada produk gabungan gen onkogenik yang berkait dengan limfoma sel besar anaplastik (ALCL) (Moris et al, 1997). ALK diklasifikasikan sebagai kumpulan superfamili reseptor insulin (IR) di dalam reseptor tirosin kinase (RTK) kerana ia mempunyai homologi yang tinggi dengan ahli keluarga lain seperti leukosit tirosin kinase (LTK), faktor pertumbuhan insulin -1 reseptor kinase (IGF1RK) dan kinase reseptor insulin (IRK); Webb et al, 2009. Ia terdiri daripada 1620 amino asid (aa) protein transmembran yang terdiri daripada 1030-aa protein daripada domain ekstraselular, 28-aa protein domain penyebaran transmembran dan 276-aa protein intra selular tyrosin kinase domain Palmer et al, 2009.

177-kDa polipeptida protein ALK menjalani proses pengubahsuaian pasca-translasi, seperti N-glikosilasi, untuk menghasilkan 2 protein matang yang bersaiz 220 dan 190 kDa (Iwahara et al, 1997, Morris et al, 1997, Pulford et al, 1997). ALK mempunyai dua bentuk isoforms protein iaitu dengan reseptor lengkap yang bersaiz 220-kDa dan protein yang mengalami pemotongan ekstra selular yang bersaiz 140 kDa. Fungsi relevan fenomena ini adalah kurang jelas walaupun pembahagian pemotongan dua isofom protein boleh dihalang oleh faktor yang belum dikenalpasti yang dikeluarkan oleh sel Schwann (Degoutin et al, 2009)

Kajian yang dijalankan oleh Iwahara dan rakan (Iwahara et al, 1997), telah menunjukkan ekspresi ALK diregulasi semasa proses pembentukan serta fungsi sistem saraf. Ekspresi ALK yang tinggi dapat dilihat di dalam otak neonatal selepas 7 hari dan ia akan menurun pada kadar minimum selepas 3 minggu kelahiran. Kadar ekspresi yang minimum ini akan dikekalkan pada umur setahun atau sehingga dewasa. Ekspresi tinggi mRNA *ALK* di dalam otak neonatal mencadangkan ALK

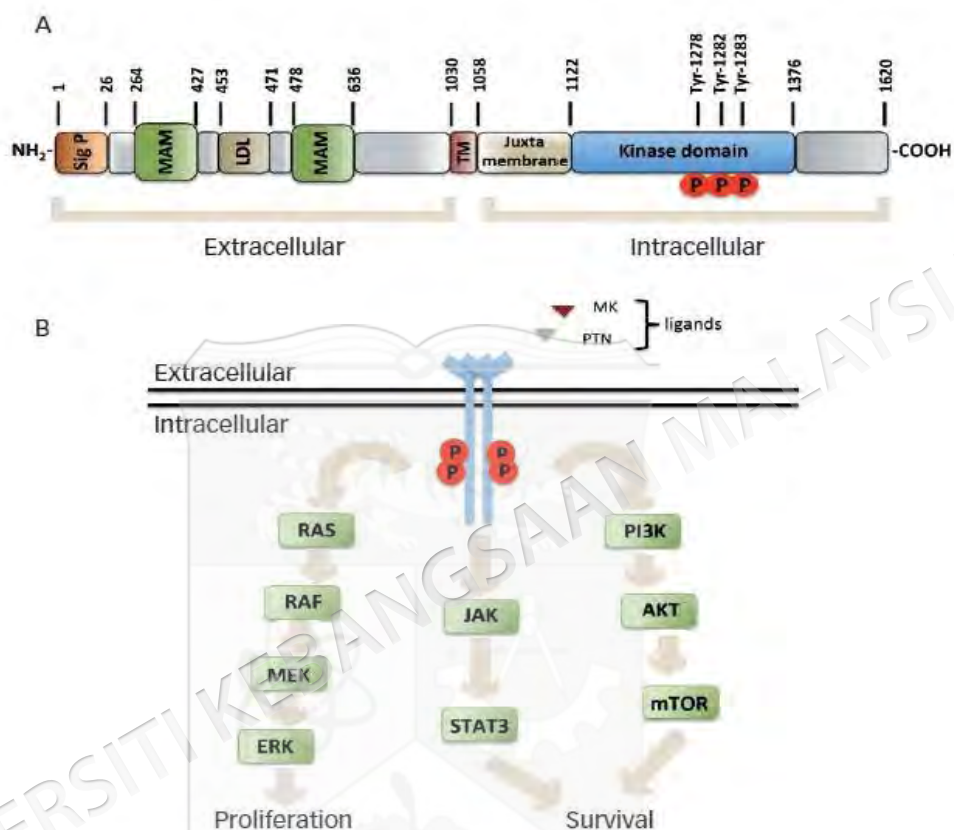
berkemungkinan terlibat dalam pembentukan sistem saraf pusat (CNS) semasa percambahan ekson dan retraksi.

Tambahan pula, ekspresi ALK di dalam sistem saraf adalah tinggi di dalam sistem saraf pusat, otak dan saraf tunjang. Di dalam otak, ekspresi ALK berkait rapat dengan ketumpatan sel pada stem otak, mesencephalon, diencephalon dan telencephalon. Ekspresi ALK yang sangat tinggi dikenal pasti di kawasan ventral di dalam saraf tunjang. Selain itu, ekspresi ALK juga dikesan pada sistem saraf periferi (PNS) seperti ganglion Vang cranial (trigeminal) yang merangkumi tiga cawangan saraf, saraf mata, saraf maksilari dan mandibular, superior servikal ganglion *myenteric plexus* (SCG) sepanjang paksi usus dan ganglia akar dorsal (DRG) (Iwahara et al, 1997).

Seperti Reseptor Tirosin Kinase lain, ALK mempunyai 3 domain struktural iaitu domain pengikatan-ekstraselular, transmembran dan domain tirosin kinase intraselular. Melalui homologi, ALK adalah berkait rapat dengan tirosin kinase leukosit, dan kedua-duanya tergolong di dalam superfamili-reseptor insulin. Di bawah keadaan fisiologi, pengikatan ALK kepada ligan mendorong kepada homodimerisasi ALK, yang membawa kepada pengaktifan trans-fosforilasi dan aktivasi kinase. Pada proses translokasi ALK, 50 pasangan gabungan menyediakan domain pendimeran, yang membolehkan pengaktifan ligan bebas daripada kinase. Di samping itu, tidak seperti ALK asli, yang terletak pada membran plasma, sebahagian besar protein gabungan ALK ditempatkan di dalam sitoplasma. Perbezaan dalam penempatan selular juga mungkin menyumbang kepada deregulasi pengaktifan ALK (Palmer et al, 2009).

Rajah 2.3 menunjukkan struktur aktivasi pengekspresan ALK. Rangkaian ekstraselular mengandungi isyarat peptide (Sig-P) - 2 meprin protein A-5, domain reseptor protein tirosin phosphatase mu (MAM) dan satu lipoprotein berkepadatan rendah (LDL). Domain transmembran (TM) menghubungkan kawasan ekstraselular dan intraselular. Kawasan intraselular mengandungi domain juxtamembran dan domain katalitik kinase yang mengandungi tiga tapak fosforilasi tirosin yang diperlukan untuk pengaktifan. B) Pengikatan ligan kepada reseptor membawa kepada

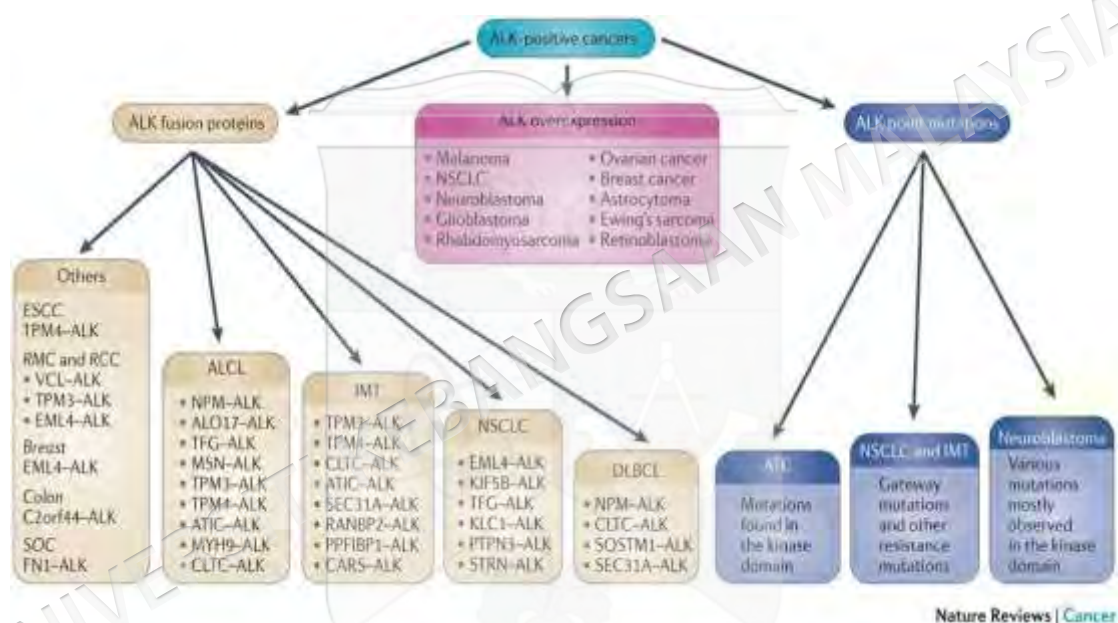
pengaktifan domain tirosin kinase, dan seterusnya pengaktifan pelbagai laluan isyarat yang mengawal selia proses selular seperti proses proliferasi dan kemandirian hidup sel. (Iwahara et al, 1997).



Rajah 2.3 Struktur aktivasi pengekspresan gen ALK

Rajah 2.4 adalah contoh perubahan struktur utama yang berlaku disebabkan oleh pembentukan protein gabungan pada pesakit kanser yang positif ALK seperti yang digambarkan pada anaplastik limfoma sel besar (ALCL) NPM-ALK, keradangan tumor miofibroblastik (IMT) TPM3-ALK, kanser paru-paru bukan sel kecil (NSCLC) EML4-ALK dan kanser lain seperti karsinoma medula renal (RMC), karsinoma sel renal (RCC), kanser payudara, karsinoma kolon, karsinoma ovari serous (SOC) dan karsinoma sel skuamus oesophageal (ESCC) (Bengt Hallberg and Ruth H. Palmer, 2013).

Perubahan struktur seperti dalam Rajah 2.4 yang terhasil termasuk duplikasi (lebih salinan pada kromosom), translokasi (pemindahan bahagian kromosom kepada bahagian yang lain, kromosom bukan homolog dan pemansuhan (kehilangan bahagian kromosom). Di dalam kajian menyeluruh tentang pesakit kanser dengan ALK positif secara mutasi atau perubahan bilangan salinan gen, ALK didapati mengalami perubahan struktur di dalam kromosom seperti translokasi dan duplikasi (perubahan nombor salinan). Selain itu, mutasi spontan dan yang diwarisi terutamanya mutasi titik akan mengakibatkan perubahan dalam domain tirosin kinase juga telah ditemui sejak tahun 2008 (Bengt Hallberg and Ruth H. Palmer, 2013)



Rajah 2.4 Perubahan struktur utama dan pembentukan protein gabungan ALK yang paling banyak dikaji di dalam pesakit kanser yang positif ALK (Bengt Hallberg and Ruth Palmer 2013)

Sementara itu, ekspresi *ALK* yang tinggi telah dilaporkan di dalam beberapa jenis kanser seperti melanoma, NSCLC, neuroblastoma, glioblastoma, rhabdomyosarkoma, ovari, payudara, astrositoma, Ewing's Sarcoma dan retinoblastoma (Bengt Hallberg and Ruth H. Palmer, 2013). Mutasi ALK terdiri daripada mutasi yang berkaitan dengan tumor primer dan mutasi sekunder yang ikesan pada pesakit yang rintang dengan ubat crizotinib. Mutasi sekunder di dalam konteks gabungan *ALK* telah diterangkan di dalam NSCLC, IMT dan kanser tiroid anaplastik (ATC) (Bengt Hallberg and Ruth H. Palmer, 2013). Mutasi titik telah dikenalpasti terutamanya pada neuroblastoma, serta di dalam NSCLC dan ATC; kebanyakan

mutasi terletak di dalam domain kinase ALK. (Bengt Hallberg and Ruth H. Palmer, 2013).

2.3.1 Peningkatan Salinan Nombor ALK pada Neuroblastoma

Selain daripada mutasi, keabnormalan jumlah salinan yang merangkumi lokus gen ALK ditemui sehingga 20% pada kes neuroblastoma, terutamanya penambahan nombor salinan bahagian 2p atau seluruh kromosom 2. Nombor salinan ALK berkorelasi dengan ekspresi Mrna dan seterusnya ini dikaitkan dengan kelangsungan hidup yang lemah, walaupun di hadapan gen jenis liar (De Brower, 2010). Peningkatan salinan nombor gen ALK adalah berkorelasi dengan ekspresi mRNA dan ia berkait dengan kadar kemandirian hidup yang rendah walaupun mempunyai gen ALK yang normal (De Brower, 2010).

Berbanding dengan mutasi atau amplifikasi, peningkatan salinan nombor gen ALK berlaku pada kira-kira 15-20% daripada kes perubahan struktur gen secara keseluruhan (De Brouwer S et al, 2011 and Weiser D et al, 2011). Nombor salinan ini melibatkan hampir keseluruhan kromosom 2 atau kawasan pada kromosom 2p, peningkatan fokal ALK biasanya disertai dengan amplifikasi MYCN (De Brouwer S, 2011). Berdasarkan kajian oleh Janoueix-Lerosey dan rakan, peningkatan salinan kromosom 2p termasuk lokus ALK dikaitkan dengan peningkatan ekspresi ALK dan berkorelasi dengan kemandirian hidup yang rendah (Janoueix-Lerosey I, 2008, Passoni L 2009, De Brouwer S 2011). Analisis multivariat termasuk kovariat bersaing bagi mengkaji status MYCN, tahap penyakit, umur pesakit dan ekspresi ALK menunjukkan bahawa ekspresi ALK dikaitkan dengan hasil yang lebih buruk di dalam 3 set data yang berbeza (De Brouwer S, 2011).

2.3.2 Amplifikasi ALK pada Neuroblastoma

Satu kajian yang dijalankan oleh Caren dan rakan, menunjukkan bahawa amplifikasi gen *ALK* pada kromosom lokasi 2p rantau adalah berbeza daripada amplifikasi MYCN (juga di dalam 2p tetapi pada bahagian distal gen *ALK*) (Caren H et al, 2008). ALK diekspresi pada kadar yang tinggi di dalam neuroblastoma dan sel neuroblastoma yang disebabkan oleh amplifikasi *ALK* (Caren et al, 2008 dan Osajima-

Hakomori et al, 2005). Sebanyak 2-3% daripada kes neuroblastoma menunjukkan peningkatan amplifikasi ALK (Azarova et al, 2011).

Menurut Miyake et al, 2002, amplifikasi *ALK* yang pertama telah dilaporkan pada tahun 2002, bersama-sama dengan amplifikasi *MYCN* di dalam sel neuroblastoma (Miyake et al, 2002). Kajian selanjutnya juga telah membuktikan fenomena ini (George et al, 2008, Janoueix-Lerosey et al 2008, Mosse et al, 2008, dan George et al, 2007). Dengan penemuan ini, adalah jelas bahawa amplifikasi *ALK* berlaku hampir secara eksklusif dengan amplifikasi *MYCN* dan berlaku sebanyak 7-15% pada neuroblastoma primer dengan amplifikasi gen *MYCN* (George et al, 2008 dan De Brouwer et al 2011).

Sebaliknya, amplifikasi dan mutasi *ALK* adalah jarang didapati di dalam tumor yang sama (Janoueix-Lerosey et al 2008 dan De Brouwer et al 2011). Setakat ini, amplifikasi *ALK* tidak berkorelasi dengan kadar keagresifan penyakit setelah status *MYCN* diambil kira.

2.4 KAEDAH BAGI MENGENALPASTI ALK PADA NEUROBLASTOMA

Ekspresi *ALK* dapat dikesan dengan menggunakan kaedah imunoreaktif yang biasanya terhad pada tisu saraf (Justus Duyster et al, 2001). Kaedah piawai menggunakan sitomorfologi dengan aspirat sumsum tulang (Bone Marrow, BM) tidak begitu sensitif bagi mengesan sel neuroblastoma tunggal. Jawatankuasa Eropah SIOP Neuroblastoma (European SIOP Neuroblastoma Group, SIOPEN) telah membangunkan ujian imunositokimia anti-GD2 yang sensitif dan memperkenalkan kriteria morfologi dan imunositik untuk interpretasi hasil.

Sitospin diinkubasi dengan antibodi monoclonal anti-GD2 yang boleh didapati secara komersil di dalam kit Alkaline Phosphatase and anti alkaline phosphatase (APAAP). Sel yang memenuhi kesemua kriteria morfologi dan imunositologi dikelaskan sebagai-sel positif (CPC). Sel yang tidak memenuhi kriteria akan dikelaskan secara negatif dan dimasukkan dalam kategori terkecuali

Profil genetik sel yang diragui telah diperiksa dengan menggunakan kaedah hibridisasi *in situ* fluoresens (Katrien Swerts et al, 2005). Menurut Thiele CJ et al. 1998 pewarnaan imunohistokimia untuk neurofilamen, synaptopisin dan enolase - khusus neuron telah digunakan untuk membezakan tumor sel kecil dan bulat pada kanak-kanak.

2.4.1 Imunohistokimia (IHC)

Teknik imunohistokimia untuk mengkaji penanda sel bagi menentukan fenotip tertentu dapat memberikan maklumat diagnostik, prognostik dan ramalan yang penting tentang status penyakit dan biologinya. Penggunaan antibodi untuk kajian molekular patologi tisu memerlukan sedikit penyesuaian teknik imunohistokimia, terutamanya yang melibatkan tisu yang telah diletakkan ke dalam agen tertentu. Aplikasi imunohistokimia di dalam makmal patologi anatomi adalah sangat penting bagi 1) diagnosis histogenetik neoplasia yang tidak dapat dibezakan secara morfologi 2) subtiping neoplasia seperti limfoma 3) pencirian tapak lokasi neoplasia primer malignan 4) penyelidikan untuk faktor prognostik dan indikasi terapeutik penyakit 5) diskriminasi diantara tumor benigna dan malignan berdasarkan sifat proliferasi sel, pengenalpastian struktur, organisma dan bahan yang dikeluarkan oleh sel.

2.4.2 Penghibridan *in situ* Berfluoresens (FISH)

Penghibridan *In Situ* Berfluoresens (FISH) membolehkan pengesanan asid nukleik yang spesifik pada kromosom, sel dan tisu yang morfologinya adalah terpelihara. Penggunaan FISH dalam analisis kromosom dibahagikan kepada aplikasi metafasa dan interfasa. Kebiasaanya untuk tisu yang telah dimasukkan ke dalam agen parafin, FISH dilakukan pada interfasa sel. Ini kerana blok tisu formalin terbenam (FFPE) sudah tersedia di makmal histopatologi untuk digunakan di dalam teknik imunohistokimia dan pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E). Teknik FISH interfasa mempunyai kelebihan di dalam penyaringan sel dengan nukleus yang banyak secara cepat, tanpa perlu menggunakan kaedah kultur sel dan penyediaan kromosom metafasa. Ia juga boleh dilakukan di dalam kajian yang menggunakan sampel dengan indeks mitosis yang rendah seperti tumor pejal. Walaubagaimanapun, limitasi kaedah

interfasa ini adalah ia tidak berupaya untuk mengesan perubahan kromosom struktur yang tidak diketahui. (Sue et al, 1997).

Teknik ISH membolehkan pengguna untuk mengesan sasaran spesifik tertentu di dalam sel individu sambil memelihara morfologi sel dan tisu. Ia membolehkan perubahan morfologi yang berkaitan dengan lesi serta maklumat terperinci mengenai komposisi genetik sel dinilai secara serentak. Sampel tisu biasanya dibekukan atau dimasukkan di dalam parafin dan kedua-duanya boleh digunakan untuk pengujian hibridisasi. Tisu FFPE adalah sesuai untuk analisis DNA dan RNA, walaubagaimanapun kestabilan RNA didalam tisu adalah bergantung kepada masa di antara isolasi dan tempoh fiksasi. Tisu beku dan tisu FFPE dan memerlukan pra-rawatan yang sama dengan kaedah IHC bagi membolehkan hibridisasi yang berkesan. Prosedur itu biasanya merangkumi langkah seperti pengambilan sasaran-induksi haba dan pencernaan enzimatik tisu sebelum proses hibridisasi dimulakan. Prob untuk ISH yang biasa digunakan dalam makmal klinikal dan penyelidikan adalah prob DNA. Ini adalah kerana ia adalah lebih stabil dan mudah dimana ia boleh disintesis di dalam kuantiti yang banyak, kinetik dan boleh didapati dalam pelbagai saiz. Pada kebiasaannya, prob sudah dilabelkan dengan fluorokrom merah dan hijau terlebih dahulu. Label fluorensense ini dapat dikesan dengan serta merta dan biasanya ia adalah sesuai untuk semua jenis mikroskop pendafluor berfluoresen.

BAB III

METODOLOGI

3.1 PENGENALAN

Penyelidikan ini menerima kelulusan daripada Jawatankuasa Etika dan Penyelidikan Perubatan, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia dan dibiayai oleh geran UKM, Geran Galakan Penyelidik Muda dibawah kod projek GGPM-2013-051 dan JPP-IMR 2013-062.

3.2 BAHAN SPESIMEN

Kajian ini telah dijalankan di Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (PPUKM). Makmal yang telah digunakan bagi tujuan penyelidikan adalah dibawah Jabatan Patologi yang terletak dibawah unit Histopatologi bagi penyediaan sampel manakala di unit Sitogenetik bagi tujuan analisa slaid FISH. Makmal yang telah disebutkan seperti diatas mempunyai kelengkapan yang mencukupi bagi menampung keperluan projek ini. Kesemua peralatan yang telah digunakan dinyatakan di Jadual 3.1.

Jadual 3.1 Senarai peralatan yang digunakan dalam penyelidikan ini

Prosedur Kajian	Peralatan
Microtom	Mikrotom, model HM340E Mikrotom, Thermofisher Scientific, Germany
Pewarnaan Haematoksilin dan Eosin (H&E)	Rak Slaid, Pemegang Rak Slaid, dan balang kaca untuk pewarnaan dengan penutup.
Pewarnaan Immunohistokimia (IHC)	Kebuk wasap, rak slaid, balang pewarnaan dengan penutup, Slaid Sequenza® (Coverplate), Takungan Air, As One Japan,

Bersambung...

...sambungan

Penghibridan In Situ Berfluoresen
(Fluorescence *in situ* hybridization)

Kamera

Kebuk wasap, rak slaid, slaid, pemegang rak, dan balang pewarnaan, *Hybridizer*, inkubator, Takungan air (Water bath), Vorteks, Forsep, slip kaca (10mm, 16mm)

Mikroskop berfluoresen dengan perisian analisa bergambar (Image Analyzer 9DP2-BSW), Mikroskope binocular (Biocular Microscope Tube Olympus BX41-12P05)

3.2.1 Bahan Biologi

Bahan biologi yang telah digunakan didalam penyelidikan ini telah disenaraikan dalam Jadual 3.2.

Jadual 3.2 Senarai peralatan yang digunakan dalam penyelidikan ini

Proses	Bahan Biologi
Prob Antibodi Primer	Prob DNA <i>ALK FISH Split Signal</i> , Kod Y5417 Antibodi protin ALK, DAKO Monoclonal Mouse Anti-human CD246, ALK Protin, Kod M 7195

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang telah digunakan didalam penyelidikan ini telah disenaraikan dalam Jadual 3.3.

Jadual 3.3 Senarai bahan kimia yang telah digunakan dalam penyelidikan ini

Proses	Bahan Kimia
Deparafinisasi, Dehidrasi, dan <i>Mounting</i>	Xylen dan Alcohol (SIN 1170) from Hayman Limited, UK and DPX solution (DePeX mounting medium) (361254 D-VWR International Ltd., Poole England
Pewarnaan Haematoksilin dan Eosin (H&E)	Haematoksilin 2 (7231e), Alkoholik Eosin-Y (71204), reagen klarifier (71204) dan reagen blueing (7402) dari Richard Alan Scientific, Kalamazoo, USA.
Pewarnaan In Situ Berfluoresen	Histology FISH accessory Kit, Code K5599

3.2.3 Penyediaan Reagen

Kesemua reagen telah disediakan mengikut saranan pembekal dalam penyelidikan ini seperti dalam Jadual 3.4.

Jadual 3.4 Kaedah penyediaan reagen

Proses	Kit		
Pewarnaan Immunohistokimia	DAKO EnVision™ FLEX detection system, Code K8024		
	Reagen	Penyediaan	Ekuilibrasi semasa pewarnaan Takungan air : 95-99 °C
	Larutan Pra- rawatan (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828, Code K8004)	Larutkan 30ml larutan pra-rawatan ph tinggi (50x) menggunakan air suling atau air distil. Larutan yang telah disediakan boleh disimpan pada suhu 2-8°C selama sebulan	
	Penimbal Basuhan (EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831, Code K8007)	Larutan kuantiti yang secukupnya bagi penimbal basuhan (20x) menggunakan air suling atau air distil. Larutan yang telah disediakan boleh disimpan pada suhu 2-8°C selama sebulan. Larutan yang bertukar kelabu perlu dibuang.	Suhu Bilik
	Larutan substrat-DAB (EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	Campurkan 1 titik DAB+ (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827)) kedalam 1mL reagen substrat (mL EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM823) dan goncang larutan sehingga sebati. Larutan substrat-DAB stabil sehingga 5 hari selepas penyediaan dan perlu disimpan didalam botol gelap.	Suhu Bilik
Pewarnaan <i>In Situ</i> Berfluoresen	Histology FISH accessory Kit, Code K5599		
	Reagen	Penyediaan	Ekuilibrasi
	Deparafinisasi/Rehidrasi	Sediakan 2 jar dengan larutan xylene	Suhu Bilik
		Sediakan 2 jar dengan 96 % larutan alkohol	Suhu Bilik
		Sediakan 2 jar dengan 70 % larutan alkohol	Suhu Bilik
	Penimbal Basuhan (Vial 6)	Larutkan Vial 6 yang berisi penimbal basuhan dengan menggunakan air distil atau air suling pada suhu bilik dengan dilusi 1:20	Suhu Bilik
	Larutan Pra-Rawatan (Pretreatment Solution) (Vial 1)	Larutkan Vial 1 yang berisi larutan pra-rawatan dengan menggunakan air distil atau air suling pada suhu bilik dengan dilusi 1:20	Takungan air : 95-99 °C
	Enzim Pepsin sedia guna (RTU) Pepsin RTU (Vial 2A)	- Tiada penyediaan diperlukan	2-8 °C
			Bersambung...

,..sambungan

Dehidrasi	Sediakan 3 jar dengan larutan alkohol 70%, 85% dan 96%	Suhu Bilik
Penimbal Basuhan Stringen (Stringent Wash Buffer) (Vial 4)	Larutkan Vial 4 yang berisi penimbal basuhan stringen dengan menggunakan air distil atau air suling pada suhu bilik dengan dilusi 1:20	Suhu Bilik dan $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
Media mounting berfluoresen sedia guna (Fluorescence Mounting Medium) (Vial 5)	- Tiada penyediaan diperlukan	2-25 $^{\circ}\text{C}$
Sealan Slip Kaca (Coverslip Sealant)	- Tiada penyediaan diperlukan	2-25 $^{\circ}\text{C}$

3.3 METODOLOGI KAJIAN

3.3.1 Pengumpulan Spesimen

Ini merupakan kajian retrospektif menggunakan blok tisu formalin terbenam (FFPE) daripada pesakit yang berdaftar di Hospital Tunku Canselor Mukhriz (HTCM) dan Hospital Kuala Lumpur (HKL) dari tahun 2002 hingga 2013. Blok tisu FFPE telah di pilih berdasarkan slaid H&E terdahulu yang menepati kriteria pemilihan dan pengecualian yang dilakukan menggunakan teknik pemerhatian dibawah mikroskop oleh Pakar Patologi, Prof Madya Dr. Reena Rahayu Md Zin dan Dr. Aznim Hani Ramlan. Sebanyak 50 (n=50) kes neuroblastoma telah dikumpulkan dari HTCM dan HKL dari tahun 2002 sehingga 2013 dalam kajian ini.

Kesemua sampel yang telah dikumpulkan boleh dibahagikan kepada biopsy trefina atau reseksi tumor. Maklumat pesakit pula telah dikumpulkan melalui laporan histopatologi sementara data klinikal telah dikumpulkan dari unit rekod di HTCM dan HKL. Hanya kes neuroblastoma yang menepati dan memenuhi kriteria pemilihan dan pengecualian telah dipilih untuk kajian ini. Laporan yang menunjukkan pesakit mengalami rawatan kemoterapi dan radioterapi di kecualikan dari sampel kajian. Kes kes neuroblastoma berulang juga dikecualikan dalam kajian ini. Oleh itu hanya sebanyak 50 sampel yang terpilih.

a. Kriteria Pemilihan

1. Neuroblastoma sporadik and keturunan (heriditari)

2. Neuroblastoma metastatik

b. Kriteria Pengecualian

1. Neuroblastoma olfaktori
2. Sampel neuroblastoma yang telah melalui rawatan pembedahan (surgery) dan kimo atau sampel neuroblastoma yang telah melalui rawatan radioterapi

3.3.2 Pengiraan Sampel Saiz

Kes aberasi positif didalam neuroblastoma menurut kajian terdahulu telah diambil kira sebagai penanda aras bilangan sampel saiz minimum yang diperlukan dalam kajian ini.

Jadual 3.5 Kes positif yang mempunyai aberasi gen ALK dalam neuroblastoma mengikut kajian terdahulu

Penerbitan terdahulu	Jumlah kes neuroblastoma positif (n.)	Jumlah kes neuroblastoma yang mempunyai (aberasi positif) (n.)	Peratus kes positif (%)
Wang et al, 2013	188	76	40.4
M. Piqueras et al, 2010	92	60	65.2
Shukla et al 2012	192	20	10.4
Shulte et al, 2011	263	21	7.98

Menggunakan formula

$$n = \frac{Z^2 [p(1-p)]}{c^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 [0.0919(1-0.0919)]}{(0.10)^2}$$

$$n = 32.05$$

Oleh itu, sampel saiz minimum yang diperlukan dalam kajian ini adalah sebanyak 32 kes neuroblastoma.

3.3.3 Pewarnaan Haematoksilin dan Eosin (H&E)

Hirisan tisul setebal 3-4 μm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca. Hirisan tisul kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator pada suhu tidak lebih 60°C selama 10 minit dan diwarnakan dengan pewarnaan H&E. Pewarnaan H&E telah dilakukan di dalam kebuk wasap.

Hirisan tisul diparafinisasi dengan mencelupkan slaid kedalam 2 kali xilena selama 3 minit diikuti dengan alkohol mutlak 2 kali selama 3 minit seterusnya kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 minit. Slaid kemudiannya dibilas dengan air suling selama 3 minit sebelum dicelupkan kedalam larutan haematoksilin selama 3 minit. Slaid kemudiannya dilalukan dibawah air mengalir selama 3 minit sebelum dicelupkan kedalam larutan klarifier selama 5 saat. Slaid kemudiannya dibilas dengan air mengalir selama 3 minit. Slaid kemudiannya dicelupkan kedalam larutan eosin selama 8 saat. Slaid kemudiannya direndam kedalam air mengalir sebelum langkah dehidrasi diteruskan.

Slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 30 saat serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 30 saat. Slaid seterusnya dicelupkan kedalam larutan xilena 1 dan xilena 2 selama satu minit. Cecair DPX dititiskan keatas slaid sebelum di pasangkan dengan penutup kaca berukuran (22 mm x 22mm). Satu titis DPX telah diletakkan ke atas slaid dan cecair dibiarkan merebak sekata keatas hirisan tisul. Sekiranya terdapat gelembung udara terperangkap, gelembung udara tersebut dikeluarkan menggunakan forsep. Slaid dibiarkan kering sepenuhnya sebelum sebarang pemerhatian dilakukan.

3.3.4 Pewarnaan Immunohistokimia (IHC)

Hirisan tisul setebal 3-4 μm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca poly-lisina. Hirisan tisul dilekapkan rata dan tiada kedutan untuk mengelakan impak kepada hasil pewarnaan. Hirisan tisul yang telah dilekapkan telah dibiarkan kering untuk mengeluarkan lebihan air yang terperangkap didalam tisul dan membolehkan lekapan tisul yang sempurna sebelum diteruskan dengan langkah

pengeringan didalam ketuhar. Slaid kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator bersuhu tidak lebih daripada 60°C selama 45- 60 minit.

Slaid kemudiannya diparafinisasi dengan xilena dua kali selama 5 ($\pm$ 1) minit. Slaid direndam kedalam larutan alkohol mutlak selama 3 ($\pm$ 1) minit dan rehidrasi kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 ($\pm$ 1) minit setiap satu. Slide kemudiannya direndam kedalam penimbal basuh EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) sebelum disubjekkan kepada heat induced epitope retrieval (HIER). Jar yang mengandungi EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) yang telah dilarutkan diletakkan kedalam takungan air. Jar kemudiannya ditutup dengan penutup untuk mengelakkan proses evaporasi berlaku dan menstabilkan suhu. Takungan air yang mengandungi EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) telah dipanaskan pada suhu 97°C.

Hirisan tisu yang dicelupkan dalam penimbal basuh EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) bersuhu bilik, dicelupkan kedalam EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) pada suhu 97°C dan diinkubasi selama 20($\pm$ 1) minit dalam takungan air. Selepas 20 ($\pm$ 1) minit keseluruhan jar dikeluarkan daripada takungan air dan slaid dibiarkan sejuk didalam EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) selama 20 ($\pm$ 1) minit. Slaid kemudiannya dibilas dengan larutan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) bersuhu bilik selama 5($\pm$ 1) minit. Slaid kemudiannya disusun dalam plat sekuenza dan prosedur pewarnaan diteruskan. Hirisan tisu mestilah dipastikan tidak kering semasa proses pewarnaan dilakukan.

Tisu anaplastik besar limfoma/neuroblastoma positif dengan pengekspresan translokasi t (2;5) telah digunakan sebagai tisu kawalan positif manakala tisu normal nodus limpa/ tisu yang tidak diaram dengan antibodi primer digunakan sebagai kawalan negatif.

Hirisan tisu kemudiannya diinkubasi dengan 200 μ l dari 3% hidrogen peroksida dalam larutan penimbal fosfat selama 5 ($\pm$ 1) minit dan dibilas dengan penimbal basuhan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5($\pm$ 1) minit. Dilusi optimal antibodi primer DAKO Monoclonal Mouse Anti-human CD246, ALK protein, code

number M 7195, ialah 1:75 dan masa inkubasi optima disetkan pada 25 minit pada suhu bilik. Hirisan tisu telah diinkubasi dengan 200µl antibodi primer DAKO Monoclonal Mouse Anti-human CD246, ALK protin yang dilarutkan dalam penimbal diluen antibodi selama 20 minit. Slaid kemudiannya dibilas dengan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit. 200 µl daripada Envision™ FLEX/HRP (Horseradish peroxidase) telah dipipetkan keatas slaid tisu dan diinkubasi selama 20(±1) minit. Slaid kemudiannya dibilas dengan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit.

Larutan DAB-substrat telah disediakan dengan menambahkan 1 titis Envision™ FLEX DAB+Chromogen kedalam 1 mL Envision™ FLEX Substrate Buffer. 400 µl daripada larutan DAB-substrat telah dipipetkan ke atas hirisan tisu dan diinkubasi selama 10 minit. Lebihan larutan DAB-substrat dibilas menggunakan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit. Slaid kemudiannya diwarnakan dengan larutan haematoksilin selama 30 saat (masa pewarnaan haematoksilin adalah bergantung kepada jenis haematoksilin yang digunakan). Slaid kemudiannya dibilas dibawah air mengalir untuk membuang lebihan haematoksilin diatas tisu.

Setelah pewarnaan selesai, slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 5 (±1) minit serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 5 (±1) minit. Rak slaid digoncang dan digerakkan secara lembut ke atas ke bawah setiap 30 saat untuk mengeluarkan gelembung air yang mungkin terperangkap semasa proses pembilasan slaid semasa sesi pewarnaan. Slaid seterusnya dicelupkan kedalam larutan xilena 1 dan xilena 2 selama 5 (±1) minit. Cecair DPX dititiskan keatas slaid sebelum di pasang dengan penutup kaca berukuran (22 mm x 22 mm) slip kaca.

3.3.5 Penghibridan *in situ* Berfluoresen (FISH)

Hirisan tisu setebal 3-4 µm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca poli-Lisena (slaid poly-L). Hirisan tisu dilekapkan rata dan sebolehnya tiada kedutan untuk mengelakan impak kepada hasil pewarnaan. Hirisan tisu yang telah

dilekapkan telah dibiarkan kering untuk mengeluarkan lebihan air yang terperangkap didalam tisu dan membolehkan lekapan tisu yang sempurna sebelum diteruskan dengan langkah pengeringan didalam ketuhar. Slaid kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator bersuhu tidak lebih daripada 60°C selama 45- 60 minit. Pen berlian digunakan untuk menanda kawasan terpilih mengikut pemerhatian pakar patologi berpandukan slaid H&E.

Slaid kemudiannya diparafinisasi dengan xilena dua kali selama 5 (± 1) minit. Slaid direndam kedalam larutan alkohol mutlak selama 3 (± 1) minit dan rehidrasi kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 (± 1) minit setiap satu. Slaid kemudiannya direndam kedalam penimbal basuh larutan penimbal basuh sebelum disubjekkan kepada langkah pra-rawatan. Jar yang mengandungi larutan pra-rawatan yang telah dilarutkan diletakkan kedalam takungan air. Jar kemudiannya ditutup dengan penutup untuk mengelakkan proses evaporasi berlaku dan menstabilkan suhu. Takungan air yang mengandungi jar larutan pra-rawatan telah dipanaskan pada suhu 97°C.

Hirisan tisu yang dicelupkan dalam larutan penimbal basuh bersuhu bilik, dicelupkan kedalam larutan pra-rawatan pada suhu 97°C dan diinkubasi selama 10 (± 1) minit dalam takungan air. Selepas 10 (± 1) minit keseluruhan jar dikeluarkan daripada takungan air dan slaid dibiarkan sejuk didalam larutan pra-rawatan selama 15 (± 1) minit. Slaid kemudiannya dibilas dengan larutan pra-rawatan bersuhu bilik yang baru selama 3 (± 1) minit. Langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh yang baru selama 3 (± 1) minit. Hirisan tisu mestilah dipastikan tidak kering semasa proses pewarnaan dilakukan.

Slaid kemudiannya disubjekkan kepada rawatan enzimatik dengan pepsin sedia guna. Langkah ini dilakukan untuk memecahkan dan memusnahkan komponen ekstraselular matrik dan memudahkan pelekapan prob pada DNA. Dengan menggunakan tisu linles, kawasan sekitar spesimen dilap untuk mengeringkan lebihan larutan penimbal basuh. Sebanyak 5-8 titis pepsin sejuk telah dititiskan diatas slaid dan dipastikan menutupi keseluruhan kawasan tisu. Slaid kemudiannya diinkubasi kedalam inkubator bersuhu 37°C selama 3-6 minit. Masa rawatan enzim optimal

adalah bergantung dan berhubung kait dengan jenis tisu, fiksasi tisu, ketebalan spesimen, dan kematangan spesimen. Setelah langkah rawatan enzimatik selesai, hirisan tisu akan nampak lebih lut cahaya apabila diperhatikan dengan mata kasar. Lebihan pepsin dibuang dan slaid direndam kedalam larutan penimbal basuh selama 3 minit pada suhu bilik. Langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh baru selama 3 minit.

Slaid tisu kemudiannya dihidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 2 (± 1). Slaid kemudiannya dibiarkan kering sepenuhnya dalam keadaan tegak selama 10-15 minit. Setelah slaid kering, 2-5 μ l prob telah dipipetkan ke kawasan yang telah ditandakan menggunakan pen berlian.

Penutup kaca dilekatkan serta merta dan prob dibiarkan merebak secara sekata. Kemudian, bahagian luar penutup kaca dilekatkan dengan Coverslip Sealant. Pastikan Coverslip Sealant tidak bertindan dengan slaid dan keseluruhan bahagian tepi di litupi secara sempurna. Slaid kemudiannya diletakkan diatas *Hybridizer* bersama dengan *Humidity Control Strips* dan program disetkan 5 minit bagi penyahaslian pada suhu 82°C dan 24 jam hibridisasi pada suhu 45°C.

Pada hari kedua, letakkan penimbal basuh stringen II kedalam takungan air dan panaskan larutan sehingga 65(± 2)°C manakala satu lagi jar berisi penimbal basuh stringen I pada suhu bilik di dalam kebuk wasap. Selesai proses hibridisasi dalam hibridizer, gam sealan dan penutup kaca dikeluarkan secara berhati hati dari slaid dan direndam kedalam larutan penimbal basuh II bersuhu bilik selama 5 minit. Slaid kemudiannya dicelupkan kedalam penimbal basuh stringen II dalam takungan air.

Slaid kemudiannya diagitasi dalam aksi ke atas ke bawah beberapa kali sebelum dieram selama 10 minit pada 65(± 2)°C dalam takungan air. Selepas 10 minit, slaid dikeluarkan dari penimbal basuh stringen II dan dicelupkan dalam larutan penimbal basuh baru selama 3 minit pada suhu bilik dan langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh baru selama 3 minit.

Slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 2 ($\pm$ 1) minit serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 2 ($\pm$ 1) minit. Slaid dibiarkan kering selama 10-15 minit didalam kebuk wasap. Sebanyak 2-5 μ l *media fluoresen mount* diletakkan diatas slaid dan dipasangkan dengan penutup kaca. Media fluoresen mount dibiarkan menutupi hirisan tisu dan sebarang gelembung udara dikeluarkan. Slaid kemudiannya dilekatkan dengan sealan tetap dan disimpan didalam gelap sebelum analisis dibuat.

3.3.6 Analisis Slaid Penghibridan *in situ* Berfluoresen (FISH)

Slaid yang telah selesai dihibridasi dengan prob ALK kemudiaanya diimbias dengan menggunakan peralatan mikroskop berfluoresen (Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Tokyo Japan), GSL 120, Automated Cytogenetic Platform akan dianalisa dengan menggunakan perisian Cyto Vision R v7.3.1 Software Leica Biosystem Nussloch Germany. Sekurang-kurangnya 100 sel dikira bagi setiap slaid dan perubahan salinan gen direkodkan.

3.4 INTERPRETASI KEPUTUSAN

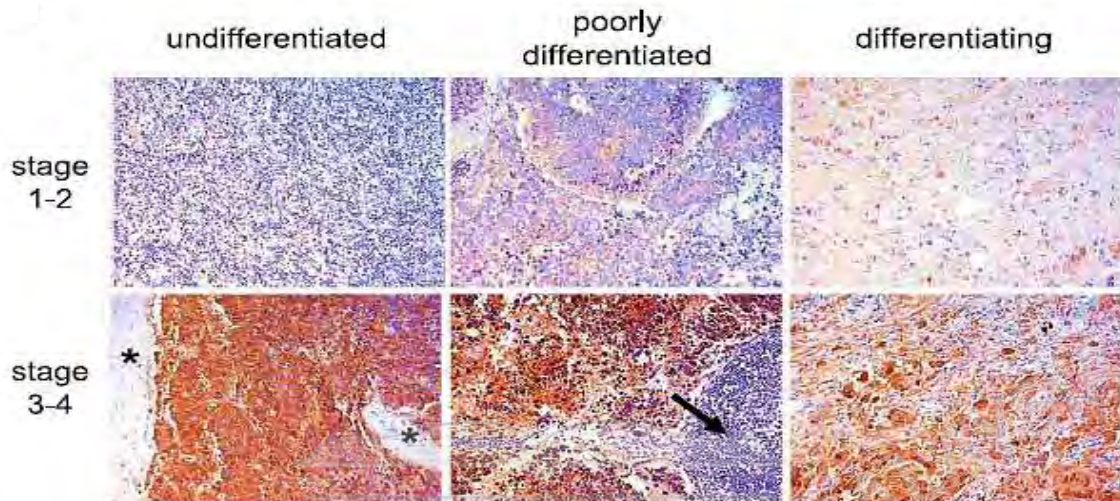
3.4.1 Immunohistokimia ALK

Pewarnaan immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan antibody primer monoclonal mouse anti human CD246 ALK antibody (clone ALK1, Dako). Skoring immunohistokimia dilakukan dengan mengira peratusan sel neoplastic reaktif-antibodi dengan intensiti pewarnaan. Interpretasi immunohistokimia ALK dilakukan mengikut intensity pewarnaan tumor yang positif. Kedua-dua pewarnaan sitoplasmik dan pewarnaan membran akan dikategorikan sebagai positif mengikut Jadual 3.6.

Jadual 3.6 Skor Pewarnaan Immunohistokimia

Skor	Klasifikasi
Negatif	Tiada Pewarnaan pada sitoplasmik dan nukleus
Positif	Pewarnaan positif pada sitoplasmik dan/atau nukleus

Menurut kaedah penskoran Passoni et al, 2009. ALK didapati ekspres secara berlebihan dalam NBL advans dan metastatik.



Rajah 3.1 Kaedah penskoran ALK IHC diadaptasi daripada Passoni et al, 2009.

Pewarnaan immunohistokimia bagi ALK dalam pesakit neuroblastoma dengan pesakit lokalisasi (stage 1-2) dan dengan tahap advan, pesakit metastatik (stage 3-4). Pewarnaan positif dapat dilihat dalam kedua-dua sitoplasma dan latar belakang fibrilari sel neuroblastik daripada subjenis tidak diferensiasi, kurang berdiferensiasi, dan subjenis diferensiasi neuroblastoma. Tiada pewarnaan ALK ditemukan pada nodus limpa (anak panah) dan normal (asterisk).

3.4.2 Analisa Slaid penghibridan *in situ* Berfluoresen (FISH)

Penghibridan *In Situ* Berfluoresen analisa (FISH analisa) dalam diagnostik molekular menggunakan prob dalam mengenalpasti aberasi gen atau kromosom yang berlaku pada tahap gen sama ada pada peringkat metafasa atau interfasa dalam sesuatu sel. Penggunaan prob menekankan penggunaan prob bertarget spesifik gen yang telah digunakan sebagai salah satu penanda aras utama (standard) dalam amplifikasi gen HER2

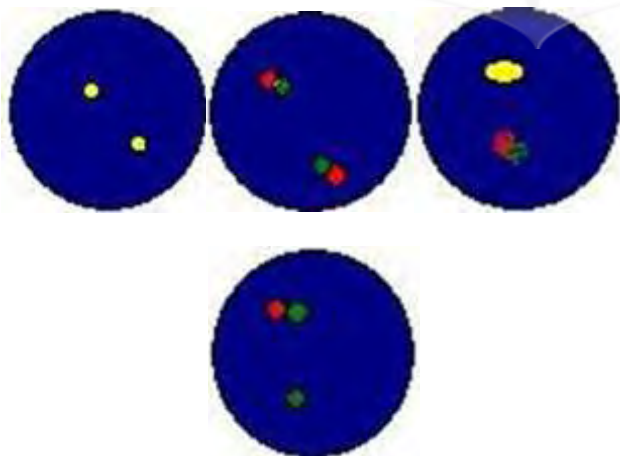
Dalam kajian kami, bagi menyiasat samaada terdapat penambahan salinan gen atau delisi gen dalam lokus ALK/CEP2, sebanyak 100 sel telah dikira daripada setiap analisis. Sekurang kurangnya 5 hingga 8 kawasan daripada setiap kes telah dianalisa berdasarkan kawasan yang telah dipilih pada awal kajian oleh pakar patologi. Sel

nukleus yang mempunyai pertindanan atau terpotong telah dikecualikan daripada analisis.

Tambahan lagi, sel nukleus yang menunjukkan morfologi yang kurang baik atau hancur, sebagai contoh mempunyai gelang atau berbentuk bulan sabit serta juga sel nukleus yang tiada signal nuclei telah dikecualikan dan prosedur diulang sekiranya diperlukan. Tisu kawalan positif daripada tisu paru-paru telah dibekalkan oleh pembekal dan telah digunakan sebagai tisu kawalan positif dan nodus limpa benigna telah dipilih sebagai tisu kawalan negatif. Semua nilai pemotongan (cut off values) bagi prob ALK adalah kurang daripada 5% (Wang et al, 2013).

Jadual 3.7. menunjukkan Analisis Slaid Penghibridan In Situ Berfluoresen (FISH) Bagi Kes Neuroblastoma. Sel dikategorikan sebagai normal atau negatif apabila terdapat 2 nukleus bertindan signal ALK/CEP2 atau signal oren dan hijau yang bersebelahan atau bertindan yang berdiameter kurang daripada dua signal jauh. Manakala, sel negatif dikelaskan apabila signal hijau yang tidak mempunyai signal oren menunjukkan delesi pada signal oren iaitu prob ALK dan dikelaskan sebagai negatif

Jadual 3.7 Analisis Slaid Penghibridan In Situ Berfluoresen (FISH) Bagi Kes Neuroblastoma

Sel	Klasifikasi
Sel Negatif	
	Normal 2 nukleus bertindan signal ALK/CEP2 atau signal oren dan hijau yang bersebelahan atau bertindan yang berdiameter kurang daripada dua signal jauh
	Negatif Signal hijau yang tidak mempunyai signal oren menunjukkan delesi pada signal oren iaitu prob ALK dan dikelaskan sebagai negatif

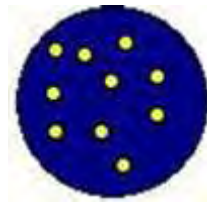
Bersambung...

...sambungan

Sel Positif



Penambahan salinan gen
Sel yang mempunyai kira-kira 6-9 signal
ALK/CEP2 yang bertindan



Amplifikasi
Sel yang mempunyai lebih daripada 10
signal ALK/CEP2 yang bertindan

Sel positif dibahagikan kepada penambahan salinan gen atau amplifikasi. Bagi neuroblastoma penambahan salinan gen dikelaskan lebih daripada 25% daripada 6-9 signal ALK/CEP2 yang bertindan diperhatikan dalam sesuatu sel. Manakala bagi sel yang menunjukkan amplifikasi, nilai-pemotongan (cut off value) sebanyak 20% yang diperhatikan daripada sesuatu sel mempunyai lebih daripada 10 signal ALK/CEP2 yang bertindan.

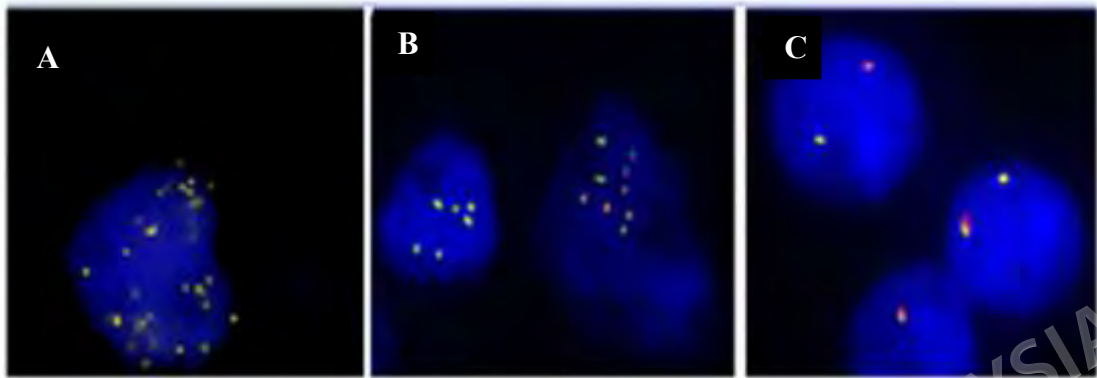
Interpretasi dalam Jadual 3.7 juga menurut hasil kajian M. Piqueras et al, 2012 dalam jadual dibawah. Sel dikelaskan negatif sekiranya signal gen spesifik dan gen penanda mempunyai nilai yang sama. Satu signal kuning yang menunjukkan pertindanan diantara gen ALK/CEP2 atau satu signal kuning atau signal hijau yang bersebelahan

Jadual 3.8 Interpretasi Menurut M. Piqueras et al, 2012

Interpretasi	Analisa
Normal	Number gen-spesifik signal dan signal penanda adalah sama (n=2)
Penambahan Salinan Gen	Number gen-spesifik signal yang mempunyai lebih daripada 3-9 signal dalam sesuatu sel
Amplifikasi	Number gen-spesifik signal yang mempunyai lebih daripada 10 signal dalam sesuatu sel

Sel didalam rajah D menunjukkan bahawa terdapat lebih daripada 10 signal ALK/CEP2 yang dapat dikira dalam sesuatu sel mengesahkan bahawa amplifikasi berlaku didalam sel. Manakala rajah E menunjukkan 6 signal ALK/CEP2

diperhatikan dalam satu sel yang menunjukkan penambahan salinan gen dalam sel. Rajah F pula menunjukkan dalam sel normal kita dapat memerhatikan hanya terdapat dua signal ALK/CEP2 dalam satu sel.



Rajah 3.2 Contoh analisa menggunakan mikroskop berfluoresen

Rajah 3.2 Contoh analisa menggunakan mikroskop berfluoresen yang di adaptasi daripada M. Wang 2013, Rajah 2 D-F. D: Amplifikasi: Sel yang mempunyai lebih daripada 10 signal ALK/CEP2. E: Penambahan Salinan Gen: Sel yang mempunyai 6-9 signal ALK/CEP2. F: Normal: Sel dengan 2 signal ALK/CEP2.

3.5 ANALISA STATISTIK

Analisa statistik telah dilakukan dengan menggunakan perisian SPSS versi 25. Alterasi genomik dan data klinikopatologikal telah dikorelasikan menggunakan tes SPSS iaitu kaedah ci berganda (Chi-Square) dan/atau tes Fisher Tepat (two-tail Fisher Exact Test). Keputusan analisa kemudiannya dikelaskan kepada signifikan sekiranya nilai-P menunjukkan nilai kurang daripada 0.05.

BAB IV

KEPUTUSAN

4.1 DATA KLINIKOPATOLOGIKAL

Ciri-ciri klinikopatologi 50 pesakit dengan neuroblastoma (26 lelaki dan 24 wanita) dengan usia min 36 bulan ditunjukkan dalam Jadual 4.1. Oleh kerana sample Neuroblastoma ini mempunyai bilangan kes yang terhad setiap tahun, kajian ini mempunyai limitasi dalam mendapatkan sampel. Di antara 50 kes neuroblastoma yang dikumpul, 33 kes adalah kelas sebagai peringkat I, II dan IVs manakala 13 kes adalah kelas sebagai peringkat III dan IV. Selain itu, menurut klasifikasi antarabangsa sistem pengredan neuroblastoma (INSS 2009), tumor neuroblastoma dapat dikategorikan kepada gred rendah (I, II, & IV) adalah sejumlah 33 dan gred tinggi (III dan IV) sejumlah 13. Kriteria diagnosis lain yang mengikut kriteria diagnosis INPC, terdapat tiga subtaip utama iaitu neuroblastoma yang tidak berdiferensiasi (n=5), neuroblastoma yang berdiferensiasi lemah (n=38) dan neuroblastoma yang berdiferensiasi (n=4). Antara lokasi tumor yang terdapat pada pesakit neuroblastoma sering dikenalpasti di retroperitonium (n=21), mediastinum/ benjolan abdominal/ benjolan hipokondrial/ benjolan torasik (n=14), nodus limfa servikal (n=3) dan sejumlah 12 lagi lokasi tapak yang tidak dinyatakan di dalam rekod.

Jadual 4.1 Data Klinikopatologikal

	Neuroblastoma
Median umur, bulan (purata)	36
Lelaki/Perempuan Nisbah	26:24 (1.08)
Lokasi	
Retroperitonium	
(adrenal/retroperitonium)	21
Mediastinum/benjolan abdominal /benjolan hipokondrial/benjolan torasik	14
Nodus limpa servikal	3
Lain-lain	12
Umur	
≤ 18 bulan	19
>18 bulan	28
Tahap INSS	
I, II, IVs	33
III, IV	13
Pengekspresan Protin ALK	
Positif	11
Negatif	39
Status gen ALK	
Amplifikasi	1
Pertambahan Bilangan Gen	21
Normal	25
MKI status	
Rendah	30
Tinggi	17
Subtaip Histopatologikal	
Tidak berdiferensiasi	5
Berdiferensiasi lemah	38
Berdiferensiasi	4

4.2 PENGEKSPRESAN PROTIN ALK DAN FAKTOR PROGNOSTIK

Jadual 4.2 menunjukkan bahawa neuroblastoma lebih banyak mempengaruhi pesakit lelaki berbanding pesakit perempuan. Dalam kajian kami frekuensi ini juga lebih kerap terjadi pada pesakit lelaki dengan 26 daripada 50 jumlah pesakit adalah lelaki manakala 24 daripada 50 pesakit lain adalah pesakit perempuan.

Jadual 4.2 Pengekspresan Protin ALK Dan Faktor Prognostik

Pembolehubah	ALK Protein Pengekspresan		Nilai Signifikan Asimptotik	df	Nilai p
	Negatif	Positif			
Jantina			0.037 ^a	1	0.848
Lelaki	40.0%	12.0%			
Perempuan	38.0%	10.0%			
Umur (bulan)			0.069 ^a	1	0.793
≤18	32.0%	10.0%			
>18	46.0%	12.0%			
Tahap			5.695 ^a	1	*0.017
I, II, IVs	47.8%	23.9%			
III, IV	28.3%	0.0%			
MKI status					
Rendah	54.0%	10.0%	2.105 ^a	1	0.147
Tinggi	24.0%	12.0%			
Pengredan (subtype)			1.113 ^a	2	0.573
Tidak berdiferensiasi	6.0%	4.0%			
Berdiferensiasi lemah	66.0%	16.0%			
Berdiferensiasi	6.0%	2.0%			

Ujian immunohistokimia juga dilakukan dengan menghubungkaitkan korelasi tersebut ke atas jantina pesakit. Pengekspresan protin ALK positif pada lelaki adalah sebanyak 6 kes (12%) dan 20 kes (40%) yang lain didapati negatif untuk pengekpresan protein ALK. Pengekspresan protein ALK yang positif pada wanita adalah sebanyak 5 kes (10%) dan kes-kes protein ALK negatif adalah sebanyak 19 kes (38%). Ujian Pearson Chi-Square menunjukkan nilai p untuk persamaan diantara protein ALK dan jantina ialah 0.848. Uji Ujian Fisher Tambahan juga menunjukkan nilai p=0.560. Oleh itu, pengekspresan protein ALK dan jantina didapati tidak mempunyai nilai yang signifikan dalam neuroblastoma.

Dalam kohort kami, terdapat 21 pesakit yang berumur kurang daripada 18 bulan manakala 29 pesakit lain direkodkan mempunyai umur lebih daripada 18 bulan. Neuroblastoma bagi usia pesakit kurang daripada 18 bulan biasanya menunjukkan prognosis yang baik berbanding dengan pesakit yang berusia 18 bulan ke atas. Sebanyak 11 kes mengekspreskan protin ALK daripada keseluruhan 50 kes pesakit. Bagi umur pesakit kurang daripada 18 bulan kami mendapati terdapat 5 kes (10%) menunjukkan ALK positif manakala pesakit dengan umur lebih daripada 18 bulan, 6 kes (54.5%) didapati positif untuk pengekspresan protin ALK.

Selain daripada itu, 39 kes didapati negatif bagi pengekspresan protein ALK daripada kesemua 50 kes. Sebanyak 16 kes diuji menunjukkan ALK negatif bagi pesakit berusia 18 bulan manakala pesakit yang berusia lebih daripada 28 bulan menunjukkan 23 kes pengekspresan ALK yang negatif. Pearson Chi-Square Test menunjukkan nilai p sebanyak 0.793 untuk persamaan protein ALK dan umur ialah. Ujian Fisher Tambahan juga menunjukkan nilai p 0.529. Oleh itu, korelasi diantara protein ALK dan umur didapati tidak menunjukkan nilai yang signifikan dalam neuroblastoma.

Neuroblastoma boleh dibahagikan kepada neuroblastoma yang menggalakkan dan neuroblastoma yang tidak menggalakkan mengikut Sistem Pengredan Neuroblastoma Antarabangsa, INSS. Peringkat yang baik untuk neuroblastoma biasanya tahap I, II dan IVs manakala tahap yang kurang baik adalah peringkat yang lebih tinggi, III dan IV. Dalam kajian kami, 33 kes dikategorikan sebagai peringkat I, II, dan IVs, sementara 13 kes lainnya jatuh ke peringkat III dan IV.

Terdapat empat kes yang tidak dapat dikenalpasti kerana kekurangan data dalam buku rekod pesakit. Daripada 50 kes, 11 kes didapati positif dengan pengekspresan protein ALK. Ekspresi protein ALK positif telah dilihat dalam 11 (23.9%) daripada 33 kes tahap I, II, dan IVs manakala tiada protein ALK yang positif (0.00%) dinyatakan dalam tahap III dan IV dalam kajian kami. Kami juga mendapati 35 kes lain (76.1%) negatif untuk pengekspresan protein ALK. Pearson Chi-Square Test menunjukkan nilai p untuk pernyataan dan peringkat protein ALK ialah 0.017. Ujian Exact Fisher Tambahan juga menunjukkan nilai $p=0.015$. Oleh itu, terdapat perbezaan yang signifikan untuk ungkapan protein ALK dan tahap kerana nilai P kurang daripada 0.05 ($p < 0.05$). Data ini menunjukkan bahawa ungkapan protein ALK mempunyai faktor prognostik yang baik dalam neuroblastoma.

Indeks Mitosis Karyoheksis (MKI) boleh ditakrifkan dengan mengira bilangan sel tumor dalam peringkat mitosis serta proses karyoheksis, serta harus mengambil kira purata untuk semua bahagian tumor yang terdapat di dalam sel. Di dalam kajian kami, kami mendapati terdapat 30 sampel dengan nilai MKI yang rendah dan 17 sampel mempunyai nilai MKI yang tinggi. Pengelasan bagi nilai MKI rendah ($<2\%$

atau <100 dari 5000 sel mitosis dan karyoheksis manakala MKI yang tinggi (> 4% atau > 200 daripada 5000 sel mitosis dan karyorektomi). Selain itu juga, kami mendapati bahawa 5/32 (15.62%) sampel mempunyai ungkapan protein ALK yang positif dalam kes MKI yang rendah, manakala sebanyak 6 dari 18 kes (33.3%) dalam MKI tinggi. Korelasi antara pengekspresan protein ALK dan status MKI menunjukkan nilai p (0.147). Selain itu juga, Ujian Fisher juga menunjukkan nilai 0.172. Oleh itu, tidak terdapat perbezaan yang signifikan bagi pengekspresan protein ALK serta peringkat MKI kerana nilai P kurang daripada 0.05 ($p < 0.05$).

Terdapat tiga subtaip utama iaitu neuroblastoma yang tidak berdiferensiasi ($n=5$), neuroblastoma yang berdiferensiasi lemah ($n=38$) dan neuroblastoma yang berdiferensiasi ($n=4$). Subtaip yang paling biasa di kalangan pesakit Neuroblastoma Malaysia adalah subtaip yang tidak berdiferensiasi. Dalam neuroblastoma yang tidak berdiferensiasi, 2 daripada 5 didapati positif untuk pengekspresan protein ALK manakala 3 lagi yang lain adalah negatif. Subtaip yang berdiferensiasi lemah didapati dengan frekuensi yang paling tinggi dengan 41 kes daripada 50. Daripada 41 kes 8 (16.0%) kes didapati positif untuk pengekspresan ALK manakala peringatan 33 kes didapati negatif untuk pengekspresan ALK. Terdapat hanya 4 kes positif untuk neuroblastoma yang tidak berdiferensiasi dan hanya 1 kes (6.0%) untuk neuroblastoma berdiferensiasi. Ujian Pearson Chi-Square menunjukkan nilai p untuk pernyataan protein dan subjenis ALK ialah 0.573. Tidak terdapat perbezaan yang signifikan untuk pengekspresan protein ALK dan subtaip oleh kerana nilai P kurang atau lebih daripada 0.05 ($p \geq 0.05$). Tiada korelasi dapat dilihat dari jenis subtaip dan pengekspresan protein ALK.

4.3 ALTERASI GENETIK ALK SERTA FAKTOR PROGNOSTIK

Jadual 4.3 menunjukkan perubahan genetik ALK yang boleh dibahagikan kepada normal, pertambahan nombor bilangan salinan dan amplifikasi. Kriteria bilangan salinan normal terdiri daripada 2 signal ALK dan CEP2, pertambahan bilangan nombor salinan terdiri daripada 3-9 isyarat ALK dan CEP2 manakala amplifikasi biasanya mempunyai 10 isyarat dan ke atas. Terdapat 25 kes normal dalam kajian ini dengan dua salinan gen yang didapati menggunakan teknik penghibridan in situ.

Jadual 4.3 Alterasi Genetik ALK serta faktor prognostik

Pembolehubah	Alterasi Genetik			Nilai Signifikan Asimptotik	df	Nilai p
	Normal	Pertambahan Salinan gen	Amplifikasi			
Jantina				0.900 ^a	2	0.638
Lelaki	40.0%	12.0%	2.1%			
Perempuan	38.0%	10.0%	0.0%			
Status MKI						
Rendah	47.8%	23.9%	0.00%	1.987 ^a	2	0.370
Tinggi	28.3%	0.0%	2.1%			
Tahap				12.636 ^a	2	*0.002
	54.0%	10.0%	2.3%			
	24.0%	12.0%	0.0%			
Pengredan (subtype)				1.370 ^a	4	0.849
Tidak berdiferensiasi	6.0%	4.0%	0.00%			
Berdiferensiasi lemah	66.0%	16.0%	2.1%			
Berdiferensiasi	6.0%	2.0%	0.0%			

Dalam 25 (53.2%) kes normal, 13 (27.7%) daripada pesakit lelaki dan 12 (25.5%) lagi daripada pesakit wanita. Terdapat 21 kes yang mempunyai nombor salinan gen dengan 11 (23.4%) adalah terdiri daripada pesakit lelaki dan 10 (21.3%) daripada pesakit wanita. Hanya satu kes dijumpai untuk amplifikasi yang terdiri daripada pesakit lelaki (2.1%).

Persamaan Chi-square antara perubahan gen ALK dan jantina ialah 0.638. Terdapat 30 kes (69.8%) perubahan gen ALK yang terdapat di peringkat I, II dan IVs. 10 kes (23.3%) adalah normal, 19 kes (44.2%) adalah pertambahan bilangan salinan dan 1 (2.3%) kes adalah amplifikasi. Terdapat 13 kes (30.2%) perubahan gen ALK yang terdapat di peringkat III dan IV. 12 (27.9%) kes normal, 1 (2.3%) kes adalah pertambahan bilangan salinan dan tiada kes amplifikasi 0 (0.0%). Persamaan Chi-Square antara perubahan gen dan tahap pengredan ALK adalah 0.002.

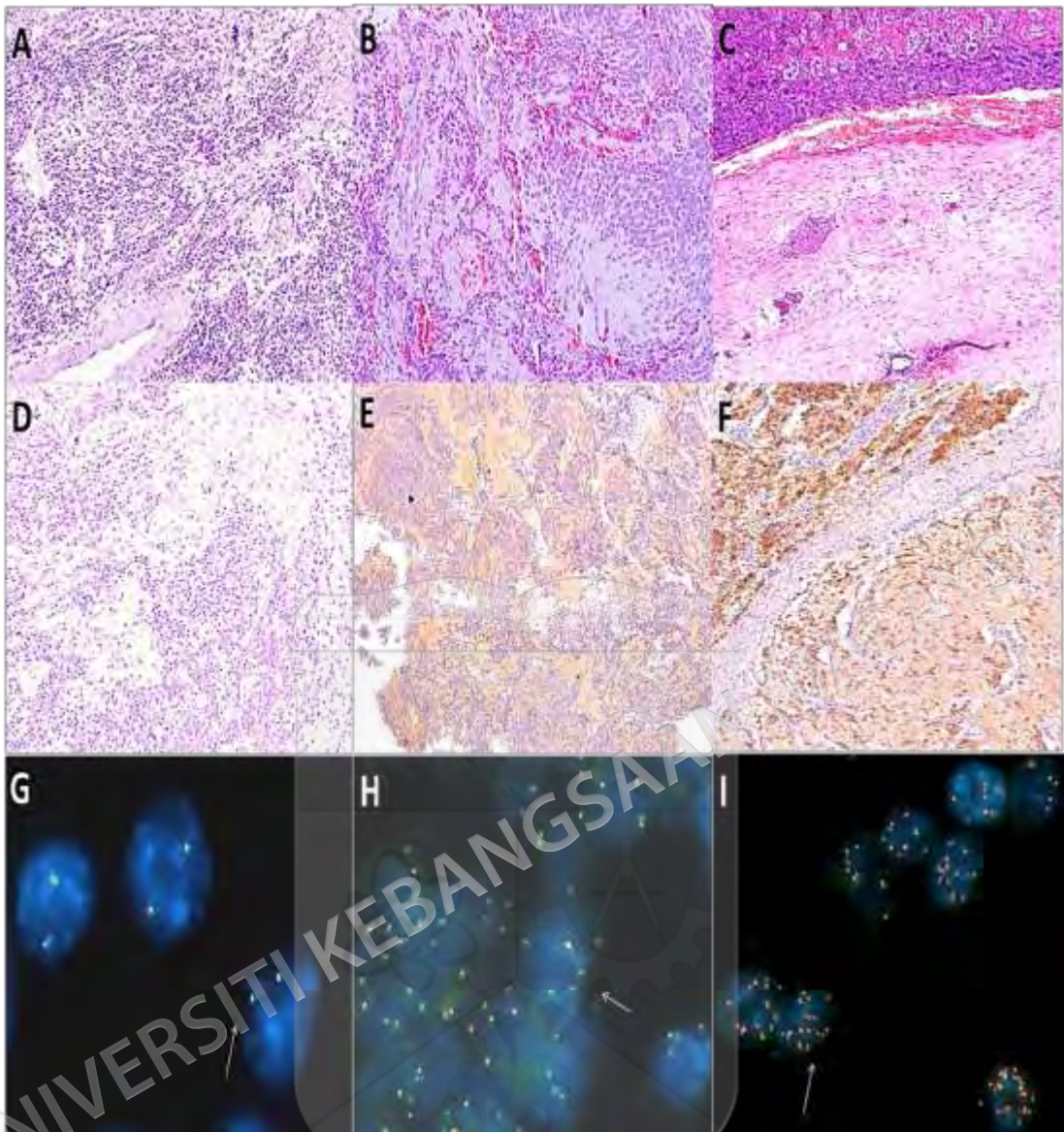
4.4 KORELASI DI ANTARA ALTERASI GENETIK ALK DAN PENGEKSPRESAN PROTEIN ALK

Aberasi gen ALK dapat diperhatikan dalam rajah 4.1, terdapat sejumlah 22 daripada 47 sampel (46.8%), dengan amplifikasi sebanyak (2.1%), perubahan salinan gen (44.7%) dan tiada apa-apa perubahan ALK (normal) dalam 25 (53.2%) yang lain. Kes

amplifikasi solitari ALK menunjukkan bilangan isyarat ALK sebanyak 11-26 isyarat di dalam setiap sel neuroblastoma, yang mana kes-kes perubahan salinan gen ALK menunjukkan bilangan isyarat di antara 3-6 signal secara purata. Tambahan lagi, pengekspresan protin ALK dapat diperhatikan dalam hanya 11 kes iaitu sebanyak 23.4% dalam kes neuroblastoma positif.

Keputusan analisa ini menunjukkan bahawa sekiranya isyarat ALK menunjukkan lebih daripada 6 signal dan ke atas pengekspresan protein ALK semakin bertambah manakala sekiranya isyarat ALK menunjukkan kurang daripada 4 isyarat dalam setiap sel neuroblastoma tiada pengekspresan protin ALK ditunjukkan semasa pewarnaan immunohistokimia ($p = 0.044$) dan hanya pewarnaan sel dengan hematoksilin dapat diperhatikan bagi slaid tisu tersebut serta tiada warna perang dapat diperhatikan.





Rajah 4.1 H & E morfologi, ungkapan protein IHC dan nombor salinan gen ALK
 Rajah. 4.1 A-C menunjukkan morfologi neuroblastoma (HE $\times$ 20). D-F menunjukkan ALK IHC corak pewarnaan dalam neuroblastoma (IHC $\times$ 20). D: tiada pewarnaan immunohistokimia boleh melihat pada membran, E pewarnaan perang pada membran ALK manakala F menunjukkan pewarnaan perang yang terang membran. G-I menunjukkan bilangan alterasi gen ALK FISH dalam neuroblastoma (FISH $\times$ 100). G: bilangan salinan normal, sel dengan 2 ALK isyarat / CEP2. H: Penambahan bilangan salinan ALK dengan setiap sel dengan purata antara 3-9 isyarat ALK / CEP2. I: amplifikasi gen ALK dengan purata sel-sel 11-26 isyara

Kajian ini mendapati terdapat hubungan yang signifikan antara pdngekspresan protin ALK dan alterasi genetik ALK ($p = 0.044$) yang mana protin ALK yang diekspreskan juga berkorelasi dengan neuroblastoma berisiko rendah (peringkat I, II dan IV) ($p = 0.017$). Walau bagaimanapun, tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi ALK dengan umur pada diagnosis ($p = 0.529$), jantina ($p = 0.560$),

subtaip histologi ($p = 0.573$) dan indeks mitosis-karyorexis (MKI) ($p = 0.137$) Perubahan genetik ALK dengan usia diagnosis ($p = 0.513$), jantina ($p = 0.638$), subtaip histologi ($p = 0.849$) dan mitosis karyorhexis index (MKI) ($p = 0.370$).

Dalam kajian ini, perubahan bilangan salinan gen ALK adalah lebih kerap ditemui dalam neuroblastoma primer di kalangan pesakit di Malaysia. Di samping itu, jangkaan pengekspresan terlampau ALK dan perubahan genetik ALK mempunyai peranan prognostik yang baik dalam penskalaan neuroblastoma berisiko rendah (peringkat I, II dan IV). Neuroblastoma boleh dibahagikan kepada tiga jenis subtaip; tidak berdiferensiasi, neuroblastoma yang berdiferensiasi lemah dan neuroblastoma yang berdiferensiasi. Ekspresi protein ALK yang positif didapati 11 daripada 50, dengan 4.0% ($n = 2$) tidak berdiferensiasi, 16.0% ($n = 8$) dengan berdiferensiasi lemah dan 2.0% ($n = 1$) dalam neuroblastoma yang berdiferensiasi, dengan 39 daripada 50 semuanya negatif. Tidak ada nilai signifikan yang diperhatikan dalam MKI dan subtaip, $p > 0.05$ ($p = 0.573$).

Kesimpulannya, pemboleh ubah lain seperti umur, subtaip, jantina, MKI tidak menjadi faktor prognostik yang signifikan dalam kajian kami. Tambahan lagi, tiada korelasi yang signifikan di antara alterasi ALK dalam kalangan pesakit lelaki atau perempuan. Walau bagaimanapun, terdapat nilai p yang signifikan untuk perubahan ALK dan peringkat ($p = 0.002$). Kajian ini juga mendapati perubahan gen ALK lebih banyak dikesan pada pesakit neuroblastoma tahap I, II dan IV. Manakala pertambahan nombor salinan gen ALK adalah sebanyak 44.2% dan amplifikasi sebanyak 2.3% berbanding peringkat III dan IV. Sebanyak 2.3% pertambahan salinan gen dikesan manakala tiada amplifikasi dikesan pada tahap yang lebih tinggi yang disebabkan oleh perubahan gen ALK pada pesakit.

Merujuk kepada Jadual 4.3 kami mendapati terdapat 33 kes neuroblastoma menggalakkan (favourable) seperti tahap I, II dan IVs manakala 13 kes neuroblastoma kurang menggalakkan (non-favourable) seperti tahap III dan IV dalam hasil kajian penghibridan in situ berfluoresen (FISH). Selain itu, kami telah mendapati terdapat pengekspresan ALK melampau iaitu nilai ($p < 0.05$) $p = 0.002$ di dalam neuroblastoma agresif tahap III dan IV. Hal ini menunjukkan dalam populasi Malaysia,

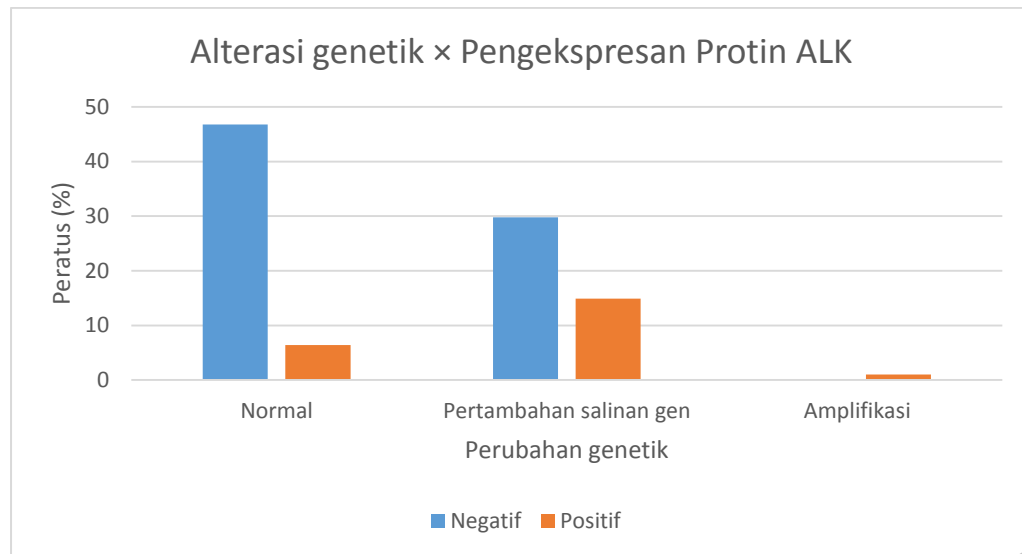
pengekspresan gen ALK adalah kurang agresif dan boleh digunakan sebagai kaedah stratifikasi untuk mengesan neuroblastoma kurang agresif. Positif pengekspresan protein ALK telah dapat dikesan dalam 5 dari 32 (10.0%) MKI yang rendah manakala 6 dari 18 (12.0%) daripada MKI tinggi. Namun demikian, tiada nilai signifikan yang dapat diperhatikan kerana nilai $p=0.147$.

Jadual 4.4 Pengekspresan protein ALK dan perubahan gen

Alterasi genetik	Pemboleh ubah		Nilai Signifikan Asimptotik	df	Nilai <i>p</i>
	Pewarnaan				
	Negatif	Positif			
Normal	46.8%	6.4 ^o %	6.241 ^a	2	0.044
Pertambahan salinan gen	29.8%	14.9%			
Amplifikasi	0.0%	2.1%			

Jadual 4.4 menunjukkan pengekspresan protein ALK dan perubahan gen. Berdasarkan hasil kajian kami, kami telah menemui sedikit korelasi dengan hasil SPSS di antara perubahan genetik dan hasil keputusan penghibridan *in situ* berfluoresen. Ini mungkin disebabkan oleh kohort yang lebih besar yang perlu dilakukan untuk mengesahkan lebih lanjut mengenai korelasi ini. Walau bagaimanapun, kerana frekuensi neuroblastoma di Malaysia sangat rendah. Pengumpulan sampel yang lebih besar perlu dilakukan untuk pengesahan korelasi.

Kami juga mendapati nilai korelasi yang signifikan antara kes positif ALK dengan alterasi gen ALK, serta hasil prognostik yang kurang menggalakkan dalam pesakit neuroblastoma oleh analisis survival Kaplan-Meier diantara pengekspresan protein ALK dengan alterasi gen ALK ($p = 0.044$) seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 4.4. Manakala Rajah 4.2 menunjukkan peratusan dalam carta grafik bagi peratusan protein ALK dan alterasi genetik.



Rajah 4.2 Korelasi protin ALK dan alterasi genetik ALK

Penemuan kajian kami menunjukkan terdapat nilai konsisten antara pengekspresan gen ALK dengan perubahan genetik. Walau bagaimanapun, perubahan bilangan salinan gen boleh dibahagikan kepada pertambahan gen ALK dan atau pertambahan bilangan sentromer. Namun demikian, Duijkers et al. (2012) juga mendapati bahawa pengekspresan protin ALK tinggi memberikan kelangsungan hidup yang lebih rendah dalam neuroblastoma. Walau bagaimanapun, Osajima-Hakomori et al. (2005) melaporkan percanggahan bahawa tiada hubungan yang signifikan antara ekspresi dan prognosis ALK. Kontroversi mengenai korelasi antara ekspresi protin ALK dan hasil klinikal dalam neuroblastoma mungkin disebabkan oleh sampel pesakit yang berbeza dan keadaan demografi pesakit di negara lain perlu dipelajari selanjutnya. Perbezaan mengenai pengekspresan protin ALK tinggi memberikan kelangsungan hidup yang lebih rendah dalam neuroblastoma mungkin disebabkan oleh lokasi ALK terletak di antara kekerapan kawasan kehilangan heterozigositi (LOH) seperti yang disebut oleh Wang et al, 2011.

Oleh disebabkan ini juga, beberapa slaid menunjukkan pewarnaan positif kerana pertambahan bilangan sentromer turut mencetuskan pengekspresan gen ALK. Namun hal ini perlu dikaji selanjutnya bagi membuktikan pertikaian ini. Kajian kultur sel in vitro menggunakan sel sel neuroblastoma SSY5 adalah contoh yang sesuai sebagai kajian model penyakit ini.

BAB V

PERBINCANGAN

5.1 DATA KLINIKOPATOLOGIKAL

Dalam kajian ini, kami menganalisis pengepresan protein ALK dengan menggunakan teknik imunohistokimia serta teknik penghibridan in situ berfluoresen (FISH) serta prognostiknya ke atas 50 kes pesakit neuroblastoma di Malaysia. Kami mendapati pesakit dengan tahap neuroblastoma yang lebih rendah mempunyai prognosis yang jauh lebih baik berbanding pesakit neuroblastoma dengan tahap lebih tinggi. Tambahan pula, terdapat nilai korelasi antara pewarnaan imunohistokimia ALK dan perubahan genetik dengan menggunakan kaedah FISH. Melalui penyelidikan yang telah dijalankan, data yang kami telah kumpulkan menunjukkan bahawa di dalam 50 kes neuroblastoma, terdapat sejumlah 26 pesakit lelaki dan 24 pesakit wanita. Umur min adalah sekitar 36 bulan. Hasilnya menunjukkan bahawa terdapat nisbah lelaki yang lebih dominan dalam populasi neuroblastoma dengan nisbah lelaki kepada perempuan (1.08:1).

Kami juga mengikuti Sistem Pengredan Neuroblastoma Antarabangsa (INSS) dan mengkategorikan kes-kes ke peringkat rendah (I, II dan IV) dan peringkat tinggi (III dan IV). Untuk neuroblastoma peringkat rendah terdapat 33 kes yang dikenal pasti dengan kebanyakannya terdiri daripada peringkat I dan IV. Peringkat tinggi terdiri dari 13 kes. Terdapat 4 kes yang tidak dapat dikenalpasti kerana kekurangan data dalam rekod pesakit yang sebahagian besarnya berasal dari kes rujukan dari hospital luar. Terdapat juga tiga jenis subtaip neuroblastoma utama yang tiada d (n = 5), kurang pembezaan (n = 38) dan membezakan neuroblastoma (n = 4).

Lokasi tumor yang berlaku pada pesakit neuroblastoma sering dikenalpasti berlaku di dalam retroperitonium ($n = 21$), benjolan abdominal / benjolan hipokondrial / benjolan torasik ($n = 14$), Nodus limfa ($n = 3$) dan sejumlah 12 kes lagi tidak dapat dikenal pasti atau tidak dinyatakan secara jelas dalam rekod.

Kebanyakan kes neuroblastoma mempunyai kecenderungan berasal dari kawasan adrenal dan akan bermetastasis ke bahagian tubuh yang lain termasuk metastasis ke tulang. Tambahan juga, kebanyakan neuroblastoma peringkat tinggi mempunyai kecenderungan yang berasal dari adrenal dan perut (bukan adrenal) mengikut Jadual 1.3.

Menurut Passoni et al, 2009, tahap ALK yang tinggi dideskripsikan dalam pesakit neuroblastoma yang berlanjutan dan metastatik. Dalam sampel positif, lokalisasi ALK memaparkan corak membran / sitoplasmik. Pewarnaan diperhatikan secara eksklusif dalam sel tumor, manakala sel stromal Schwannian dan infiltrasi limfoid yang diuji secara konsisten menunjukkan pewarnaan negatif. Walau bagaimanapun dalam kajian kami, kami mendapati bahawa ALK lebih banyak diekspres dalam tahap rendah I, II dan IVS berbanding tahap yang lebih tinggi.

Analisis imunohistokimia kami yang dijalankan pada kohort pesakit menunjukkan perbezaan besar terutama dalam ekspresi ALK antara peringkat I, II dan IVs dengan peringkat III, IV pesakit neuroblastoma. Secara umumnya, tumor pada peringkat awal dan tidak agresif (tahap I, II dan IVs) mempunyai tahap pengekspresan ALK yang rendah. Sebaliknya, lebih banyak pengekspresan ALK terlampau pada tumor agresif dan metastatik (peringkat III dan IV). Walau bagaimanapun, terdapat pengecualian untuk trend ini yang telah diperhatikan. Enam daripada lapan pesakit tahap I, II dan IVs menunjukkan keterlambatan ALK mempunyai kesan prognosis klinikal yang kurang baik, sementara kesemua lima tahap III dan IV pesakit dengan tahap rendah

Neuroblastoma boleh dibahagikan kepada tiga subtaip berbeza. Secara keseluruhannya, protein ALK didapati diekspreskan pada 11 daripada 50 sampel neuroblastoma dengan purata 4.0% ($n=2$) neuroblastoma yang tidak berdiferentiasi,

16.0% (n=8) pada neuroblastoma yang berdiferensiasi lemah dan 2.0% (n=1) pada neuroblastoma yang berdiferensiasi. Analisis data menunjukkan bahawa tiada nilai signifikan dapat diperhatikan pada MKI dan kumpulan subtype $p=0.573$. Dalam kajian ini, tiada perbezaan yang signifikan antara pengekspresan protin ALK dan jantina kerana $p=0.848$ dengan 6 daripada 26 (12%) adalah positif bagi jantina lelaki dan 5 daripada 24 adalah positif bagi jantina perempuan. Sampel positif menunjukkan ALK lebih banyak diekspreskan dalam sel tumor manakal dalam sel schwannian stromal dan limfoid adalah negatif. Dalam kajian kami kami memperhatikan ALK lebih banyak diekspreskan dalam gred yang rendah berbanding gred yang tinggi. Hal ini berbeza dengan data yang dinyatakan daripada penerbitan di barat kerana populasi neuroblastoma di Malaysia berkemungkinan mempunyai struktur genomik yang berbeza daripada populasi neuroblastoma di Barat.

5.2 PENGEKSPRESAN PROTIN ALK

Klon antibodi ALK1 adalah salah satu klon antibodi terawal yang dibangunkan yang pada bertujuan untuk digunakan secara diagnostik dalam mengesan limfoma sel-sel anaplastik ALK yang terubahsuai (Pulford et al, 1997). Kami juga turut menyiasat pengekspresan ALK dalam tumor menggunakan FFPE blok daripada 50 pesakit neuroblastoma dengan ujian imunohistokimia. Pengekspresan ALK dikesan dalam 11 kes (23.4%) daripada keseluruhan kes. Tinjauan ini jauh lebih rendah berbanding dengan kajian sebelumnya oleh Piqueras et al, 2012 dan Passoni et al, 2009 yang mungkin disebabkan oleh kaedah imunohistokimia yang berlainan di makmal seperti kit IHC serta pemilihan antigen dan antibodi yang digunakan.

Kes ini termasuk 33 kes dengan tumor peringkat I, II dan IV (71.7%) dan 13 kes dengan peringkat III dan IV (28.3%). Ekspresi ALK yang positif pada tumor di peringkat I, II dan IV, kami mendapati semua kumpulan pesakit dengan peringkat yang lebih rendah mempamerkan ekspresi ALK yang positif manakala kumpulan metastatik dan yang lebih tinggi menunjukkan ekspresi negatif. Sementara itu, dalam setiap pembezaan histologi untuk pewarnaan positif, kami mendapati 2 kes (18.2%) dengan subjenis yang tiada pembezaan, 8 kes (72.7%) dengan subjenis yang kurang dibezakan dan 1 kes (9.1%) dengan pembezaan subtaip. Dalam semua sampel positif,

ungkapan ALK biasanya dilihat di kedua-dua sitoplasma dan latar belakang fibrillari daripada subtaip neuroblastoma yang tidak berdiferentiasi, neuroblastoma yang berdiferentiasi lemah dan neuroblastoma yang berdiferentiasi.

Selain itu juga, pengekspresan protin ALK positif telah diperhatikan diekspreskan pada 11 daripada 33 sampel gred I, II dan IVs (23.9%) manakala 0 daripada 13 dari gred III dan IV (0.00%) dengan nilai p kurang daripada 0.05 (0.015). Data ini secara tidak langsung menunjukkan pengekspresan protein ALK menunjukkan nilai prognosis yang baik dalam neuroblastoma peringkat gred rendah iaitu I,II dan IVs. Selain itu juga, pengekspresan protin ALK dengan indeks mitosis-karyoheksis (MKI) telah dikenalpasti dalam 5 daripada 32 (10%) dengan nilai MKI rendah dan 6 daripada 18 (12%) daripada MKI tinggi. Namun demikian, tiada nilai yang signifikan dapat diperhatikan kerana nilai $p > 0.05$ (0.147). Hal ini mungkin menunjukkan bahawa pengekspresan protein ALK tidak berkait rapat dengan indeks mitosis-karyoheksis (MKI) seterusnya menunjukkan nilai tidak signifikan.

Penemuan kami juga sejajar dengan kajian yang dilakukan oleh Passoni et al, 2009. Sampel positif ALK juga menunjukkan lebih banyak dinyatakan dalam sel-sel tumor manakala sel stromal shwanian dan limfoid secara konsisten negatif. Dalam kajian kami, kami mendapati bahawa ALK dinyatakan lebih tinggi dalam gred rendah paling peringkat IV daripada gred tinggi. Tahap neuroblastoma yang lebih rendah biasanya mempunyai hasil yang baik berbanding tahap yang lebih tinggi. Walaupun Hasan et al. 2013 menyatakan bahawa pengekspresan ALK melampau menyumbang kepada aktiviti onkogenik, dan menunjukkan bahawa neuroblastoma agresif dan metastatik mempamerkan tahap ekspresi yang lebih tinggi dengan mRNA ALK berbanding dengan neuroblastoma setempat dan neuroblastoma menggalakkan.

Satu kajian mengenai antibodi yang sama digunakan sebagai kajian klon ALK1 kami, positif ALK kami adalah lebih tinggi daripada data yang dilaporkan oleh Yan et al, 2014 yang hanya melaporkan 1/91 sampel (1.098%) yang ternyata positif. Kami juga mengkaji korelasi antara Indeks Mitosis Karyoheksis (MKI) dan pengekspresan protin ALK dan mendapati bahawa status MKI tidak mempengaruhi ekspresi protin ALK.

Satu kajian oleh Yan et al, 2014, rujukan piawaian emas tidak wujud dalam neuroblastoma untuk ALK IHC, kerana mekanisme untuk pengekspresan protein ALK tidak dilihat terlibat dalam aberasi genetik dalam kebanyakan kes. Walau bagaimanapun, menurut Hasan et al, 2013, ungkapan protein ALK telah dilaporkan berkaitan dengan amplifikasi MYCN. Mekanisme ini mungkin disebabkan oleh pengaktifan domain tirosin kinas yang berulang yang disasarkan untuk penambahan nombor salinan serta amplifikasi gen.

Ekspresi protin ALK dapat dilihat dalam 11 kes (23.4%) daripada 47 kes yang sama. Di samping itu, ungkapan protin ALK positif yang dilihat dalam 11 daripada 33 dinyatakan dalam gred sampel I, II dan IV (23.9%), manakala 0 dari 13 kes gred III dan IV (0.00%) dengan p-nilai kurang dari 0.05 ($P = 0.015$). Data ini menunjukkan ungkapan protein ALK menunjukkan prognosis yang baik dalam neuroblastoma dengan tahap gred rendah. Tambahan pula, ungkapan protin-mitotik karyoheksis (MKI) ALK telah dikenal pasti dalam 5 dari 32 (10%) MKI yang rendah dan 6 daripada 18 (12%) MKI yang tinggi. Walau bagaimanapun, tiada nilai penting yang diperhatikan untuk $p > 0.05$ ($P = 0.147$).

Secara keseluruhannya, terdapat 11 daripada 50 kes neuroblastoma dengan purata 4.0% (n=2) neuroblastoma yang tidak berdiferensiasi, 16.0% (n=8) pada neuroblastoma yang berdiferensiasi lemah dan 2.0% (n=1) pada neuroblastoma yang berdiferensiasi mengekspreskan protin ALK. Manakala analisis data menunjukkan bahawa tiada nilai penting untuk dipertimbangkan dalam kumpulan MKI dan subtaip kerana nilai $p > 0.05$ ($P = 0.573$). Dalam kajian ini, tiada perbezaan yang signifikan antara ungkapan protein ALK dan jantina kerana $p = 0.848$ dengan 6 daripada 26 (12%) adalah positif bagi lelaki dan 5 daripada 24 adalah positif bagi wanita.

5.3 ALTERASI GENETIK ALK

Terdapat kajian mengenai ALK dalam neuroblastoma telah dilakukan sejak tahun 2008. Satu kajian genom telah dijalankan untuk mengkaji patogenesis perkembangan tumor kanser pepejal oleh Moose et al 2008, George et al, 2008, Chen et al, 2008 dan Caren et al, 2008.

Kajian terdahulu telah melaporkan bahawa pengaktifan gen ALK dalam neuroblastoma mungkin terjadi kerana perubahan nombor salin dan mutasi spesifik yang mensasarkan domain tirosin kinas dan ALK lokus 2p23.2 telah dikenalpasti sebagai sasaran berulang untuk penambahan nombor salinan dan amplifikasi gen (Moose et al 2008, George et al, 2008, Chen et al, 2008 dan Caren et al, 2008). Dalam kajian kami, pengubahan gen ALK dapat dilihat dalam 22 daripada 47 sampel neuroblastoma (46.8%) dengan amplifikasi sebanyak (2.1%), penambahan salinan gen (44.7%) dan tiada perubahan genomik (bilangan salinan normal = 2) sebanyak 25 kes (53.2%).

Dalam kajian ini, kami menilai perubahan nombor gen ALK oleh penghibridan in situ berfluoresen dan ungkapan protein ALK oleh immunohistokimia dalam 46 neuroblastoma dan menganalisis hubungan mereka dengan hasil data klinikal pesakit. Kami mendapati bahawa pengekspresan protein ALK positif menunjukkan prognosis yang lebih baik dengan Neuroblastoma gred rendah. Neuroblastoma adalah dominan dalam pesakit lelaki berbanding dengan pesakit wanita dengan usia min 36 bulan. Dalam morfologi, Neuroblastoma boleh dikategorikan sebagai tiga subtaip iaitu neuroblastoma yang tidak berdiferentiasi, neuroblastoma yang berdiferentiasi lemah dan neuroblastoma yang berdiferentiasi.

Secara umum, neuroblastoma yang tidak berdiferentiasi biasanya memperlihatkan prognosis yang buruk kepada pesakit neuroblastoma. Dalam kajian kami, terdapat dominasi lelaki dalam kumpulan penyakit neuroblastoma, dengan nisbah lelaki dan perempuan menjadi 1.08 :1 . Menurut Ikeda et al, umur pesakit dan peringkat tumor adalah faktor prognosis penting dalam neuroblastoma (Ikeda et al., 2002).

5.3.1 Amplifikasi

Kami juga mendapati bahawa kes-kes neuroblastoma yang mengandungi amplifikasi ALK adalah sebanyak 2.1% dan ini adalah setanding dengan laporan-laporan sebelumnya (Piqueras et al 2012, Wang et al 2016, Caren et al, 2008). Satu kes amplifikasi ALK dalam kajian kami menunjukkan 11 isyarat kepada 26 isyarat dalam tisu. Kekkerapan isyarat ini jauh lebih rendah berbanding Piqueras et al, 2012 yang telah melaporkan kes amplifikasi yang melebihi 30 isyarat ALK. Selaras dengan kajian terdahulu, kes-kes amplifikasi ALK juga berlaku secara eksklusif dengan tumor yang mempunyai amplifikasi oleh MYCN. Atribut ini adalah disebabkan lokus kromosom yang sama pada 2p ampikon.

Dalam kes neuroblastoma yang mempamerkan isyarat amplifikasi, ia telah diperhatikan bahawa bilangan isyarat diampifikasikan sehingga 4x kali ganda dengan isyarat minima sekitar 18.5. Analisa kes amplifikasi tunggal ALK mendedahkan sebanyak 11 hingga 26 isyarat ALK yang dapat diperhatikan. Ekspresi ALK dalam pewarnaan immunohistokimia juga diperhatikan pada membran dengan bilangan gen ALK yang lebih tinggi dengan pengekspresan warna perang yang lebih terang dan lebih gelap.

5.3.2 Penambahan Bilangan Nombor Salinan Gen ALK

Dalam data kami, kes-kes neuroblastoma dengan penambahan nombor salinan gen ALK juga menunjukkan pertambahan pada lokus sentromerik 2 serta mencadangkan kewujudan poliploidi dalam kes-kes ini. George et al. (2005) mendapati pesakit neuroblastoma dengan hyperpoliploidi memberikan prognosis yang sesuai, yang selaras dengan kajian kami. Oleh itu, klasifikasi status gen ALK sebagai tiga kumpulan oleh FISH boleh memberikan indikasi prognostik yang lebih kuat dalam neuroblastoma.

Dalam kajian kami, penambahan nombor salinan gen boleh didefinisikan dengan bilangan salinan isyarat ALK mempunyai purata min antara isyarat 3-4 per taburan sel. Purata bilangan isyarat ALK dengan penambahan nombor salinan gen ALK dalam kajian kami jauh lebih rendah berbanding dengan laporan oleh Piqueras et

al, 2012 yang melaporkan (3-6) isyarat dan lebih tinggi berbanding dengan Osajima-Hakomori et al, kajian 2005 (1.8-3.0) .

Data kami menunjukkan bahawa frekuensi penambahan nombor salinan gen ALK adalah lebih tinggi dalam neuroblastoma (21/47) yang mencadangkan bahawa penyimpangan perubahan nombor salinan gen ALK adalah peristiwa genetik yang kerap dalam pembangunan neuroblastoma (Subramaniam et al., 2009). Menurut persetujuan dengan kajian terdahulu (Caren et al., 2008), kami juga mendapati bahawa 2.1% (1/47) kes neuroblastoma mengandungi amplifikasi ALK. Oleh itu, kajian menghubungkan amplifikasi ALK terhadap patogenesis neuroblastoma dengan fenotip klinikal masih perlu dijalankan.

5.3.3 Normal

Terdapat juga kes kes yang menunjukkan pengredan normal dalam kedua-dua analisa IHC serta FISH. Dalam sel normal, isyarat ALK yang dapat diperhatikan mempunyai dua isyarat sahaja. Manakala bagi pewarnaan IHC tiada pewarnaan diperhatikan pada tisu. Berdasarkan pemerhatian kami, tiada perbezaan signifikan dalam subtaip neuroblastoma dan pengredan isyarat normal. Oleh itu, adalah selamat untuk menganggap bahawa gen ALK tidak menjejaskan subjenis neuroblastoma. Pemerhatian ini turut disokong dengan analisis chi berganda.

5.4 KORELASI DI ANTARA ALTERASI GENETIK ALK DAN PENGEKSPRESAN PROTIN ALK

Selain itu, aberasi gen ALK juga dapat diperhatikan pada 22 daripada 47 sampel neuroblastoma (46.8%) dengan amplifikasi sebanyak (2.1%), penambahan bilangan salinan gen (44.7%) dan tiada perubahan genomik (bilangan salinan normal=2) sebanyak 25 (53.2%). Antara kes amplifikasi ALK menunjukkan 11 hingga ke 26 signal ALK, manakala dalam kes penambahan nombor salinan pula menunjukkan sebanyak 3-6 isyarat. Pengekspresan protin ALK dapat diperhatikan dalam 11 kes (23.4%) daripada 47 kes yang sama. Hasil kajian ini mendapati, aberasi ALK yang mempamerkan lebih daripada 6 isyarat akan mengekspreskan protein ALK yang lebih

kuat berbanding dengan aberasi ALK yang mempamerkan kurang daripada 4 isyarat ($p=0.44$).

Dalam kajian kami, tumor utama dengan amplifikasi ALK menunjukkan lebih daripada 30 isyarat ALK berbanding dengan laporan terdahulu (Osajima et al, 2005) di mana sel-sel (salinan N30) mendedahkan peningkatan jumlah salinan ALK, berbanding dengan tumor tisu (2 hingga 10 salinan). Ciri-ciri umum yang dilaporkan seperti peningkatan kekerapan amplifikasi ALK dalam saluran sel tumor boleh dikaitkan dengan mekanisme di mana sel-sel dengan nombor salinan ALK yang lebih tinggi menjadi penggerak utama semasa penubuhan sel sel kerana jumlah bilangan pengekspresan yang lebih tinggi. Purata bilangan isyarat ALK dalam kes dengan penambahan nombor salinan (3-6 isyarat) adalah lebih tinggi daripada yang dilaporkan sebelumnya oleh Osajima et al, 2005 iaitu sebanyak (1.8-3.0). Hal ini boleh dikaitkan dengan kemungkinan perbezaan kaedah analisis penambahan salinan nombor yang berlainan.

Keputusan kajian ini mendapati bahawa aberasi ALK yang menunjukkan lebih daripada 6 isyarat menunjukkan pengekspresan protein ALK lebih kuat berbanding dengan aberasi ALK yang mempamerkan kurang daripada 4 isyarat ($p = 0.044$). Kajian kami juga mengesahkan lagi keperluan yang ditentukan oleh nombor salinan ALK nombor salinan kromosom 2 kerana kedudukan yang bersebelahan dengan gen MYCN. Malah, walaupun amplifikasi MYCN telah ditubuhkan sebagai satu biopenanda yang menunjukkan perkembangan tumor neuroblastoma yang agresif. Bagi stratifikasi neuroblastoma yang mempunyai aberasi salinan nombor gen ALK lebih banyak kajian diperingkat molekular perlu dijalankan bagi mengesahkan korelasi ini sebelum digunakan sebagai biopenanda klinikal. Namun, teknik FISH sebagai stratifikasi bilangan salinan dalam pengekspresan protein boleh dilakukan untuk mengesahkan sekiranya pengekspresan ALK IHC terjadi kerana penambahan salinan gen atau penambahan sentromerik.

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 DAPATAN KAJIAN

Kajian ini menunjukkan bahawa ungkapan ALK dan nombor salinan ALK mempunyai persamaan yang ketara. Hasil kajian ini menunjukkan ALK mempunyai hubungan kait dengan prognostik pesakit neuroblastoma pada peringkat rendah. Pengredan klinikal telah menunjukkan prognostik yang baik kepada pesakit dengan tahap yang lebih rendah. Sementara itu bagi subtaip tumor dan pengredan histologi tidak menunjukkan sebarang kaitan penting dengan atau tanpa gen ALK. Penggunaan teknik FISH sebagai stratifikasi bilangan salinan dalam pengekspresan protein boleh dilakukan untuk mengesahkan sekiranya pengekspresan ALK IHC terjadi kerana penambahan salinan gen atau penambahan sentromerik.

6.2 KAJIAN LANJUTAN

Kajian lanjut yang merangkumi penjujukan seluruh neuroblastoma di Malaysia serta kajian in vitro untuk ekspresi garis sel dalam membuktikan gen NMYC memberi kesan kepada ekspresi ALK dalam neuroblastoma memandangkan sekuens locus hanyalah bersebelahan terutamanya dalam memperoleh hasil salinan salinan. Selain itu juga, kajian lanjut berhubung mutasi ALK dalam pesakit neuroblastoma di Malaysia boleh dijalankan. Di samping, kajian in vivo dalam tikus makmal yang dihibridkan dengan alterasi amplifikasi ALK juga boleh dilakukan dengan mengkaji kesan Crizotinib ke atas kanser neuroblastoma.

6.3 BATASAN KAJIAN

Rekod pesakit tidak lengkap adalah batasan terbesar dalam kajian ini. Oleh kerana neuroblastoma adalah penyakit pediatrik yang jarang berlaku di Malaysia, kebanyakan pesakit di Malaysia tidak dilengkapi latar belakang penyakit ini. Oleh itu, peningkatan kes berulang di mana neuroblastoma telah bermetastasis ke bahagian lain di badan menyebabkan peningkatan kes maut yang tidak dapat dikesan. Selain itu, jumlah kes neuroblastoma yang rendah setiap tahun amat mengehadkan jumlah sampel kes bagi kajian ini. Namun demikian, kami masih mendapat dapatan kajian dengan bergantung kes retrospektif yang telah didapati.



RUJUKAN

- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, and JM Maris. 2009. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *British Journal of Cancer*. 100, 1471 – 1482.
- Andrés J.M. Ferreri, Silvia Govi, Stefano A. Pileri, and Kerry J. Savage. 2012. Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 83 : 293–302.
- Andrew M. Davidoff, MD. 2012. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery*. 21 : 2-14.
- Anna M. Azarova, Gargi Gautama, and Rani E. George. 2011. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Seminars in Cancer Biology*. 21: 267– 275.
- Antonella Barreca, Elena Lasorsa, Ludovica Riera, Rodolfo Machiorlatti, and et al. 2011. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *Journal of Molecular Endocrinology* .47: R11–R23.
- Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, A. Galvani, and M. Menichincheri. 2010. Anaplastic Lymphoma Kinase: Role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Letters*. 299: 81–94.
- Bown N. 2001. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol*. 54: 897-910.
- Brodeur GM, Seeger RC and Schwab et al. 1985. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlate with advanced disease stage. *Science*. 224:1121-1124.
- Caren H, Abel F, Kogner P and et al. 2008. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J*. 416:153-159.
- Carlijn van Gaal J, Uta E. Flucke, Melissa H.S. Roeffen, and et al. 2012. Anaplastic Lymphoma Kinase Aberrations in Rhabdomyosarcoma: Clinical and Prognostic Implications, *Journal of Clinical Oncology*. Vol 30 : 3
- Catherine Greenland, Christian Touriol, Greagory Chevillard and et al. 2001. Expression of the oncogenic NPM-ALK chimeric protein in human lymphoid T-cells inhibits drug-induced, but not Fas-induced apoptosis. *Oncogene*. 20:7386-7397.
- Chen Y, Takita J, Choi Y.L, Kato M, Ohira M, Sanada M and et al. 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 55:971–4.

- Cheung N.V and Cohn S.L. 2006. *Pediatric Oncology : Neuroblastoma*. In Berthold F and Simon. Chap 7 Clinical Presentation. pp 65. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Christian C. Lee Yong Jia, Nanxin Li and et al. 2010. Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem. J.* 430: 425–437.
- Christina Schonherr, Kristina Ruuth, Yasuo Yamazaki, and et al. 2011. Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *Biochem. J.* 440: 405–413.
- De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P and et al. 2010. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res.* 16:4353–62.
- De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, and et al. 2002. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol.* 15:159–66.
- Degoutin J, Brunet de Carvalho N, Cifuentes and et al. 2009. ALK expression in DRG neurons and its involvement in neuron Schwann cells interaction. *Eur J Neurosci.* 29:275-286
- EL Carpenter, EA Haglund, EM Mace, D Deng and et al. 2012. Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene.* 31:4859 – 4867
- Enrique Grande1, María-Victoria Bolos and Edurne Arriola. 2011. Targeting Oncogenic ALK: A Promising Strategy for Cancer Treatment. *Mol Cancer Ther.* 10:569-579.
- Ewa Izycka-Swieszewska, Agnieszka Wozniak, Jacek Kot, Wieslawa Grajkowska and et al. 2010. Prognostic significance of HER2 expression in neuroblastic tumors. *Modern Pathology.* 23 :1261–1268.
- Federica Del Grosso, Marilena De Mariano, Lorena Passoni and et al. 2011. Inhibition of N-linked glycosylation impairs ALK phosphorylation and disrupts pro-survival signaling in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer.* 11:525.
- Fischer M, Skowron M, and Berthold F. 2005. Reliable transcript quantification by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary neuroblastoma using normalization to averaged expression levels of the control genes HPRT1 and SDHA. *J Mol Diagn.* 7:89–96.
- Frank Speleman, Katleen De Preter and Jo Vandesompele. 2011. Neuroblastoma genetics and phenotype: A tale of heterogeneity. *Seminars in Cancer Biology.* 21 : 238– 244.
- Frank Westerman and Manfred Schwab. 2002. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Letters.* 184:127–147.

- Gael J. Lonergan, Cornelia M. Schwab, Eric S. Suarez and Christian L. Carlson. 2002. From the Archives of the AFIP Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma, and Ganglioneuroma: Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics*. 22:911–934.
- Garrett M. Brodeur, Alexander A. Green, F. Ann Hayes and et al. 1981. Cytogenetic Features of Human Neuroblastomas and Cell Lines. *Cancer Res*. 41:4678-4686.
- GCC Lim, S Rampal, Y Halimah (Eds). *Cancer Incidence in Peninsular Malaysia, 2003 - 2005*. National Cancer Registry. Kuala Lumpur 2008.
- Gian Paolo Tonini, Akira Nakagawara and Frank Berthold. 2012. Towards a turning point of neuroblastoma therapy. *Cancer Letters*. 326: 128–134.
- Gian Paolo Tonini, Luca Longo, Simona Coco and Patrizia Perri. 2003. Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. *Cancer Letters*. 197:41–45
- Goto S, Umehara S, Gerbing RB and et al. 2001. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors : a report from the Children's Cancer Group. [PubMed Abstract]. *Cancer*. 92(10): 2699-2708.
- Helena Caren, Frida Abel, Per Kogner and Tommy Martinsson, 2008. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem. J*. 416, 153–159.
- Hsiu-Hao Chang and Wen-Ming Hsu. 2010. Neuroblastoma—A Model Disease for Childhood Cancer. *J Formos Med Assoc*. 109(8):555–557.
- <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>
- <http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/319p>
- Human Gene Mutation Database (Bio-base)
- Iwahara T, Fujimoto J, Wen D and et al. 1997. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 14:439-449.
- Janoueix-Lerosey I, G Schleiermacher and O Delattre. 2010 . Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene*. 29 : 1566–1579.
- Johannes H Schulte, Hagen S. Bachmann, Bent Brockmeyer and et al. 2011. High ALK Receptor Tyrosine Kinase Expression Supersedes ALK Mutation as a Determining Factor of an Unfavourable Phenotype in Primary Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 17: 5082-5092.
- John M. Maris and Katherine K. Matthay. 1999. Molecular Biology of Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 17(7):2264-2279.

- John M. Maris, S.M. Kyemba, P.S. White, G.M. Brodeur and et al. 1997. Molecular Genetic Analysis of Familial Neuroblastoma. *European Journal of Cancer*. 33(12) : 1923-1928.
- John M. Maris, Yael P. Mosse, Jonathan P. Bradfield, Cuiping Hou and et al. 2008. Chromosome 6p22 Locus Associated with Clinically Aggressive Neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 358 (24): 2585-2593.
- John M. Maris. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 362:2202-11.
- Justus Duyster, Ren-Yuan Bai and Stephan W Morris. 2001. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene*. 20(40):5623-2637.
- Katrien Swerts, Peter F. Ambros, Chantal Brouzes and et al. 2005. Standardization of the Immunocytochemical Detection of Neuroblastoma Cells in Bone Marrow. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(12): 1433–1440.
- Kubota M, Suita S, Tajiri T and et al. 2000. Analysis of prognostic factors relating to better clinical outcome in ganglioneuroblastoma. [PUBMED Abstract]. *J Pediatr Surg*. 35(1): 92-95.
- Lamant L, Pulford K. Bischof D, Morris S.W and et al. 2000. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *Am. J. Pathol*. 156:1711-1721.
- Looi L.M, Lin H.P, Cherian R. and Sinniah D. 1986. Childhood neuroblastoma in the University Hospital, Kuala Lumpur. *Malaysian J Pathol*. 8:49-56.
- Luca Longo, Gian Paolo Tonini, Isabella Ceccherini and Patrizia Perri. 2005. Oligogenic inheritance in neuroblastoma. *Cancer Letters*. 228:65–69.
- Manfred Schwab, Frank Westermann, Barbara Hero, and Frank Berthold. 2003. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 4: 472–80.
- Manish Mani Subramaniam, Marta Piqueras, Samuel Navarro and Rosa Noguera. 2009. Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas. *Human Pathology*. 40:1638–1642
- Marion C.W. Henry, David B. Tashjian and Christopher K. Breuer. 2004. Neuroblastoma update. *Curr Opin Oncol*. 17:19–23.
- Marta Salido ,Lara Pijuan, Luz Martínez-Avilé's, Ana B. Galva'n and et al. 2011. Increased ALK Gene Copy Number and Amplification are Frequent in Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 6: 21–27.
- McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS and et al. 2008. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Research*. 68(9):3389-95.

- Mi Jung Kwon, Yoon-La Choi, Ki Woong Sung, So Young Kang and et al. 2011. Oncogenic anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutation in neuroblastomas and other pediatric tumors. *Pathology – Research and Practice*. 207 : 634–639.
- Miao Wang, Chunju Zhou, Qinnuan Sun, Rongqin Cai, and et al. 2013. ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. *Experimental and Molecular Pathology*. 95:24–130.
- Miao Wang, Chunju Zhou, Rongqin Cai, Yong Li and Liping Gong. 2013. Copy number gain of MYCN gene is a recurrent genetic aberration and favorable prognostic factor in Chinese pediatric neuroblastoma patients. *Diagnostic Pathology*. 8(5):1-6.
- Ministry of Health Malaysia. 2007. National Cancer Registry Report.
- Miettinen, M. 2003. Neuroblastoma. Miettinen, M. (pnyt) *Nerve sheath tumors. In Diagnostic Soft Tissue Pathology*, pg. 440–460. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA
- Molenaar JJ, Van Sluis P, Boon K and et al. 2003. Rearrangements and increased expression of cyclin D1 in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 36:242-249.
- Mosse et al. 2004. Germline PHOX2B mutation on hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 75:727-730.
- Mossé Yael P, Andrew Wood and John M. Maris. 2009. Inhibition of ALK Signaling for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 15:5609-5614.
- Mosse YP, Laudenslager M, Longo L and et al. 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 455:930-935.
- Nadine Van Roy, Katleen De Preter, Jasmien Hoebeeck, Tom Van Maerken and et al. 2009. The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Medicine*. 1:74.
- Nai-Kong V. Cheung, Jinghui Zhang, Charles Lu, Matthew Parker, and et al. 2012. Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients with Neuroblastoma. *JAMA*. 307(10): 1062–1071.
- Ng Sze Mag, Wan Ariffin Abdullah, Lin Hai Peng and Chan Lee Lee. 1999. Presenting features and treatment outcome of 78 Malaysian Children with Neuroblastoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 30(1):149-153.
- Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, Hero B, Kahlert Y, Spitz R and et al. 2006. Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol*. 24:5070–5078.

- Olaf Merkel, Frank Hamacher, Eveline Sifft, Lukas Kenner, and Richard Greil. 2011. Novel Therapeutic Options in Anaplastic Large Cell Lymphoma: Molecular Targets and Immunological Tools. *Mol Cancer Ther.* 10(7):1127-1136.
- Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M and et al. 2005. Biologic role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 167:213-222.
- Ozkan Bagci, Sait Tumer, Nur Olgun and Oguz Altungoz. 2012 .Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Letters.* 317 : 72–77.
- Passoni L, Longo L, Collini P and et al. 2009. Mutation independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis in neuroblastoma patients . *Cancer Research.* 69:7338-7346
- Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J. 2003. RT PrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 31:122–3.
- Peuchmaur M, D' Amore ES, Joshi VV and et al. 2003. Revision of International Neuroblastoma Pathology Classification; confirmation of favourable and unfavourable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular [PUBMED Abstract]. *Cancer.* 98 (10): 2274-81
- Prasad Mathew, Marcus B. Valentine, Laura C Bowman, Susan T. Rowe and et al. 2001. Detection of MYCN gene amplification in Neuroblastoma by Fluorescence In Situ Hybridization: A Pediatric Oncology Group Study. *Neoplasia.* 3(2): 105-109.
- Ran Yu, Gang Chen, Chunju Zhou, Zifen Gao and et al. 2012. Extra copies of ALK gene locus is a recurrent genetic aberration and favorable prognostic factor in both ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Leukemia Research.* 36: 1141– 1146.
- Robert Roskoski Jr. 2013. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation and pharmacological inhibition. *Pharmacological Research.* 68:68-94
- Ruth H. Palmer, Emma Vernersson, Caroline Grabbe And Bengt Hallberg. 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem. J.* 420:345–361.
- Ruth H. Palmer, Kristina Ruuth, Yasuo Yamazaki and et al. 2011. Activating ALK mutations found in neuroblastoma are inhibited by Crizotinib and NVP-TAE684. *Biochem. J.* 440:405–413.
- Sandberg A. A. and Stone J. F. 2008. The Genetics and Molecular Biology of Neural Tumor. Dlm Chapter 7, Neuroblastoma and Related Tumors. hlmn 233-234. Humana Press, Totowa, NJ.
- Scott C. Bresler Andrew C. Wood, Elizabeth A. Haglund, Joshua Courtright, Lili T. Belcastro, Jefferson S. Plegaria, Kristina Cole, Yana Toporovskaya, Huaqing

- Zhao, Erica L. Carpenter, James G. Christensen, John M. Maris, Mark A. Lemmon, Yaël P. Mossé. 2011. Differential Inhibitor Sensitivity of Anaplastic Lymphoma Kinase Variants Found in Neuroblastoma. *Sci Transl Med* 3. 108ra114. 1-10
- Shizhen Zhu,, Jeong-Soo Lee, Feng Guo, Jimann Shin, Antonio R. Perez-Atayde, Jeffery L. Kutok, Scott J. Rodig, Donna S. Neuberg, Daniel Helman, Hui Feng, Rodney A. Stewart, Wenchao Wang, Rani E. George, John P. Kanki, and A. Thomas Look, 2012. Activated ALK Collaborates with MYCN in Neuroblastoma Pathogenesis. *Cancer Cell*. 21(3): 362–373
- Shukla Neerav, Nabahet Ameer, Ismail Yilmaz and et al. 2011. Oncogene Mutation Profiling of Pediatric Solid Tumors Reveal Significant Subsets of Embryonal Rhabdomyosarcoma and Neuroblastoma with Mutated Genes in Growth Signaling Pathway. *Clin Cancer Res*. 18:748-757.
- Stephan W. Morris, Mark N. Kirstein, Marcus B. Valentine, Kristopher G. Dittmer, David N. Shapiro, David L. Saltman, A. Thomas Look. 1994. Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Science*. 6 : 1281-1284.
- Taemi Ogura, Eiso Hiyama, Naomi Kamei, Arata Kamimatsuse, Yuka Ueda and Kaoru Ogura. 2012. Clinical feature of anaplastic lymphoma kinase-mutated neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*. 47: 1789–1796.
- Takaaki Sasaki, Katsuhiro Okuda, Wei Zheng and et al. 2010. The Neuroblastoma-Associated F1174L ALK Mutation Causes Resistance to an ALK Kinase Inhibitor in ALK-Translocated Cancers. *Cancer Res*. 70:10038-10043.
- Tatsuro Tajiri, Kumiko Shono, Yoshimitsu Fujii, Shinichi Noguchi and et al. 1999. Highly Sensitive Analysis For N-myc Amplification in Neuroblastoma Based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal of Pediatric Surgery*. 34(11):1615-1619.
- Thiele CJ. 1998. *Neuroblastoma*: In (Ed.) Masters, J. Human Cell Culture. Lancaster, UK: Vol 1, p 21-53. Kluwer Academic Publishers
- Thomas F. Deuel. 2013. Anaplastic lymphoma kinase: “Ligand Independent Activation” mediated by the PTN/RPTPβ/ζ signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834: 2219–2223.
- (Chapter 4, Basic FISH Techniques and Troubleshooting Sue Van Stedum and Walter King, page 51-52. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications Edited by YS Fan © Humana Press Inc., Totowa, NJ).
- Weihua Wan, Mark S. Albom, Lihui Lu, Matthew R. Quail, Nadine C. Becknell, Linda R. Weinberg, Dandu R. Reddy, Beverly P. Holskin, Thelma S. Angeles, Ted L. Underiner, Sheryl L. Meyer, Robert L. Hudkins, Bruce D. Dorsey, Mark A. Ator, Bruce A. Ruggeri, and Mangeng Cheng. 2006. Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of

anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*. Volume 107, Number 4. 1617-1623.

Weiss, S.W., and Goldblum, J.R. 2001. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, Edisi ke-4. Mosby, St. Louis, MO

Xiao-Qiu Li, Md, Masanori Hisaoka, Md, Da-Ren Shi, Md, Xiong-Zeng Zhu, Md, And Hiroshi Hashimoto, Md. 2004. Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase in Soft Tissue Tumors: An Immunohistochemical and Molecular Study of 249 Cases. *HUMAN PATHOLOGY* Vol 35 (6):711-721

Yi-Wei Wang, Pang-Hsien Tu, Kuen-Tyng Lin, Shu-Chen Lin, Jenq-Yuh Ko and Yuh-Shan Jou, 2011. Identification of Oncogenic Point Mutations and Hyperphosphorylation of Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer. *Neoplasia* Vol. 13, No. 8. pp. 704–715

Zainal Ariffin O, , Zainudin Mohd. Ali dan Nor Saleha I T. NCR Report 2006, Ministry of Health, Malaysia. 2007

Zainal Ariffin O, I.T Nor Saleha. NCR Report 2007, Ministry of Health, Malaysia. 2011

Zhihui Liu and Carol J. Thiele, 2012. ALK and MYCN: When Two Oncogenes Are Better than One. *Cancer Cell* 21, March 20. 325-326

LAMPIRAN A**CARTA ALIR TEKNIK HAEMATOKSILIN DAN EOSIN (H&E)**

Hirisan tissu setebal 3-4 μm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca.



Hirisan tissu kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator pada suhu tidak lebih 60°C selama 10 minit



Pewarnaan H&E telah dilakukan di dalam kebuk wasap.



Hirisan tissu diparafinisasi dengan mencelupkan slaid kedalam 2 kali xilena selama 3 minit diikuti dengan alkohol mutlak 2 kali selama 3 minit seterusnya kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 minit.



Slaid kemudiannya dibilas dengan air suling selama 3 minit sebelum dicelupkan kedalam larutan haematoksilin selama 3 minit.



Slaid kemudiannya dilalukan dibawah air mengalir selama 3 minit sebelum dicelupkan kedalam larutan klarifier selama 5 saat.



Slaid kemudiannya dibilas dengan air mengalir selama 3 minit.



Slaid kemudiannya dicelupkan kedalam larutan eosin selama 8 saat.



Slaid kemudiannya direndam kedalam air mengalir sebelum langkah dehidrasi diteruskan.



Slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 30 saat serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 30 saat.



Slaid seterusnya dicelupkan kedalam larutan xilena 1 dan xilena 2 selama satu minit.

Cecair DPX dititiskan keatas slaid sebelum di pasangkan dengan penutup kaca berukuran (22 mm x 22mm).



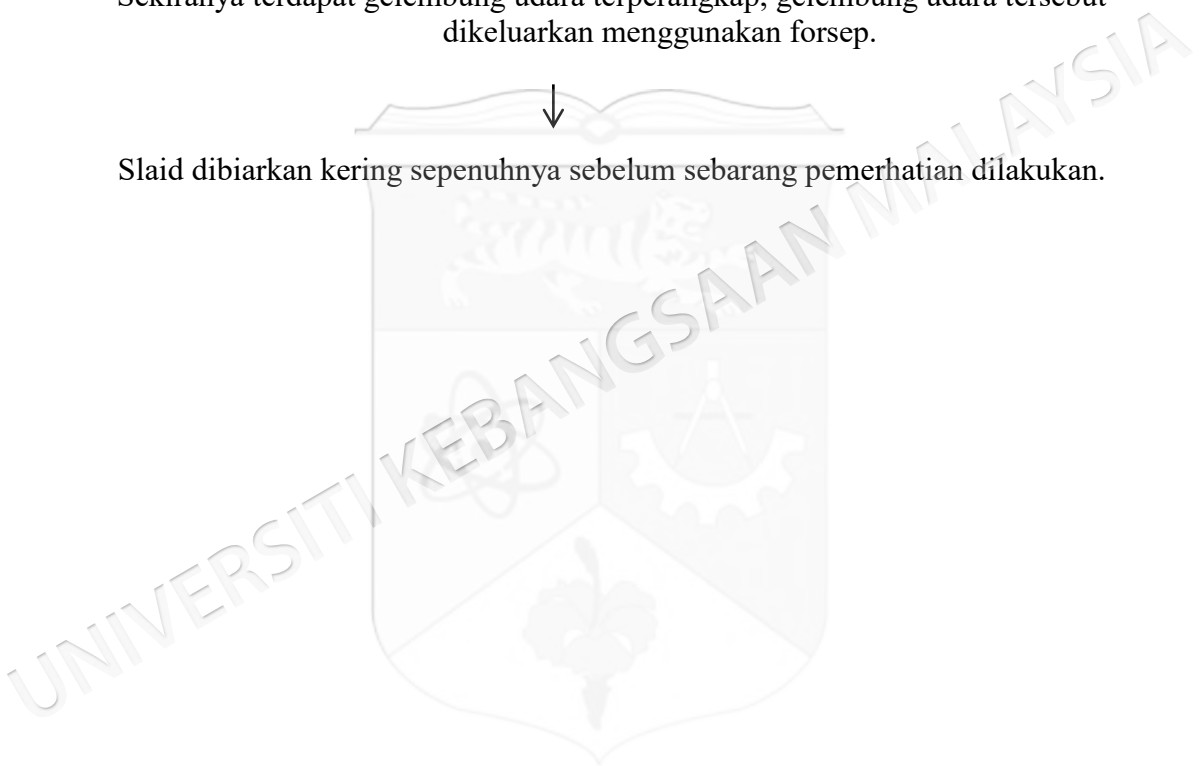
Satu titis DPX telah diletakkan ke atas slaid dan cecair dibiarkan merebak sekata keatas hirisan tisu.



Sekiranya terdapat gelembung udara terperangkap, gelembung udara tersebut dikeluarkan menggunakan forsep.



Slaid dibiarkan kering sepenuhnya sebelum sebarang pemerhatian dilakukan.



LAMPIRAN B**CARTA ALIR TEKNIK IMMUNOHISTOKIMIA (IHC)**

Hirisan tisu setebal 3-4 μm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca poly-Lisina.



Hirisan tisu dilekapkan rata dan sebolehnya tiada kedutan sebaik mungkin untuk mengelakkan impak kepada hasil pewarnaan.



Hirisan tisu yang telah dilekapkan telah dibiarkan kering untuk mengeluarkan lebih air yang terperangkap didalam tisu dan membolehkan lekapan tisu yang sempurna sebelum diteruskan dengan langkah pengeringan didalam ketuhar.



Slaid kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator bersuhu tidak lebih daripada 60°C selama 45- 60 minit.



Slaid kemudiannya diparafinisasi dengan xilena dua kali selama 5 (± 1) minit.



Slaid direndam kedalam larutan alkohol mutlak selama 3 (± 1) dan rehidrasi kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 (± 1) setiap satu.



Slaid kemudiannya direndam kedalam penimbal basuh EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) sebelum disubjekkan kepada heat induced epitope retrieval (HIER).



Jar yang mengandungi EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) yang telah dilarutkan diletakkan kedalam takungan air.



Jar kemudiannya ditutup dengan penutup untuk mengelakkan proses evaporasi berlaku dan menstabilkan suhu.



Takungan air yang mengandungi EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) telah dipanaskan pada suhu 97°C.



Hirisan tisu yang dicelupkan dalam penimbal basuh EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) bersuhu bilik, dicelupkan kedalam EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) pada suhu 97°C dan diinkubasi selama 20(±1) minit dalam takungan air.



Selepas 20 (±1) minit keseluruhan jar dikeluarkan daripada takungan air dan slaid dibiarkan sejuk didalam EnVision FLEX Target Retrieval Solution (50x) selama 20 (±1) minit.



Slaid kemudiannya dibilas dengan larutan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) bersuhu bilik selama 5(±1) minit.



Slide kemudiannya disusun dalam plat sekuenza dan prosedur perwarnaannya diteruskan. Hirisan tisu mestilah dipastikan tidak kering semasa proses pewarnaan dilakukan.



Tisu anaplastik besar limfoma/neuroblastoma positif dengan pengekspresan translokasi t (2;5) telah digunakan sebagai tisu kawalan positif manakala tisu normal nodus limpa/ tisu yang tidak diaram dengan antibodi primer digunakan sebagai kawalan negatif.



Hirisan tisu kemudiannya diinkubasi dengan 200µl dari 3% hidrogen peroksida dalam larutan penimbal fosfat selama 5 (±1) minit dan dibilas dengan penimbal basuhan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit.



Dilusi optimal antibodi primer DAKO Monoclonal Mouse Anti-human CD246, ALK protein, code number M 7195, ialah 1:75 dan masa inkubasi optima disetkan pada 25 minit pada suhu bilik.



Hirisan tisu telah diinkubasi dengan 200µl antibodi primer DAKO Monoclonal Mouse Anti-human CD246, ALK protein yang dilarutkan dalam penimbal diluen antibodi selama 20 minit.



Slaid kemudiannya dibilas dengan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit.



200 µl daripada Envision™ FLEX/HRP (Horseradish peroxidase) telah dipipetkan keatas slaid tisul dan diinkubasi selama 20(±1) minit.



Slaid kemudiannya dibilas dengan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit.



Larutan DAB-substrat telah disediakan dengan menambahkan 1 titis Envision™ FLEX DAB+Chromogen kedalam 1 mL Envision™ FLEX Substrate Buffer.



400 µl daripada larutan DAB-substrat telah dipipetkan ke atas hirisan tisul dan diinkubasi selama 10 minit.



Lebihan larutan DAB-substrat dibilas menggunakan EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) selama 5(±1) minit.



Slaid kemudiannya diwarnakan dengan larutan haematoksilin selama 30 saat (masa pewarnaan haematoksilin adalah bergantung kepada jenis haematoksilin yang digunakan).



Slaid kemudiannya dibilas dibawah air mengalir untuk membuang lebihan haematoksilin diatas tisul.



Setelah pewarnaan selesai, slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 5 (±1) serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 5 (±1).



Rak slaid digoncang dan digerakan secara lembut ke atas ke bawah setiap 30 saat untuk mengeluarkan gelembung air yang mungkin terperangkap semasa proses pembilasan slaid semasa sesi pewarnaan.



Slaid seterusnya dicelupkan kedalam larutan xilena 1 dan xilena 2 selama 5 (± 1) minit. Cecair DPX dititiskan keatas slaid sebelum di pasangkan dengan penutup kaca berukuran (22 mm x 22mm) coverslip.



LAMPIRAN C**CARTA ALIR TEKNIK PENGHIBRIDAN IN SITU BERFLUORESEN (FISH)**

Hirisan tisu setebal 3-4 μm dari blok FFPE telah dipotong dan dilekapkan pada slaid kaca poli-Lisena (slaid poly-L).



Hirisan tisu dilekapkan rata dan sebolehnya tiada kedutan sebaik mungkin untuk mengelakan impak kepada hasil pewarnaan.



Hirisan tisu yang telah dilekapkan telah dibiarkan kering untuk mengeluarkan lebihan air yang terperangkap didalam tisu dan membolehkan lekapan tisu yang sempurna sebelum diteruskan dengan langkah pengeringan didalam ketuhar.



Slaid kemudiannya dikeringkan secara pemanasan didalam inkubator bersuhu tidak lebih daripada 60°C selama 45- 60 minit.



Pen berlian digunakan untuk menanda kawasan terpilih mengikut pemerhatian pakar patologi berpanduan slaid H&E.



Slaid kemudiannya diparafinisasi dengan xilena dua kali selama 5 (± 1) minit.



Slaid direndam kedalam larutan alkohol mutlak selama 3 (± 1) dan rehidrasi kedalam siri alkohol berkonsentrasi menurun 90%, 80% and 70% selama 3 (± 1) setiap satu.



Slide kemudiannya direndam kedalam penimbal basuh Larutan Penimbal Basuh sebelum disubjekkan kepada langkah pra-rawatan.



Jar yang mengandungi larutan pra-rawatan yang telah dilarutkan diletakkan kedalam takungan air.



Jar kemudiannya ditutup dengan penutup untuk mengelakkan proses evaporasi berlaku dan menstabilkan suhu.



Takungan air yang mengandungi jar larutan pra-rawatan telah dipanaskan pada suhu 97°C.



Hirisan tisu yang dicelupkan dalam larutan penimbal basuh bersuhu bilik, dicelupkan kedalam larutan pra-rawatan pada suhu 97°C dan diinkubasi selama 10 ($\pm$ 1) minit dalam takungan air.



Selepas 10 ($\pm$ 1) minit keseluruhan jar dikeluarkan daripada takungan air dan slaid dibiarkan sejuk didalam larutan pra-rawatan selama 15 ($\pm$ 1) minit.



Slaid kemudiannya dibilas dengan larutan pra-rawatan bersuhu bilik yang baru selama 3 ($\pm$ 1) minit.



Langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh yang baru selama 3 ($\pm$ 1) minit.



Hirisan tisu mestilah dipastikan tidak kering semasa proses pewarnaan dilakukan.



Slaid kemudiannya disubjekkan kepada rawatan enzimatik dengan pepsin sedia guna.



Langkah ini dilakukan untuk memecahkan dan memusnahkan komponen ekstraselular matrik dan memudahkan pelepasan prob pada DNA.



Dengan menggunakan tisu linles, kawasan sekitar spesimen telah dilap untuk mengeringkan lebihan larutan penimbal basuh.



Sebanyak 5-8 titis pepsin sejuk telah dititiskan diatas slaid dan dipastikan menutupi keseluruhan kawasan tisu.



Slaid kemudiannya diinkubasi kedalam inkubator bersuhu 37°C selama 3-6 minit.



Masa rawatan enzim optimal adalah bergantung dan berhubung kait dengan jenis tisu, fiksasi tisu, ketebalan spesimen, dan kematangan spesimen.



Setelah langkah rawatan enzimatik selesai, hirisan tisu akan nampak lebih lut cahaya apabila diperhatikan dengan mata kasar.



Lebih pepsin dibuang dan slaid direndam kedalam larutan penimbal basuh selama 3 minit pada suhu bilik.



Langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh baru selama 3 minit.



Slaid tisu kemudiannya dihidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 2 (± 1).



Slaid kemudiannya dibiarkan kering sepenuhnya dalam keadaan tegak selama 10-15 minit.



Setelah slaid kering, 2-5 μ l prob telah dipipetkan ke kawasan yang telah ditandakan menggunakan pen berlian.



Penutup kaca dilekatkan serta merta dan prob dibiarkan merebak secara sekata.



Kemudian, bahagian luar penutup kaca dilekatkan dengan Coverslip Sealant. Pastikan Coverslip Sealant tidak bertindan dengan slaid dan keseluruhan bahagian tepi di litupi secara sempurna.



Slaid kemudiannya diletakkan diatas Hybridizer bersama dengan Humidity Control Strips dan program disetkan 5 minit bagi penyahaslian pada suhu 82°C dan 24 jam hibridisasi pada suhu 45°C.



Pada hari kedua, letakkan Penimbal Basuh Stringen II kedalam takungan air dan panaskan larutan sehingga 65(±2)°C manakala satu lagi jar berisi Penimbal Basuh Stringen I pada suhu bilik di dalam kebuk wasap.



Selesai proses hibridisasi dalam hibridizer, gam sealan dan penutup kaca dikeluarkan secara berhati hati dari slaid dan direndam kedalam larutan penimbal basuh II bersuhu bilik selama 5 minit.



Slaid kemudiannya dicelupkan kedalam penimbal basuh stringen II dalam takungan air.



Slaid kemudiannya diagitasi dalam aksi ke atas ke bawah beberapa kali sebelum dieram selama 10 minutes pada 65(±2)°C dalam takungan air.



Selepas 10 minit, slaid dikeluarkan dari Penimbal basuh Stringen II dan dicelupkan dalam larutan penimbal Basuh baru selama 3 minit pada suhu bilik dan langkah ini diulang dengan menggunakan larutan penimbal basuh baru selama 3 minit.



Slaid kemudiannya didehidrasi dengan mencelupkan slaid kedalam siri larutan alkohol berkonsentrasi meningkat 70%, 80% and 90% selama 2 (±1) serta diikuti dengan dua kali pencelupan dalam alkohol mutlak selama 2 (±1).



Slaid dibiarkan kering selama 10-15 minit didalam kebuk wasap.



Sebanyak 2-5 µl Fluorescence Mounting Medium diletakkan diatas slaid dan dipasangkan dengan penutup kaca.



Media fluorezen mount dibiarkan menutupi hirisan tisu dan sebarang gelembung udara dikeluarkan.



Slaid kemudiannya dilekatkan dengan sealan tetap dan disimpan didalam gelap sebelum analisis dibuat.



Slaid yang telah selesai dihibridasi dengan prob ALK kemudiaanya diimbias dengan menggunakan peralatan mikroskop berfluoresen (Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Tokyo Japan), GSL 120, Automated Cytogenetic Platform akan dianalisa dengan menggunakan perisian Cyto Vision R v7.3.1 Software Leica Biosystem Nussloch Germany. Sekurang-kurangnya 100 sel dikira bagi setiap slaid dan perubahan salinan gen direkodkan.



Kaedah penskoran bagi setiap sel adalah seperti jadual berikut dalam Lampiran D:



LAMPIRAN D
JADUAL PENSKORAN FISH

ID Sample: _____

Data Klinikopatologi

Umur semasa diagnosis	
Jantina	
Bangsa	
Lokasi diagnosis	
Tahap	
Pengredan	

Enumerasi ALK

Sel #	Bilangan Isyarat at Kunitan	Bilangan Isyarat Oren	Bil Isyarat Hijau	Klasifikasi Sel
1				
2				
3				
4				
5				
6				

7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				

33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51				
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				

59				
60				
61				
62				
63				
64				
65				
66				
67				
68				
69				
70				
71				
72				
73				
74				
75				
76				
77				
78				
79				
80				
81				
82				
83				
84				

85				
86				
87				
88				
89				
90				
91				
92				
93				
94				
95				
96				
97				
98				
99				
100				

Analisis FISH

1) Jumlah keseluruhan sel analisis : _____

2) Jumlah sel diklasifikasikan negatif : _____ [%]

3) Jumlah sel diklasifikasikan positif : _____ [%]

4) Status FISH

Sel nuklei negatif		Sel nuklei positif	
$n < 2$ (hilang)	$n = 2$ (normal)	$2 > n < 10$ (penambahan bilangan salinan gen)	$n \geq 1$ (amplifikasi)



LAMPIRAN E

DATA SPSS

ALK neuroblastoma SPSS analysis

IHC * FISH

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * FISH	47	94.0%	3	6.0%	50	100.0%

IHC * FISH Crosstabulation

IHC * FISH Crosstabulation						
			FISH			Total
			Normal	Gain	Amplified	
IHC	Negative	Count	22	14	0	36
		% within IHC	61.1%	38.9%	0.0%	100.0%
		% within FISH	88.0%	66.7%	0.0%	76.6%
		% of Total	46.8%	29.8%	0.0%	76.6%
	Positive	Count	3	7	1	11
		% within IHC	27.3%	63.6%	9.1%	100.0%
		% within FISH	12.0%	33.3%	100.0%	23.4%
		% of Total	6.4%	14.9%	2.1%	23.4%
Total		Count	25	21	1	47
		% within IHC	53.2%	44.7%	2.1%	100.0%
		% within FISH	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	53.2%	44.7%	2.1%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.241 ^a	2	.044
Likelihood Ratio	6.067	2	.048
Linear-by-Linear Association	5.197	1	.023
N of Valid Cases	47		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .23.

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standardized Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	.364			.044
	Cramer's V	.364			.044
Interval by Interval	Pearson's R	.336	.139	2.394	.021 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.314	.138	2.221	.031 ^c
N of Valid Cases		47			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

IHC * AGE

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * AGE	50	100.0%	0	0.0%	50	100.0%

IHC * AGE Crosstabulation

			AGE		Total
			<18 months	>18 months	
IHC	Negative	Count	16	23	39
		% within IHC	41.0%	59.0%	100.0%
		% within AGE	76.2%	79.3%	78.0%
		% of Total	32.0%	46.0%	78.0%
	Positive	Count	5	6	11
		% within IHC	45.5%	54.5%	100.0%
		% within AGE	23.8%	20.7%	22.0%
		% of Total	10.0%	12.0%	22.0%
Total		Count	21	29	50
		% within IHC	42.0%	58.0%	100.0%
		% within AGE	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	42.0%	58.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	.069 ^a	1	.793		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.069	1	.793		
Fisher's Exact Test				1.000	.529
Linear-by-Linear Association	.068	1	.795		
N of Valid Cases	50				
a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.62.					
b. Computed only for a 2x2 table					

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standardized Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	-.037			.793
	Cramer's V	.037			.793
Interval by Interval	Pearson's R	-.037	.142	-.258	.798 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-.037	.142	-.258	.798 ^c
N of Valid Cases		50			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

IHC * GENDER

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * GENDER	50	100.0%	0	0.0%	50	100.0%

IHC * GENDER Crosstabulation

			GENDER		Total
			Male	Female	
IHC	Negative	Count	20	19	39
		% within IHC	51.3%	48.7%	100.0%
		% within GENDER	76.9%	79.2%	78.0%
		% of Total	40.0%	38.0%	78.0%
	Positive	Count	6	5	11
		% within IHC	54.5%	45.5%	100.0%
		% within GENDER	23.1%	20.8%	22.0%
		% of Total	12.0%	10.0%	22.0%
Total		Count	26	24	50
		% within IHC	52.0%	48.0%	100.0%
		% within GENDER	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	52.0%	48.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	.037 ^a	1	.848	1.000	.560
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.037	1	.848		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	.036	1	.850		
N of Valid Cases	50				

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.28.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	-.027			.848
	Cramer's V	.027			.848
Interval by Interval	Pearson's R	-.027	.141	-.188	.852 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-.027	.141	-.188	.852 ^c
N of Valid Cases		50			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

IHC * SUBTYPE

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * SUBTYPE	50	100.0%	0	0.0%	50	100.0%

IHC * SUBTYPE Crosstabulation						
			SUBTYPE			Total
			Undifferentiated	Poorly differen tiated	Differentiating	
IHC	Negative	Count	3	33	3	39
		% within IHC	7.7%	84.6%	7.7%	100.0%
		% within SUBTYPE	60.0%	80.5%	75.0%	78.0%
		% of Total	6.0%	66.0%	6.0%	78.0%
	Positive	Count	2	8	1	11
		% within IHC	18.2%	72.7%	9.1%	100.0%
		% within SUBTYPE	40.0%	19.5%	25.0%	22.0%
		% of Total	4.0%	16.0%	2.0%	22.0%
Total		Count	5	41	4	50
		% within IHC	10.0%	82.0%	8.0%	100.0%
		% within SUBTYPE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	10.0%	82.0%	8.0%	100.0%

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.113 ^a	2	.573
Likelihood Ratio	.990	2	.610
Linear-by-Linear Association	.387	1	.534
N of Valid Cases	50		
a. 4 cells (66.7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .88.			

		Symmetric Measures			
		Value	Asymptotic Standardized Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	.149			.573
	Cramer's V	.149			.573
Interval by Interval	Pearson's R	-.089	.162	-.618	.539 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-.090	.163	-.626	.534 ^c
N of Valid Cases		50			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

IHC * MKI

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * MKI	50	100.0%	0	0.0%	50	100.0%

IHC * MKI Crosstabulation					
			MKI		Total
			Low	High	
IHC	Negative	Count	27	12	39
		% within IHC	69.2%	30.8%	100.0%
		% within MKI	84.4%	66.7%	78.0%
		% of Total	54.0%	24.0%	78.0%
	Positive	Count	5	6	11
		% within IHC	45.5%	54.5%	100.0%
		% within MKI	15.6%	33.3%	22.0%
		% of Total	10.0%	12.0%	22.0%
Total		Count	32	18	50
		% within IHC	64.0%	36.0%	100.0%
		% within MKI	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	64.0%	36.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	2.105 ^a	1	.147	.172	.137
Continuity Correction ^b	1.200	1	.273		
Likelihood Ratio	2.039	1	.153		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	2.063	1	.151		
N of Valid Cases	50				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.96.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	.205			.147
	Cramer's V	.205			.147
Interval by Interval	Pearson's R	.205	.145	1.453	.153 ^c
	Spearman Correlation	.205	.145	1.453	.153 ^c
N of Valid Cases		50			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

IHC * STAGE

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
IHC * STAGE	46	92.0%	4	8.0%	50	100.0%

IHC * STAGE Crosstabulation

			STAGE		Total
			I,II, IVs	III, IV	
IHC	Negative	Count	22	13	35
		% within IHC	62.9%	37.1%	100.0%
		% within STAGE	66.7%	100.0%	76.1%
		% of Total	47.8%	28.3%	76.1%
	Positive	Count	11	0	11
		% within IHC	100.0%	0.0%	100.0%
		% within STAGE	33.3%	0.0%	23.9%
		% of Total	23.9%	0.0%	23.9%
Total	Count		33	13	46
	% within IHC		71.7%	28.3%	100.0%
	% within STAGE		100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total		71.7%	28.3%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	5.695 ^a	1	.017	.020	.015
Continuity Correction ^b	4.011	1	.045		
Likelihood Ratio	8.597	1	.003		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	5.571	1	.018		
N of Valid Cases	46				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.11.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Nominal by Nominal	Phi	-.352			.017
	Cramer's V	.352			.017
Interval by Interval	Pearson's R	-.352	.067	-2.493	.016 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	-.352	.067	-2.493	.016 ^c
N of Valid Cases		46			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Supporting Information (Tables S1-S4)

Table S1. Correlation between ALK FISH and gender (n=50).

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
FISH * GENDER	47	94.0%	3	6.0%	50	100.0%

FISH * GENDER Crosstabulation

			GENDER		Total
			Male	emale	
FISH	Normal	Count	13	12	25
		% within FISH	52.0%	48.0%	100.0%
		% within GENDER	52.0%	54.5%	53.2%
		% of Total	27.7%	25.5%	53.2%
	Gain	Count	11	10	21
		% within FISH	52.4%	47.6%	100.0%
		% within GENDER	44.0%	45.5%	44.7%
		% of Total	23.4%	21.3%	44.7%
	Amplified	Count	1	0	1
		% within FISH	100.0%	0.0%	100.0%
		% within GENDER	4.0%	0.0%	2.1%
		% of Total	2.1%	0.0%	2.1%
Total		Count	25	22	47
		% within FISH	53.2%	46.8%	100.0%
		% within GENDER	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	53.2%	46.8%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	.900 ^a	2	.638
Likelihood Ratio	1.282	2	.527
Linear-by-Linear Association	.168	1	.682
N of Valid Cases	47		
a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .47.			

Table S2. Correlation between ALK FISH and neuroblastoma staging (n=50).

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ALK * STAGE	43	86.0%	7	14.0%	50	100.0%

ALK * STAGE Crosstabulation					
			STAGE		Total
			I and IVS	and IV	
ALK	Normal	Count	10	12	22
		% within ALK	45.5%	54.5%	100.0%
		% within STAGE	33.3%	92.3%	51.2%
		% of Total	23.3%	27.9%	51.2%
	Gain	Count	19	1	20
		% within ALK	95.0%	5.0%	100.0%
		% within STAGE	63.3%	7.7%	46.5%
		% of Total	44.2%	2.3%	46.5%
	Amplified	Count	1	0	1
		% within ALK	100.0%	0.0%	100.0%
		% within STAGE	3.3%	0.0%	2.3%
		% of Total	2.3%	0.0%	2.3%
Total		Count	30	13	43
		% within ALK	69.8%	30.2%	100.0%
		% within STAGE	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	69.8%	30.2%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	12.636 ^a	2	.002
Likelihood Ratio	14.446	2	.001
Linear-by-Linear Association	11.604	1	.001
N of Valid Cases	43		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .30.

Table S3. Correlation between ALK FISH and histological grading (n=50).

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
FISH * SUBTYPE	47	94.0%	3	6.0%	50	100.0%

FISH * SUBTYPE Crosstabulation						
			SUBTYPE			Total
			Undifferentiated	Differentiated	Indifferentiating	
FISH	Normal	Count	2	20	3	25
		% within FISH	8.0%	80.0%	12.0%	100.0%
		% within SUBTYPE	40.0%	52.6%	75.0%	53.2%
		% of Total	4.3%	42.6%	6.4%	53.2%
	Gain	Count	3	17	1	21
		% within FISH	14.3%	81.0%	4.8%	100.0%
		% within SUBTYPE	60.0%	44.7%	25.0%	44.7%
		% of Total	6.4%	36.2%	2.1%	44.7%
	Amplified	Count	0	1	0	1
		% within FISH	0.0%	100.0%	0.0%	100.0%
		% within SUBTYPE	0.0%	2.6%	0.0%	2.1%
		% of Total	0.0%	2.1%	2.1%	2.1%
Total		Count	5	38	4	47
		% within FISH	10.6%	80.9%	8.5%	100.0%
		% within SUBTYPE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	10.6%	80.9%	8.5%	100.0%

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.370 ^a	4	.849
Likelihood Ratio	1.573	4	.814
Linear-by-Linear Association	.851	1	.356
N of Valid Cases	47		
a. 7 cells (77.8%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .09.			

S4. Correlation between ALK FISH and MKI status (n=50).

Case Processing Summary						
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ALK * MKI	47	94.0%	3	6.0%	50	100.0%

ALK * MKI Crosstabulation					
			MKI		Total
			Low	High	
ALK	Normal	Count	17	8	25
		% within ALK	68.0%	32.0%	100.0%
		% within MKI	56.7%	47.1%	53.2%
		% of Total	36.2%	17.0%	53.2%
	Gain	Count	13	8	21
		% within ALK	61.9%	38.1%	100.0%
		% within MKI	43.3%	47.1%	44.7%
		% of Total	27.7%	17.0%	44.7%
	Amplified	Count	0	1	1
		% within ALK	0.0%	100.0%	100.0%
		% within MKI	0.0%	5.9%	2.1%
		% of Total	0.0%	2.1%	2.1%
Total		Count	30	17	47
		% within ALK	63.8%	36.2%	100.0%
		% within MKI	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	63.8%	36.2%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)
Pearson Chi-Square	1.987 ^a	2	.370
Likelihood Ratio	2.259	2	.323
Linear-by-Linear Association	.871	1	.351
N of Valid Cases	47		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .36.

LAMPIRAN F

ABSTRAK PEMBENTANGAN POSTER

AP10

Expression of Anaplastic Lymphoma Kinase in Neuroblastoma



Atsiah Ruziah¹, Reena B MdZin¹, Sharifah NA¹, Aznim Hani Hamdan¹, Zarina Abdul Latiff¹, Hamidah Alias¹, Armi Talib², Zubaidah Zukhairi³

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia

² Department of Paediatric, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia

³ Department of Pathology, Hospital Kuala Lumpur, Kuala Lumpur

⁴ Institute of Medical Research, Kuala Lumpur

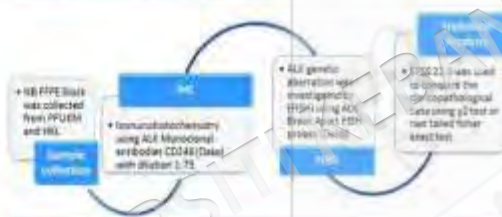
Introduction

- ❖ Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) has been reported to be present in mutated and sporadic cases of neuroblastoma.
- ❖ ALK gene, situated at chromosomal region 2p23.2 has been described as a causative oncogenic driver in neuroblastoma.¹⁻³
- ❖ Studies have also demonstrated ALK as potential therapeutic target for neuroblastoma.⁴

Objectives

The aims of this study are to identify ALK gene expression in Malaysian neuroblastoma patients and to correlate it with various clinicopathological parameters.

Methodology



Results

Table 1 Patient clinicopathological data with ALK positivity

Variables	ALK Protein Expression		Value	df	p value
	Negative	Positive			
Gender					
Male	40.0%	12.0%	0.037*	1	0.848
Female	38.0%	10.0%			
Age (months)					
≤18	32.0%	10.0%	0.069*	1	0.793
>18	48.0%	12.0%			
Stage					
I, II, IVs	47.8%	23.9%	5.695*	1	0.017
III, IV	28.3%	0.0%			
MK status					
Low	34.0%	10.0%	2.105*	1	0.147
High	34.0%	12.0%			
Grading (subtype)					
Undifferentiated	6.0%	4.0%	1.112*	2	0.573
Poorly differentiated	66.0%	16.0%			
Differentiating	6.0%	2.0%			
Genetic Alteration					
Normal	46.8%	6.4%	6.241*	2	0.044
Gain	29.8%	14.9%			
Amplification	0.0%	2.1%			

Acknowledgement: This study was financially supported by grants from the Geran Galangan Penyelidikan Akutik (GGPA-2013-05) and JPP/JMR 2013-062

Corresponding authors: Atsiah Ruziah, Nurul Hani Hamdan, Md Zin

Email: reena@ppu.um.edu.my

Results

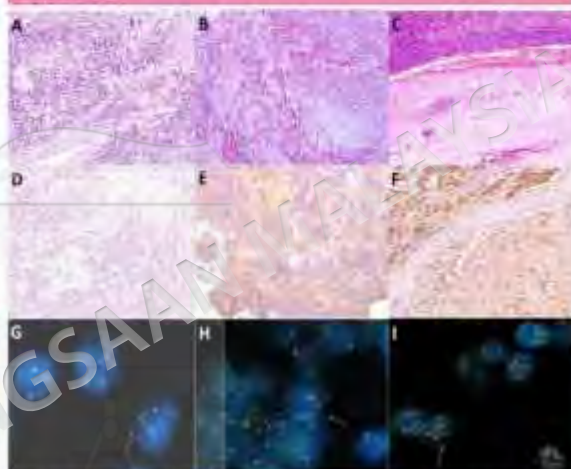


Fig. 1 A-C shows morphology of neuroblastoma (HE×20). D-F shows ALK IHC staining patterns in neuroblastoma (IHC×20). D: no staining can be observe on the membrane, E: light membrane staining of ALK while F shows strong membrane staining. G-I shows ALK FISH copy number change in neuroblastoma (FISH×100). G: normal copy number, cell with 2 ALK/CEP2 signals. H: ALK gene copy number change with cells with 4-9 fused ALK/CEP2 signals. I: ALK gene amplification with cells 11-25 signals.

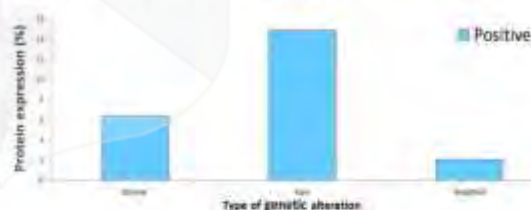


Fig 2. ALK protein expression with ALK gene alteration.

Discussion and Conclusion

- ❖ Significant correlation was seen between ALK protein expression and genetic alteration ($p=0.044$) with higher percentage of ALK expression in ALK gain and amplification.
- ❖ Our findings are in keeping with a previous study which reported an increase of ALK gene in neuroblastoma correlated with a higher protein expression.³
- ❖ ALK protein expression also significantly correlated with low-risk neuroblastoma (stage I, II and IVs) ($p=0.017$) indicating a favorable prognostic role of ALK overexpression in low risk neuroblastoma (stage I, II and IVs).
- ❖ No significant correlation was seen between ALK expression with other clinicopathological data.

References

1. Identification of ALK as a novel tyrosine kinase in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10111-10116 (1998).
2. Identification of ALK as a novel tyrosine kinase in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10111-10116 (1998).
3. Identification of ALK as a novel tyrosine kinase in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10111-10116 (1998).
4. Identification of ALK as a novel tyrosine kinase in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10111-10116 (1998).
5. Identification of ALK as a novel tyrosine kinase in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10111-10116 (1998).

LAMPIRAN G**PENERBITAN****ALK/MYCN Coamplification in Neuroblastoma: A Short Review**

Nur Atiqah Roshidi ¹, Reena R. MdZin¹ and Srijit Das²; Academic Journal of Cancer Research 7 (1): 27-33, 2014

Abstract: Neuroblastoma remains one of devastating childhood cancer that plagues clinical researchers worldwide. Although, key oncogenes have been discovered, the prognostic significance of these remains to be confirms. The discovery of ALK in 2008 has opened new therapeutic area for this childhood cancer. Although ALK amplification only occurs in 1-2% of whole population sample, coamplification of ALK/MYCN in neuroblastoma suggests a correlation between these two genes. This review discusses how coamplification of ALK/MYCN results in oncogeneity in neuroblastoma. In addition, this review also highlights the recent discoveries of ALK/MYCN pathway and how this co-existence may lead to high-risk neuroblastoma and treatment resistance in patients with this genetic alteration.

Key words: Neuroblastoma ALK MYCN Coamplification Oncogeneity

ALK/MYCN Coamplification in Neuroblastoma: A Short Review

¹Nur Atiqah Roshidi, ¹Reena R. MdZin and ²Srijit Das

¹Department of Pathology UKM Medical Centre, Cheras, Kuala Lumpur, 56000, Malaysia

²Department of Anatomy UKM Medical Centre, Cheras, Kuala Lumpur, 56000, Malaysia

Abstract: Neuroblastoma remains one of devastating childhood cancer that plagues clinical researchers worldwide. Although, key oncogenes have been discovered, the prognostic significance of these remains to be confirms. The discovery of ALK in 2008 has opened new therapeutic area for this childhood cancer. Although ALK amplification only occurs in 1-2% of whole population sample, coamplification of ALK/MYCN in neuroblastoma suggests a correlation between these two genes. This review discusses how coamplification of ALK/MYCN results in oncogeneity in neuroblastoma. In addition, this review also highlights the recent discoveries of ALK/MYCN pathway and how this co-existence may lead to high-risk neuroblastoma and treatment resistance in patients with this genetic alteration.

Key words: Neuroblastoma • ALK • MYCN • Coamplification • Oncogeneity

INTRODUCTION

In Malaysia, neuroblastoma is a rare pediatric cancer and accounts to approximately for 10% of childhood mortality. Malaysian Cancer Statistic-Data at 2007 reported that neuroblastoma was one of the sixth most common histological type for brain and nervous system cancer with an increase to 5.1 percentage compare to 0.9% in year 2003-2005 in Malaysia [1, 2]. Due to commonly like symptoms such as fever, loss of appetite and weight loss, it often results in difficulty to diagnose at an early stage. Hence, by the time the patients are taken to hospital, the disease may have already progressed to high risk neuroblastoma which occasionally leads to poor prognosis. Nonetheless, this disease sparks research interest as it has the mechanism to spontaneously regress from malignant to benign, particularly in younger infants [3]. Anaplastic Lymphoma Kinase in neuroblastoma has only been identified in less than a decade ago. In the last few years, intense research has been ongoing to prove the relationship of ALK in neuroblastoma with poor prognosis. This review will emphasis on how amplification of both genes in chromosomal locus two, which is adjacent to each other, when co-amplified promotes on Neuroblastoma oncogenesis.

Neuroblastoma: Neuroblastoma is listed as the third most common pediatric cancer and is responsible for approximately 15% of all childhood cancer deaths. Neuroblastoma is one of the diseases that showed wide clinical and genetic heterogeneity. There was also slight male predominance in neuroblastoma patients and with median age of 22 months [3]. This common solid extracranial neoplasm that arises from postganglionic sympathetic nervous system was first described more than a century ago by three physicians who recognized the neural nature of the tumor [3, 4]. Neuroblastoma may be graded into several stages that has different prognostic outcome, most patients with localized disease (stages 1 and 2) are infants (less than 1 year) has excellent survival after surgical treatment only, whereas most older children (1 year) have widespread metastasis (stages 3 and 4) and need additional chemotherapy and hematopoietic stem cell rescue. However, stage 3 and 4 are lethal for older patient age 4 to 5 years old. In contrast, stage 4S tumors predominantly occur in infants and may regress into ganglioneuroma and disappear without treatment. There are two important clinical parameters; age and clinical stage that determine the prediction of treatment outcome patient survival. Recent clinical treatment also includes biological parameter to improve

patients that require intensive treatment such as patient with MYCN amplification [5, 6]. Recently, ALK has been identified as a major predisposing gene as well as a potential therapeutic target for neuroblastoma [7].

Furthermore, according to Marta and colleagues, it appears that ALK is a crucial oncogene whose regulation status influences the clinical evolution of neuroblastoma. Their study also had shown that individuals with ALK-related neuroblastoma susceptibility (*i.e.*, heterozygous for ALK mutation) are at risk of developing neuroblastic tumors. Aberrant copy number or mutations in ALK gene and over expression of its protein tyrosine-kinase receptor have been related to poor prognosis of this disease, although a great degree of discrepancy exists regarding the clinical validation of these alterations [8]. Another study also demonstrated that ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma [9].

Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK): ALK is one of protein tyrosine kinase gene that is located on chromosome 2p23.

Since the original discovery of ALK in 1994 resulted directly from investigations into the frequently observed t(2;5)(p23;q35) chromosomal rearrangement in anaplastic large cell lymphoma (ALCL), which fuses the cytoplasmic domain of ALK to the N-terminal portion of the nucleolar phosphoprotein, NPM [10-12], similar studies have also investigated the role of ALK in neuroblastoma. Moreover, earlier researchers stated that ALK is preferentially expressed in the central and peripheral nervous system [13, 14].

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a tyrosine kinase receptor that affects a number of biological and biochemical functions through normal ligand-dependent signaling. It has oncogenic functions in a number of tumors including non-small cell lung cancer (NSCLC), anaplastic large cell lymphoma and neuroblastoma when altered by translocation or amplification or mutation [15].

Many other examples of aberrant ALK activation due to chromosomal rearrangement have been described in human cancers, including non-small-cell lung carcinomas (NSCLC), inflammatory myofibroblastic tumors (IMTs), diffuse large cell B-cell lymphomas and esophageal squamous cell carcinomas [16].

ALK has the typical structure of a transmembrane RTK, with a large extracellular domain, a lipophilic transmembrane segment and a cytoplasmic tyrosine kinase domain. It is a single-chain 1620 amino acid (aa) transmembrane protein consisting of a 1030-aa

extracellular domain, a 28-aa transmembrane-spanning domain and a 276-aa intracellular tyrosine kinase domain. Ligand binding leads to receptor dimerization and activation via *trans*-autophosphorylation of tyrosine residues within kinase domain A-loop (Activation loop) segments. Phosphorylation of sites outside the A-loop within the cytoplasmic domain serve as docking sites for downstream SH2 (Src homology 2) and PTB (Phosphotyrosine-binding domain) domain-containing effector and adapter proteins involved in the signal transduction cascade [17].

N-linked glycosylation of ALK leads to a glycoprotein that migrates in SDS gels at about 210 kD. The 177-kDa polypeptide encoded by the human ALK gene undergoes post-translational modifications, such as N-glycosylation, to generate a mature protein doublet of 220 and 190 kDa. ALK migrates as two protein isoforms: the 220-kDa full-length receptor and the truncated 140 kDa protein that results from extracellular cleavage [18].

The cytoplasmic portion contains 563 residues and includes the kinase catalytic domain. This full-length form is implicated in malignancies where ALK promotes tumorigenesis via activation by autocrine and paracrine growth-promoting loops involving the putative endogenous ALK ligands PTN (Pleiotrophin) and MK (Midkine) [19, 20].

Genetic abnormalities or disease states leading to ALK hyperactivation manifest in oncogenic transformation from overstimulation of downstream STAT (Signal transducer and activator of transcription), Ras/Raf/MEK [MAPK (Mitogen-activated protein kinase)/ERK (Extracellular-signal-regulated kinase) kinase], PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt and PI3K/PLC (Phospholipase C)- γ pathways involved in cell survival, differentiation and apoptosis [21].

Iwahara and colleagues independently clone the human and mouse ALK receptor which was shown to code for a protein with a predicted molecular mass of 180 kD. Their study also observed that the *alk* gene is dominantly expressed in specific parts of the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS). Its level of expression is especially high at the neonatal stage. Their data shows there's a linkage between ALK function in neuroblastoma pathogenesis [22].

Thus based on previous findings, activation of ALK may regulate cellular proliferation, differentiation and apoptosis via a number of different signaling pathways, including PI3K/AKT, RAS/ MAPK and STAT3, although its precise physiologic role remains elusive [23].

ALK Amplification: Neuroblastoma is one of paediatric cancer examples that possesses heterogeneity in which the ALK oncogene can either arise from germline mutation by mutation in tyrosine kinase domain or spontaneously mutated. This discovery provides the evidence that activation of ALK in tyrosine kinase domain as major cause of hereditary neuroblastoma [7, 24]. ALK aberration has been identified since, its discovery in 2008 that includes missense mutation on both sporadically and hereditary mutation ALK gene, chromosomal translocation and least but not rare is ALK amplification [7, 24, 25]. However, ALK amplification and mutation are seldom observed within the same tumor [26]. According to Lamant *et al.* [27], initial studies identified ALK protein over expression both in primary neuroblastoma and cell lines as a consequence of gene amplification. Hassan and colleagues proven the hypothesis postulates by Chen and colleagues, that ALK amplification actively contributed to the pathogenesis of neuroblastoma rather than being secondary passenger events of MYCN amplification [9,24]. Recent study demonstrated that ALK expression was significantly correlated with MYCN amplification in primary neuroblastoma due to overexpression of MYCN induced promoter activity of ALK gene that resulted high level ALK expression in neuroblastoma cells [9].

As previously reported, ALK amplification is about 2% of all neuroblastoma cases and a previous studies have shown that solitary ALK amplification is rare, however ALK amplification is found to occur almost exclusively with MYCN amplification [26, 28, 29]

George *et al.* [29] also stated that consistent but less frequently occurring high level ALK amplification was detected. In addition, constitutive and increased kinase activity of mutated ALK protein was shown in their studies. Inhibition of some mutant forms of ALK in human neuroblastoma cell lines resulted in apoptosis and impaired cell proliferation, demonstrating ALK as a potential therapeutic target for this disease.

Oncogenicity Relationship Between ALK and MYCN:

In addition, earlier report established the direct role of MYCN in the transcriptional regulation of ALK in neuroblastoma which afterward indirectly proposes the possibility of positive cooperation link between these two oncogenes ALK and MYCN. This is also supported by previous finding which showed that ALK amplification occurs almost exclusively with MYCN amplification and may affect as many as 7-15% of primary neuroblastomas with an amplified MYCN gene [26, 29].

MYCN oncogene amplification is an establish marker indicating aggressive tumor progression of high-risk neuroblastoma [30]. The MYCN gene is located on the distal short arm of chromosome 2 (2p24). The MYC family of proto-oncogenes belongs to the basic helix-loop-helix leucine-zipper class of transcription factor. MYC protein (MYCN and c-myc) shares several regions of homology and similar cellular functions that target proliferative pathways vital for cancer progression. MYCN is an important gene for proliferation, migration, stem cells homeostasis while decrease levels are associated with terminal neuronal differentiation [31, 32]. High-risk tumors without MYCN amplification frequently display increased c-MYC expression and/or activation of MYC signaling pathways while down regulation of MYCN leads to decreased proliferation and differentiation, emphasizing the importance of MYC signaling in neuroblastoma biology [33].

Since the genomic region amplified with MYCN is large, usually on the order of 500 to 1,000 kb. Therefore, it has been postulated that additional genes located near MYCN may contribute to the ultimate tumor phenotype when co-amplified. High-resolution restriction mapping of the MYCN locus has shown that a 130-kb core domain is the consistent target of amplification [34].

An earlier study by Schonherr [35] also showed that both wild type and gain of function ALK mutants were able to stimulate transcription at MYCN promoter through the activation of downstream molecule ERK and initiate mRNA transcription of MYCN in both neuronal and neuroblastoma cells. Their findings also showed co-expression of the constitutively active ALK mutants and MYCN results in increased transformation as compared with the MYCN, ALK F^{1174L} or ALK R^{1275Q}. They also hypothesized that ALK is a component responsible for increased MYCN protein levels and this maybe of relevance for patients with chromosome 2 amplification harboring either wild type ALK or activating ALK variant, which showed extremely poor clinical outcome. Their study also proved that, when there were copresence of ALK and MYCN, a robust transformation could be observed compared to an activated ALK alone. This indicates that, when both genes are co-expressed together it will result oncogenicity that provides the driving force for neuroblastoma development and progression.

According to Hassan *et al.* [9] reported that MYCN-mediated ALK induction promotes cell proliferation, migration and invasion. ALK expression was

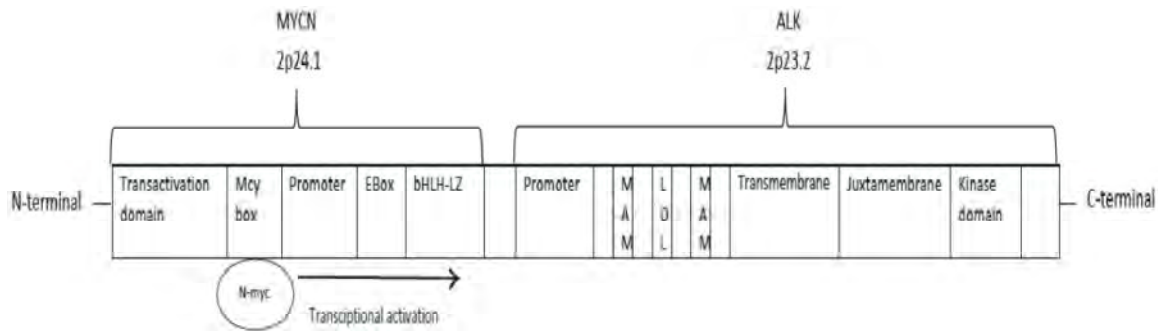


Fig. 1: Amplification of MYCN leads to increase MYC protein. This later on activates the MYCN promoter transcriptional target and MYCN amplification in neuroblastoma induced promoter of ALK gene, leading to a high level of ALK expression in neuroblastoma cells. It is postulated that transcription of ALK kinase domain also been enhanced by increasing amount of MYC protein that is regulated by MYCN indirectly affect the ALK gene in tyrosine kinase domain. (Adapted from Maris and Mathay [3] and Anna M. Azarova [10])

significantly correlated with MYCN amplification in primary neuroblastoma, while over expression of MYCN induces promoter activity of ALK gene, leading to a high level of ALK expression in neuroblastoma. The promoter region of ALK gene contains a non-canonical E-box located upstream of the transcription initiation site and MYC proteins bind onto the promoter region and regulates its transcription. Moreover, wild type ALK functions as a modulator of proliferation as well as cell migration and invasion. They performed promoter study by constructing luciferase reporter constructs containing -2056 bp to +30 bp fragments of ALK gene by using NBL (mutated ALK cell line; SH-SY5Y and wild-type ALK cell line; SK-N-AS) and non-NBL (U2OS and HeLa) cells, which showed co-related regulation of ALK gene with MYCN or c-MYC expression increased in luciferase activity with pGL4.17 ALK (-2056 BP) was enhanced by co-expression of increasing amount of MYCN or c-MYC expression vector. Their data also demonstrated ALK as a direct target of MYC proteins due to high level of ALK expression that were observed in a 2 week old MYCN-hemizygous mice, which grew spontaneous arising ALK expressed neuroblastoma in early stage of tumor development driven by MYCN [9].

Ogawa *et al.* [36] states that ALK plays a positive role during the initiation and promotion of neuroblastoma even though established tumors may or may not depend on the ALK activity. A schematic diagram shows the potential role of ALK in neuroblastoma (Fig. 1).

When amplification of MYCN gene locus occurs, MYC proteins will bind onto the promoter regulating its transcription. This will activate continuous transcriptional activation on the MYCN gene. As both MYCN and ALK

gene are located on chromosomal locus 2, continuous transcriptional activation will consequently activate the growth promoting gene. Thus, over expression of MYCN induces promoter activity of ALK gene which eventually leads to a high level of ALK expression in neuroblastoma as ALK is also involved in cell proliferation. Thus, we postulates that whenever MYCN gene is amplified activation of ALK genes also occurs resulting in coamplification. This leads to poor prognosis in patients with neuroblastoma although the exact mechanism is still unclear.

Retinoic Acid (RA) and ALK/MYCN Resistance: RA is one of the potent differentiation inducers for human neuroblastoma in vitro. Upon exposure of RA, various neuroblastoma cell lines cease proliferation, differentiate into neuronal like cells, or undergo apoptosis [37]. RA is well known MYCN suppressor and the addition of RA to proliferating neuroblastoma cells halts their division and leads to either differentiation or apoptosis [28, 37, 38, 39]. However, according to Hassan *et al.* [9], their recent study suggested that ALK expression partially prevented the effect of RA on cell proliferation. Hassan *et al.* [9] also analyzed RA treatment experiment using MYCN amplified cultured human neuroblastoma cell line known as GOTO, which displayed wild type ALK allele and showed sensitivity to RA. In addition, the proliferation as well as the number and size of colony of neuroblastoma cells were significantly suppressed after treatment with RA as described by Futami [40]. Moreover, after treatment with RA, MYCN showed decreased expression and ALK expression was also down regulated. However, both wild-type and F1174L mutated ALK over expressing cells

had a higher number of live clones compared with the control cells following the treatment with RA, which suggested that expression of ALK partially prevented the retinoic acid effect on cell proliferation [9]. Cheung *et al.* [41] stated that, there was no correlation seen between resistance to RA and the level of RAR or RXR expression. However, higher expression of RAR β has been associated with good outcome in neuroblastoma and over expression of that gene by transfection appears to increase the responsiveness of some neuroblastoma cell lines to RA [44].

CONCLUSION

Neuroblastoma remains a fascinating subject of research as it has unique heterogeneity in its pathogenesis pathway. MYCN amplification is known to result in poor prognosis of neuroblastoma patients as well as ALK amplification as ALK gene alteration may result in tumors resistance towards therapy. Thus, this review emphasizes on co-amplification between MYCN and ALK gene when activation of both of these genes results in a robust transformation of cell proliferation. On the other hand, although retinoic acid is known as MYCN suppressor, again when both of these genes are coexpressed, ALK expression partially prevents the effect on cell proliferation. However, the exact mechanism should further be studied.

REFERENCES

1. Lim, G.C.C., S. Rampil and Y. Halimah, 2008. Cancer Incidence in Peninsular Malaysia, 2003-2005. National Cancer Registry. Kuala Lumpur.
2. Zainal Ariffin O. and I.T. Nor Saleha, 2011. NCR Report, Ministry of Health, Malaysia.
3. John M. Maris and Katherine K. Matthay, 1999. Molecular Biology of Neuroblastoma. *Biology of Neoplasia*, 17(7): 2264-2279.
4. Gael J. Lonergan, Cornelia M. Schwab, Eric S. Suarez and Christian L. Carlson, 2002. Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma and Ganglioneuroma: Radiologic-Pathologic Correlation. *Radiographics*, 22: 911-934.
5. Garrett M. Brodeur, Jon Pritchard, Frank Berthold, Niels L.T. Carlsen, Victoria Castel, Robert P. Castleberry, Bruno De Bernardi, Audrey E. Evans, Marie Favrot, Fredrik Hedborg, Michio Kaneko, John Kemshead, Fritz Lampert, Richard E.J. Lee, A. Thomas Look andrew D.J. Pearson, Thierry Philip, Borghild Roald, Tadashi Sawada, Robert C. Seeger, Yoshiaki Tsuchida and Paul A. Voute, 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 11: 1466-1477.
6. Janoueix-Lerosey, I., G. Shleiermacher and O. Dellattre, 2010. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene*, 29: 1566-1579.
7. Mossé, Y.P., M. Laudenslager, L. Longo, K.A. Cole A. Wood, E.F. Attiyeh, M.J. Laquaglia, R. Sennett J.E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N.J. Schork, G.M. Brodeur, G.P. Tonini E. Rappaport, M. Devoto and J.M. Maris, 2008. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7216): 930-935.
8. Marta Piqueras, Manish Mani Subramaniam, Arnaud Berthier, Samuel Navarro and Rosa Noguera, 2012. A Comprehensive Tissue Microarray-Based FISH Screen of ALK Gene in Neuroblastomas. *Pediatric Cancer*, 1: 65-75.
9. Kamrul Md. Hasan, Asmaa Naafady, Atsushi Takatori, Satoshi Kishida, Miki Ohira, Yusuke Suenaga, Shamim Hossain, Jesmin Akter, Atsushi Ogura, Yohko Nakamura, Kenji Kadomatsu and Akira Nakagawara, 2013. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Scientific Reports*, 3: 3450.
10. Anna M. Azarova, Gargi Gautam and Rani E. George, 2011. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Seminars in Cancer Biology*, 21: 267-275.
11. Stephan W Morris, Clayton Naeve, Prasad Mathew, Payton L James, Mark N Kirstein, Xiaoli Cui and David P Witte, 1997. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*, 14: 2175-2188.
12. Morris, SW., M.N. Kirstein, M.B. Valentine, K.G. Dittmer, D.N. Shapiro, D.L. Saltman and A.T. Look, 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263: 128-1284.
13. Mathew, P., S.W. Morris, J.R. Kane, S.A. Shurtleff, M. Pasquini, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert and N.G. Copeland, 1995. Localization of the murine homolog of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene on mouse chromosome 17. *Cytogenetic Cell Genetic*, 70: 143-144.

14. Webb, T.R., J. Slavish, R.E. George, A.T. Look, L. Xue, Q. Jiang, X. Cui, W.B. Rentrop and S.W. Morris, 2009. Anaplastic Lymphoma Kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Review Anticancer Therapy*, 9: 331-356.
15. Morales La Madrid, A., N. Campbell, S. Smith, S.L. Cohn and R. Salgia, 2012. Targeting ALK: a promising strategy for the treatment of non-small cell lung cancer, non-Hodgkin's lymphoma and neuroblastoma. *Targeted Oncology*, 7: 199-210
16. Roberto Chiarle, Claudia Voena, Chiara Ambrogio, Roberto Piva and Giorgio Inghirami, 2008. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Review Cancer*, 8: 11-23.
17. Palmer, R.H., E. Verneris, C. Grabbe and B. Hallberg, 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochemical Journal*, 420: 345-361.
18. Degoutin, J., N. Brunet-de Carvalho, C. Cifuentes-Diaz and M. Vigny, 2009. ALK expression in DRG neurons and its involvement in neuron Schwann cells interaction. *European Journal of Neuroscience*, 29: 275-286.
19. Stoica, G.E., A. Kuo, A. Aigner, I. Sunitha, B. Souttou, C. Malerczyk, D.J. Caghey, D. Wen, A. Karavanov, A.T. Riegel and A. Wellstein, 2001. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 16772-16779.
20. Stoica, G.E., A. Kuo, C. Powers, E.T. Bowden, E.B. Scale, A.T. Riegel and A. Wellstein, 2002. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (Alk) and acts as a growth factor for different cell types. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 35990-35998.
21. Lee, C.C., Y. Jia, N. Li, X. Sun, K. Ng, E. Ambing, M.Y. Gao, S. Hua, C. Chen, S. Kim, P.Y. Michellys, S.A. Lesley, J.L. Harris and G. Spraggon, 2010. Crystal structure of the ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) catalytic domain. *Biochemical Journal*, 430: 425-437.
22. Iwahara, T., J. Fujimoto, D. Wen, R. Cupples, N. Bucay, T. Arakawa, S. Mori, B. Ratzkin and T. Yamamoto, 1997. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*, 14: 439-449.
23. Zhu, S., J.S. Lee, F. Guo, J. Shin, A.R. Perez-Atayde, J.L. Kutok, S.J. Rodig, D.S. Neuberg, D. Helman, H. Feng, R.A. Stewart, W. Wang, R.E. George, J.P. Kanki and A.T. Look, 2012. Activated ALK Collaborates with MYCN in Neuroblastoma Pathogenesis. *Cancer Cell*, 21: 362-373.
24. Yuyan Chen, Junko Takita, Young Lim Choi, Motohiro Kato, Miki Ohira, Masashi Sanada, Lili Wang, Manabu Soda, Akira Kikuchi, Takashi Igarashi, Akira Nakagawara, Yasuhide Hayashi, Hiroyuki Mano & Seishi Ogawa, 2008. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, 455: 971-974.
25. Passoni, L., L. Longo, P. Collini, A.M. Coluccia, F. Bozzi, M. Podda, A. Gregorio, C. Gambini, A. Garaventa, V. Pistoia, F. Del Grosso, G.P. Tonini, M. Cheng, C. Gambacorti-Passerini, A. Anichini, F. Fossati-Bellani, M. Di Nicola and R. Luksch, 2009. Mutation independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis in neuroblastoma patients. *Cancer Research*, 69: 7338-7346.
26. De Brouwer, S., K. De Preter, C. Kumps, P. Zabrocki, M. Porcu, E.M. Westerhout, A. Lakeman, J. Vandesompele, J. Hoebeeck, T. Van Maerken, A. De Paepe, G. Laureys, J.H. Schulte, A. Schramm, C. Van Den Broecke, J. Vermeulen, N. Van Roy, K. Beiske, M. Renard, R. Noguera, O. Delattre, Janoueix, I. Lerosey, P. Kogner, T. Martinsson, A. Nakagawara, M. Ohira, H. Caron, A. Eggert, J. Cools, R. Versteeg and F. Speleman, 2010. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clinical Cancer Resources*, 16: 4353-4362.
27. Lamant, L., K. Pulford, D. Bischof, S.W. Morris, D.Y. Mason, G. Delsol and B. Mariame, 2000. Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma. *American Journal of Pathology*, 156: 1711-1721.
28. Weiser, D., M. Laudenslager, E. Rappaport, E. Carpenter, E.F. Attiyeh, S. Diskin, W.B. London, J.M. Maris and Y.P. Mosse, 2011. Stratification of patients with neuroblastoma for targeted ALK inhibitor therapy. *Journal Clinical Oncology*, 29(suppl; abstr 9514).
29. George, R.E., T. Sanda, M. Hanna, S. Fröhling, W. Luther, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W.B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V.E. Gregor, T.R. Webb, N.S. Gray, D.G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S.W. Morris, M. Meyerson and A.T. Look, 2008. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*, 455: 975-978.

30. Schwab, M., 1993. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Seminars Cancer Biology*, 4: 12-18.
31. Alex, R., O. Sozeri, S. Meyer and R. Dildrop, 1992. Determination of the DNA sequence recognized by the bHLH-zip domain of the N-Myc protein. *Nucleic Acids Resource*, 20: 2257-63.
32. Rouah, E., D.R. Wilson, D.L. Armstrong and G.J. Darlington, 1989. N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Resource*, 49: 1797-1801.
33. Westermarck, U.K., M. Wilhelm, A. Frenzel and M.A. Henriksson, 2011. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Seminars Cancer Biology*, 21: 256-266
34. Reiter, J.L. and GM Brodeur, 1996. High-resolution mapping of a 130-kb core region of the MYCN amplicon in neuroblastomas. *Genomics*, 32: 97-103.
35. Schönherr, C., K. Ruuth, S. Kamaraj, C.L. Wang, H.L. Yang, V. Combaret, A. Djos, T. Martinsson, J.G. Christensen, R.H. Palmer and Bengt Hallberg, 2012. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 31: 5193-5200.
36. Seishi Ogawa, Junko Takita, Masahsi Sanada and Yasuhide Hayashi, 2011. Oncogenic Mutations of ALK in Neuroblastoma. *Cancer Science*, 102: 303-308.
37. Sidell, N., A. Altman, M.R. Haussler and R.C. Seeger, 1983. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Experimental Cell Research*, 148: 21-30.
38. Thiele, C.J., C.P. Reynolds and M.A. Israel, 1985. Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature*, 313: 404-406.
39. Ichimiya, S., Y. Nimura, N. Seki, T. Ozaki, T. Nagase and A. Nakagawara, 2001. Downregulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines. *Medical Pediatric Oncology*, 36: 132-134.
40. Futami, H. and R. Sakai, 2010. All-trans retinoic acid downregulates ALK in Neuroblastoma cell lines and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with activated ALK. *Cancer Letter*, 297: 220-225.
41. Cheung, B., J.E. Hocker, S.A. Smith, M.D. Norris, M. Haber and G.M. Marshall, 1998. Favorable prognostic significance of high level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene*, 17: 751-759.