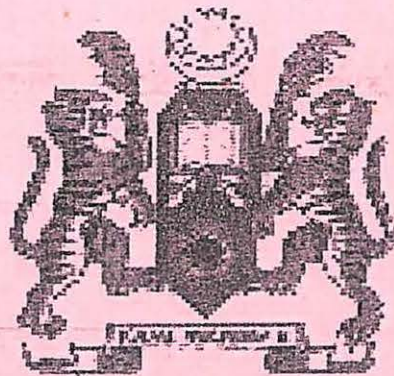


**LAPORAN KOMPREHENSIF
GERAN JANGKA PENDEK USM
(304 / PPSP / 613 1189)**



**A PRELIMINARY STUDY OF P53 EXON 8 TUMOUR SUPPRESSOR
GENE AND RET/PTC 1 ONCOGENE IN MULTINODULAR
GOITER OF THYROIDECTOMIZED PATIENTS IN HUSM**

PENYELIDIK UTAMA:

Professor Nor Hayati Othman

LAIN-LAIN PENYELIDIK:

Professor Madya Manoharan Madhavan

Pusat Pengajian Sains Perubatan

USM

**LAPORAN KOMPREHENSIF
GERAN JANGKA PENDEK USM
(304 / PPSP / 613 1189)**



**A PRELIMINARY STUDY OF P53 EXON 8 TUMOUR SUPPRESSOR
GENE AND RET/PTC 1 ONCOGENE IN MULTINODULAR
GOITER OF THYROIDECTOMIZED PATIENTS IN HUSM**

PENYELIDIK UTAMA:

Professor Nor Hayati Othman

LAIN-LAIN PENYELIDIK:

Professor Madya Manoharan Madhavan

Pusat Pengajian Sains Perubatan

USM

BAHAGIAN PENYELIDIKAN
PUSAT PENGAJIAN SAINS PERUBATAN

KALINAN :

Bilg. Perubatan, PSCP

Perpustakaan Perubatan, USM/KK

RCMO

T/Tangan : Tarikh : 18-3-00

Semua laporan kemajuan dan laporan akhir yang dikemukakan kepada Bahagian Penyelidikan dan Pembangunan perlu terlebih dahulu disampaikan untuk penelitan dan perakuan Jawatankuasa Penyelidikan di Pusat Pengajian.

USM R&D/JP-04

LAPORAN AKHIR PROJEK PENYELIDIKAN R&D JANGKA PENDEK

A. MAKLUMAT AM

Tajuk Projek: **A Preliminary Study of p53 Exon 8 Tumour suppressor Gene and Ret/PTC 1 Oncogene in Multinodular Goiter of Thyroidectomized Patients in HUSM**

Tajuk Program: _____

Tarikh Mula: 15 November 2001

Nama Penyelidik Utama: Prof. (Dr.) Nor Hayati Othman (4666881)
(berserta No. K/P)

Nama Penyelidik Lain: Prof. Madya (Dr.) Manoharan Madhavan
(berserta No. K/P)

B. PENCAPAIAN PROJEK:

(Sila tandakan [I] pada kotak yang bersesuaian dan terangkan secara ringkas di dalam ruang di bawah ini. Sekiranya perlu, sila gunakan kertas yang berasingan)

Penemuan asli/peningkatan pengetahuan

Dari penyelidikan ini, maklumat awal mengenai transformasi malignan yang melibatkan gen-gen Ret/PTC dan p53 dapat ditentukan. Peratusan ekspresi gen-gen tersebut untuk kes goiter di Kelantan telah didapati tinggi serta meningkat dalam kes-kes karsinoma tiroid. Walaubagaimanapun, kajian kemandirian tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan pada kes-kes yang mengekspresi gen tersebut. Ini membuka jalan kepada kajian yang lebih mendalam.

Rekaan atau perkembangan produk baru,
(Sila beri penjelasan/maklumat agar mudah dikomputerkan)

(1) _____

(2) _____

(3) _____

Mengembangkan proses atau teknik baru,
(Sila beri penjelasan/maklumat agar mudah dikomputerkan)

 /

(1) Mengenalkan pewarnaan immunohistokimia bagi antigen Ret/PTC
untuk kes goiter multinodular.

(2) _____

(3) _____

Memperbaiki/meningkatkan produk/proses/teknik yang sedia ada
(Sila beri penjelasan/maklumat agar mudah dikomputerkan)

(1) _____

(2) _____

(3) _____

C. PEMINDAHAN TEKNOLOGI

Berjaya memindahkan teknologi.

Nama Klien: (1) _____

(Nyatakan nama penerima pemindahan teknologi ini dan sama ada daripada (2) _____

pihak swasta ataupun sektor awam) (3) _____

Berpotensi untuk pemindahan teknologi.
(Nyatakan jenis klien yang mungkin berminat)

D. KOMERSIALISASI

Berjaya dikomersialkan.

Nama Klien: (1) _____

(2) _____

(3) _____

Berpotensi untuk dikomersialkan.
(Nyatakan jenis klien yang mungkin berminat)

E. PERKHIDMATAN PERUNDINGAN BERBANGKIT DARIPADA PROJEK

(Klien dan jenis perundingan)

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____
- (4) _____

F. PATEN/SIJIL INOVASI UTILITI

(Nyatakan nombor dan tarikh pendaftaran paten. Sekiranya paten/sijil inovasi utiliti telah dipohon tetapi masih belum didaftarkan, sila berikan nombor dan tarikh fail paten).

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

G. PENERBITAN HASIL DARIPADA PROJEK

(i) LAPORAN/KERTAS PERSIDANGAN ATAU SEMINAR

(1) 8th National Conference on Medical Sciences - 8-9 Mei 2003
Kampus Kesihatan USM, Kubang Kerian, Kelantan

- (2) _____
- (3) _____

- (4) _____
- (5) _____

(ii) PENERBITAN SAINTEFIK

(1) _____

(2) _____

(3) _____

(4) _____

(5) _____

(6) _____

H. HUBUNGAN DENGAN PENYELIDIK LAIN
(sama ada dengan institusi tempatan ataupun di luar negara)

(1) _____

(2) _____

(3) _____

(4) _____

I. SUMBANGAN KEWANGAN DARI PIHAK LUAR

(Nyatakan nama agensi dan nilai atau peralatan yang telah diberi)

(1) _____

(2) _____

(3) _____

J. PELAJAR IJAZAH LANJUTAN

(Nyatakan jumlah yang telah dilatih di dalam bidang berkaitan dan sama ada diperingkat sarjana atau Ph.D).


Nama Pelajar

Sarjana

Muhammad Hamdi Bin Mahmood

Ph.D

K. MAKLUMAT LAIN YANG BERKAITAN


Professor Zabidi Azhar Mohd. Hussin
Chairman, Research & Ethics Committee
School of Medical Sciences
Health Campus
Universiti Sains Malaysia
16450 Kubang Kerian,
Penang, Malaysia

Tandatangan

**TANDATANGAN PENCERAIAN
JAWATANKUASA PENYELIDIKAN
PUSAT PENGAJIAN**

**LAPORAN KOMPREHENSIF
GERAN JANGKA PENDEK USM
(304 / PPSP / 613 1189)**



**A PRELIMINARY STUDY OF P53 EXON 8 TUMOUR SUPPRESSOR
GENE AND RET/PTC 1 ONCOGENE IN MULTINODULAR
GOITER OF THYROIDECTOMIZED PATIENTS IN HUSM**

PENYELIDIK UTAMA:

Professor Nor Hayati Othman

LAIN-LAIN PENYELIDIK:

Professor Madya Manoharan Madhavan

Pusat Pengajian Sains Perubatan

USM

PENGENALAN

Goiter multinodular (MNG) atau nodular hiperplasia ialah pembesaran kelenjar tiroid yang biasanya tidak dikaitkan sebagai prekursor barah/ karsinoma. Kini konsep tersebut telah cuba disangkal. Gen RET/PTC terletak pada kromosom 10. Mutasi pada gen ini kerap dikesan pada kes-kes karsinoma tiroid. p53 adalah gen perencat tumor yang terletak pada kromosom 17. Walaupun mutasi p53 sering dikesan dalam pelbagai jenis karsinoma pada manusia, kepentingan ekspresi tersebut pada karsinoma tiroid masih perlu diselidiki. Dengan menggunakan teknik immunohistokimia (Kompleks Strep-ABC) kajian ini melihat prevalens produk gen-gen tersebut pada penderita MNG di HUSM.

OBJEKTIF KAJIAN

Mengenalpasti pengaruh RET/PTC dan p53 pada perubahan malignansi suatu nodular hiperplasia di dalam populasi tempatan.

IMPAK KAJIAN

1. Menjelaskan lagi bagaimana nodular hiperplasia menjadi lesi prekursor malignansi, terutama hubungannya dengan ekspresi RET/PTC dan p53.
2. Menyediakan informasi asas untuk mengkaji perubahan malignansi pada nodular hiperplasia untuk populasi tempatan
3. Untuk menjana idea baru dalam diagnosis perubahan malignansi, supaya dapat mengesan kanser di tahap awal.

METODOLOGI

Pensampelan:

Sejumlah 63 (n=63) sampel tisu tiroid dari penderita goiter multinodular yang dibedah di HUSM terlibat dalam kajian ini. Daripada kes-kes tersebut adalah karsinoma tiroid, 33 goiter multinodular dan 4 tisu tiroid normal.

Prevalens kes-kes tiroid:

Setiap kes tersebut dilakukan pewarnaan H&E serta kemudiannya di padankan dengan keputusan HPE untuk mengetahui prevalens karsinoma, goiter, nodul hiperplasia dan lain-lain patologi tiroid.

Immunohistokimia:

Setiap 6µm slaid tisu diterapkan pada slaid kaca bersalut polilisina, yang kemudiannya dinyah parafin pada suhu 60°C. Ini diikuti dengan penghadangan peroksidase endogenus. Tapak antigenik pada slaid tisu dirawat dengan kaedah haba/gelombang mikro. Bagi antigen RET/PTC, antibodi primer 'goat anti-human' dengan pencairan 1:50 (200µl) telah digunakan. Manakala bagi antigen p53, antibodi primer 'mouse anti-human' dengan pencairan 1:50 (200µl) telah digunakan. Slaid tisu dieram pada 4°C semalaman untuk membenarkan jerapan antibodi pada tapak antigen. Langkah seterusnya adalah pengeraman selama 30minit pada suhu bilik bersama dengan 200µl antibodi sekunder-terbiotinilasi masing-masing. Bagi RET/PTC 'anti-goat' manakala bagi p53 'anti-mouse'. Ini diikuti pula dengan perawatan selama 30minit dengan kompleks Avidin-Biotin. Pembentukan warna perang pada slaid pula diperolehi setelah ditindak oleh larutan Diaminobenzidina dengan 3% Hidrogen peroksida selama 10minit. Bagi mendapatkan kontras biru di nukleus, slaid tisu dirawat dengan larutan Hematoksilina. Slaid tisu seterusnya didehidrasikan dengan siri larutan alkohol yang disudahi dengan larutan Xilena. Akhir sekali, untuk simpanan yang berkekalan, slaid di terapkan dengan larutan DPX.

Penilaian Immunohistokimia:

Setiap slaid imunohistokimia RET/PTC dan p53 dinilai bersama-sama oleh Patologis (Prof. Nor Hayati Othman) untuk diberi nilai seperti berikut: 0 (tiada ekspresi antigen), 1+ (10% ekspresi antigen), 2+ (10-50% ekspresi antigen) dan 3+ (>50% ekspresi antigen).

Analisa Kemandirian:

Untuk setiap kes yang diperolehi, status kemandirian pesakit dipantau selama 30 bulan. Kejadian metastasis jauh dijadikan pemberat yang merendahkan tahap kemandirian pesakit. Status kemandirian pesakit kemudiannya disahkan oleh Patologis (Prof. Madya Manoharan Madhavan). Seterusnya graf risiko kumulatif kemandirian melawan masa diplot dengan menggunakan perisian komputer SPSS versi 10.0.

Analisa Statistik :

Ujian statistik yang terlibat adalah: Chi Kuasa dua, Tepat Fischer, Nisbahan ganjil (Odds ratio) dan Log berpangkat. Nilai p bersamaan 0.05 diambil sebagai tahap signifikan pada setiap ujian statistik yang dilakukan. Pengkelasan kepada kumpulan normal, nodular hiperplasia, karsinoma, neoplastik dan bukan neoplastik disahkan oleh laporan HPE.

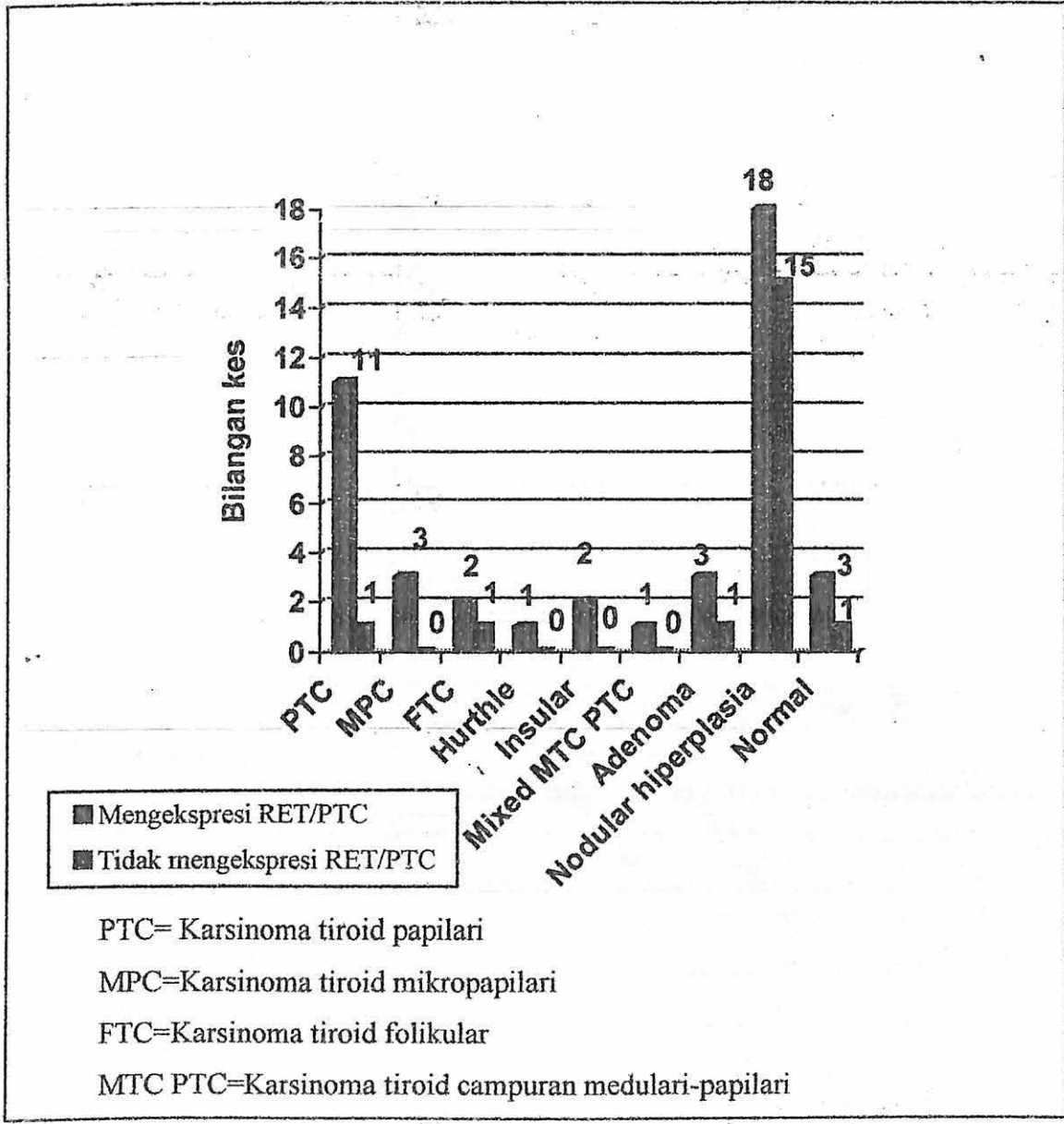
KEPUTUSAN

Jadual 1 : Prevalens & Kategori lesi tiroid

Kategori kes	Kes (%)	Median umur	M: F
Normal	4 (6.4)	29.5	1: 1
Nodular hiperplasia	33 (52.3)	33.0	1: 10
KARSINOMA			
Papilari	12	37.5	1: 3
Mikropapilari	3	41.0	Semua Wanita
Folikular	3	45.0	1: 2
Sel Hürthle	1	70.0	Semua Wanita
Campuran medulari papilari	1	55.0	Semua Wanita
Insular	2	38.5	Semua Wanita
JUMLAH KES KARSINOMA	22(34.9)	41.5	1: 4.5
Adenoma	4 (6.4)	36.5	Semua Wanita
JUMLAH	63(100%)	39.0	1: 5.3

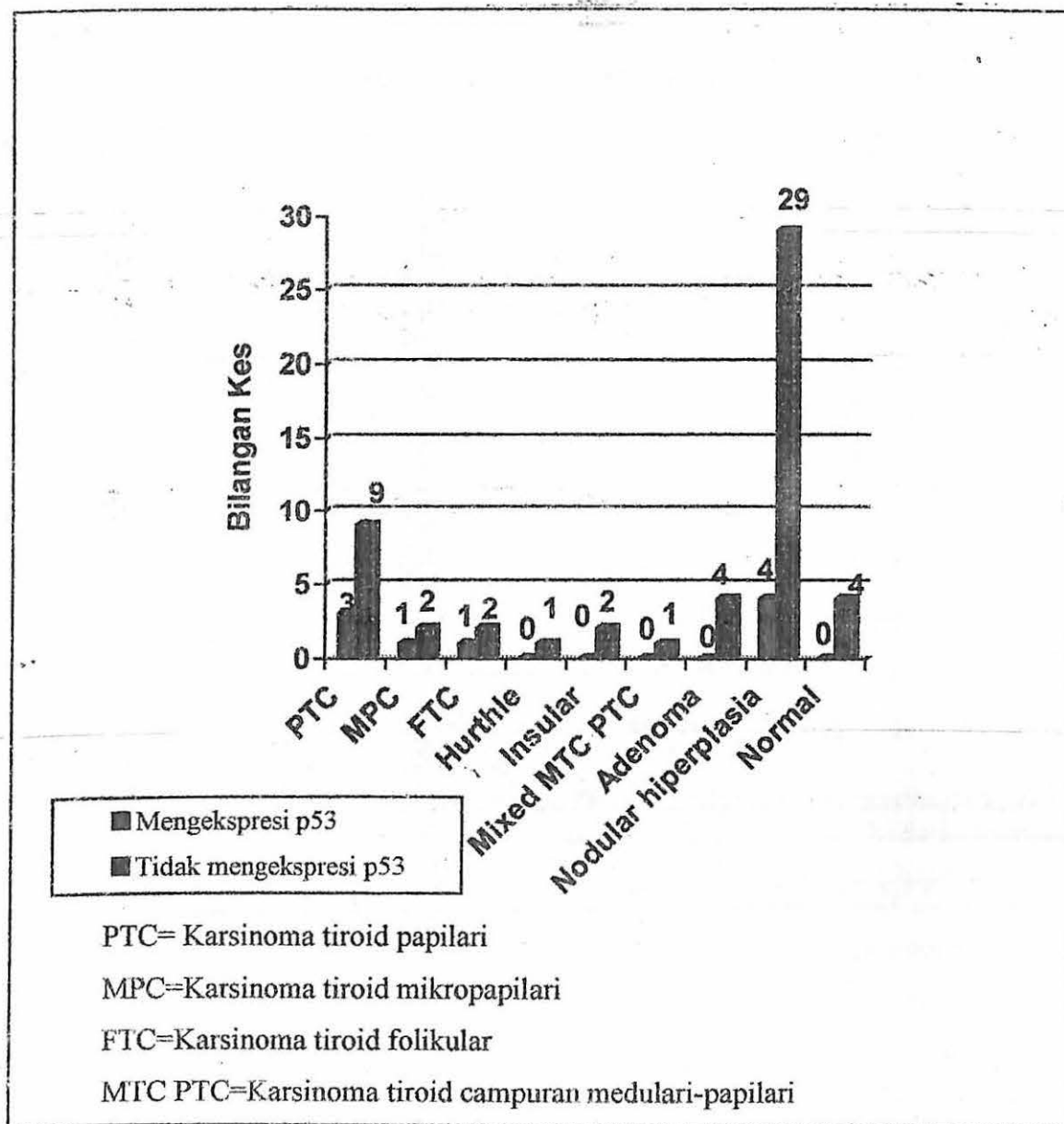
M:F =Nisbah Lelaki-kepada-wanita

Jadual 1 menunjukkan prevalens kes tiroid sepanjang kajian. Adalah didapati 34.9% kes karsinoma tiroid manakala 52.3% kes nodular hiperplasia. Majoriti pesakit adalah wanita berumur lebih dari 30tahun.



Gambarajah 1 : Ekspresi antigen RET/PTC pada semua kes

Ekspresi antigen RET/PTC pada setiap kes diringkaskan oleh gambarajah 1.



Gambarajah 2: Ekspresi antigen p53 pada semua kes

Ekspresi antigen p53 pada setiap kes diringkaskan oleh gambarajah 1.

Jadual 2 : Ujian Chi Kuasa dua terhadap lesi tiroid normal, nodular hiperplasia dan neoplastik

Kes	Normal	Nodular hiperplasia	Neoplastik
Mengekspresi RET/PTC	3	18	23
Tidak mengekspresi RET/PTC	1	15	3
Jumlah	4	33	26
Ujian	Nilai		
Chi Kuasa dua	0.018 (P<0.05)		

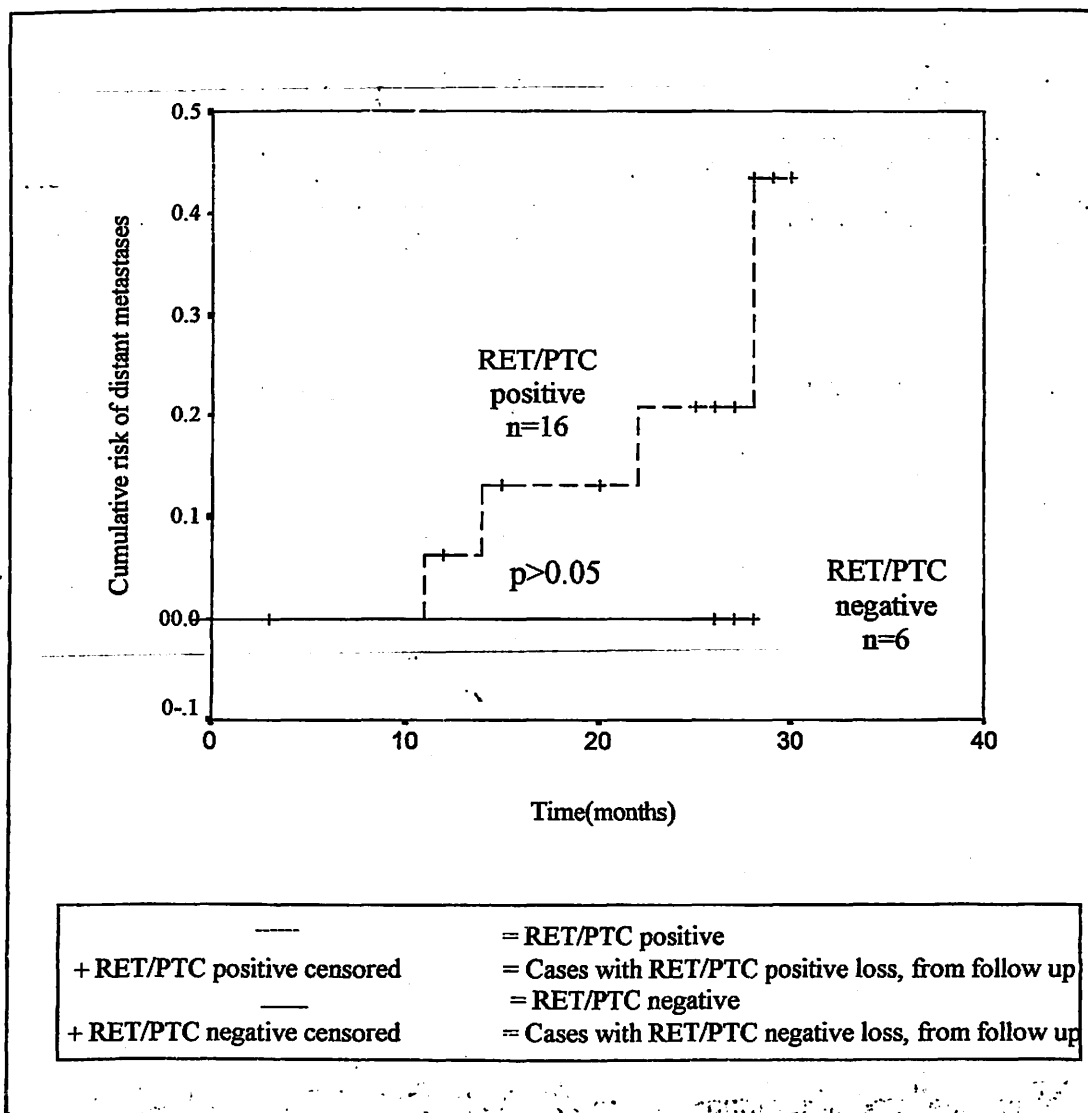
Hasil ujian menunjukkan perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$; $P = 0.018$) pada kes normal, nodular hiperplasia dan neoplastik untuk ekspresi antigen RET/PTC. Ini menunjukkan bahwa ekspresi antigen tersebut pada lesi tiroid, boleh dikaitkan dengan perubahan ke arah kemalignansi.

Jadual 3 : Nisbahan ganjil (Odds ratio) pada lesi karsinoma dan Bukan neoplastik

Kes	Karsinoma	Bukan neoplastik	Jumlah
Mengekspresi RET/PTC	20	21	41
Tidak mengekspresi RET/PTC	2	16	18
Jumlah	22	37	59
Ujian		Nilai	
Tepat Fisher		0.008 (p<0.05)	
		95% Selang Keyakinan	
*OR untuk (Tidak mengekspresi RET/PTC / Mengekspresi RET/PTC)		0.131	Bawah Atas 0.027 0.645

*OR=Odds ratio

Keputusan analisa menunjukkan OR yang signifikan (OR= 0.131, 95% Selang Keyakinan 0.027 hingga 0.645 (p<0.05; p=0.008) untuk kes mengekspresi RET/PTC didiagnos karsinoma, berbanding kes yang tidak mengekspresi RET/PTC.



Gambarajah 3 : Risiko kumulatif (Plot Kaplan-Meier) untuk metastasis jauh pada pesakit karsinoma tiroid positif RET/PTC melawan negatif RET/PTC. Adalah didapati, kepositifan tidak berkorelasi secara signifikan terhadap risiko kumulatif metastasis jauh ($p > 0.05$)

Jadual 4 : Ujian Chi Kuasa dua terhadap lesi tiroid normal, nodular hiperplasia dan neoplastik

Kes	Normal	Nodular hiperplasia	Neoplastik
Mengekspresi p53	0	4	5
Tidak mengekspresi p53	4	29	21
Jumlah	4	33	26
Ujian	Nilai		
Chi Kuasa dua	0.519(P>0.05)		

Hasil ujian tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan ($P > 0.05$; $P = 0.519$) pada kes normal, nodular hiperplasia dan neoplastik untuk ekspresi antigen p53. Ini menunjukkan bahawa ekspresi antigen tersebut pada lesi tiroid, tidak boleh dikaitkan dengan perubahan ke arah kemalignan.

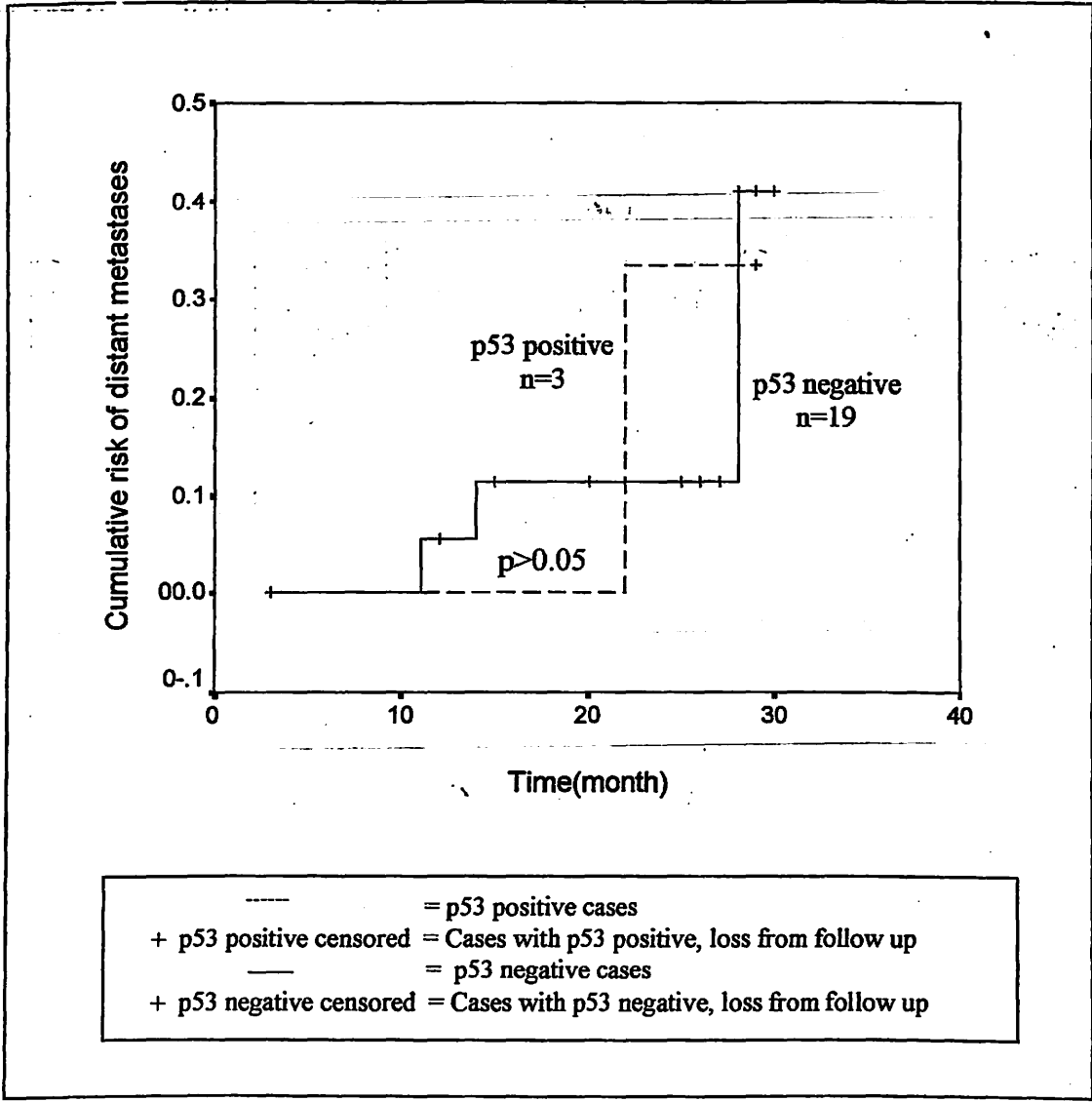
Jadual 5 : Nisbahan ganjil (Odds ratio) pada lesi karsinoma dan Bukan-neoplastik

Kes	Karsinoma	Bukan - neoplastik	Jumlah
Mengekspresi p53	5	4	9
Tidak mengekspresi p53	17	33	50
Jumlah	22	37	59

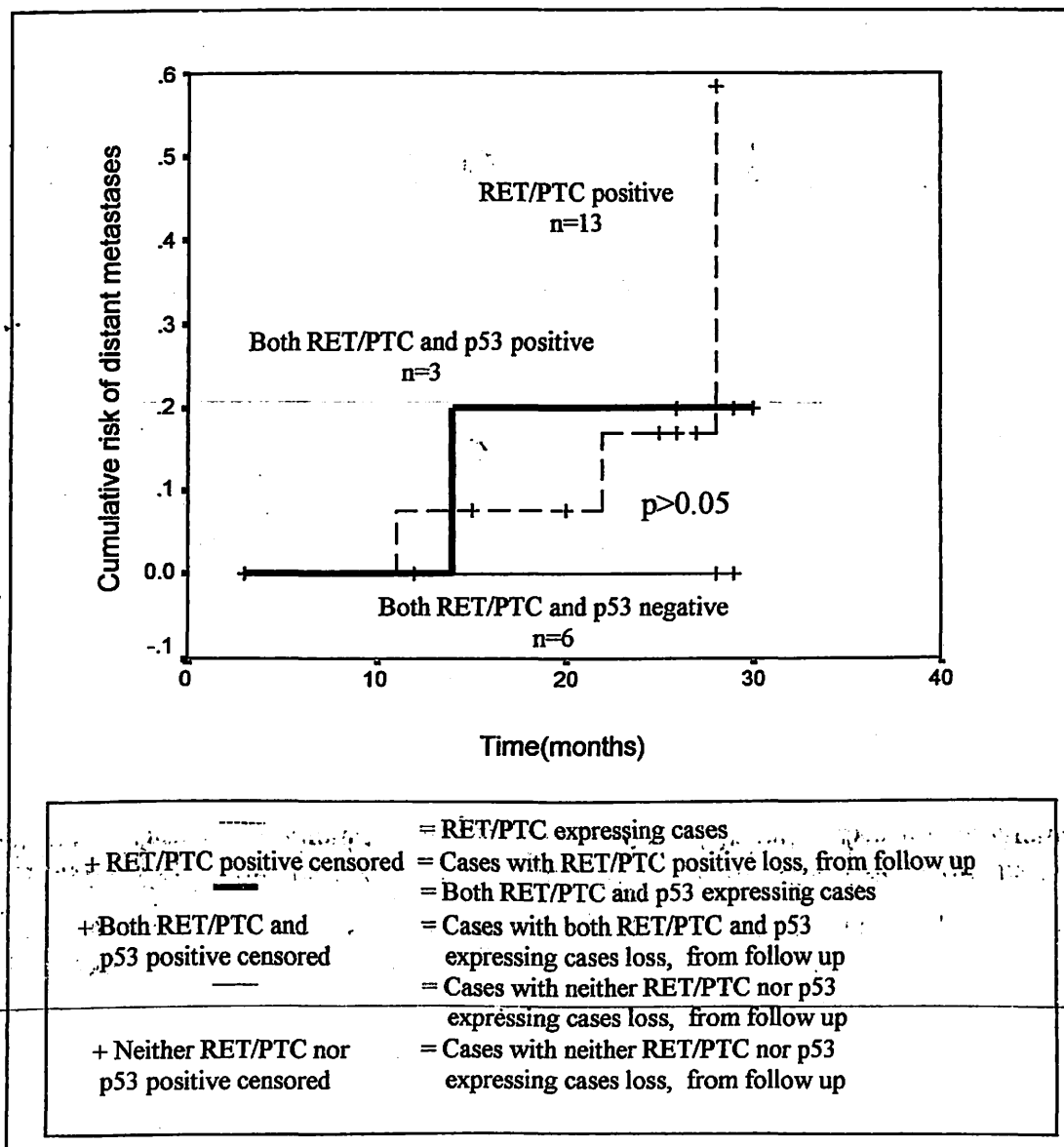
Ujian	Nilai
Tepat Fisher	0.272 (p>0.05)
	95% Selang Keyakinan
	Bawah Atas
*OR for (Tidak mengekspresi p53 / Mengekspresi p53)	0.412 0.098 1.738

*OR=Odds ratio

Keputusan analisa menunjukkan OR yang tidak signifikan (OR= 0.412, 95% Selang Keyakinan 0.098 hingga 1.738 (p>0.05; p=0.272) untuk kes mengekspresi p53 didiagnos karsinoma, berbanding kes yang tidak mengekspresi p53.



Gambarajah 4 : Risiko kumulatif (Plot Kaplan-Meier) untuk metastasis jauh pada pesakit karsinoma tiroid positif p53 melawan negatif p53. Adalah didapati, kepositifan tidak berkorelasi secara signifikan terhadap risiko kumulatif metastasis jauh ($p > 0.05$)



Gambarajah 5 : Risiko kumulatif (Plot Kaplan-Meier) untuk metastasis jauh pada pesakit karsinoma tiroid positif RET/PTC melawan positif kedua-dua RET/PTC dan p53 melawan kedua-dua negatif RET/PTC dan p53. Adalah didapati, sama ada kepositifan atau kenegatifan kedua-dua antigen RET/PTC dan p53 tidak berkorelasi secara signifikan terhadap risiko kumulatif metastasis jauh ($p > 0.05$)

PERBINCANGAN

RET adalah suatu reseptor protein tirosina kinase berperanan dalam proliferasi sel-sel folikel tiroid. Mutasi protoonkogen ini menghasilkan beberapa jenis onkprotein kimera seperti RET/PTC 1, RET/PTC 2, RET/PTC 3, RET/Elk, RET/PTC 7 (Mayr, *et al.* 1998). Kepincangan regulasi sel ini akan diteruskan lagi apabila mutasi berlaku kepada protein perencat tumour p53 (Hollywood & Barton, 1994). Produk gen-gen yang termutasi ini boleh dikesan dan dibuktikan melalui kaedah immunohistokimia dan molekul (Bancroft, *et al.* 1994).

Didapati, pecahan lesi tiroid sepanjang tempoh kajian adalah seperti berikut; 22 (34.9%) kes neoplasia, 4 (6.4%) kes adenoma, 33 (52.3%) kes nodular hiperplasia dan 4 (6.4%) kes normal. Prevalens karsinoma yang tinggi ini (34.9%) membayangkan kemungkinan perubahan malignansi juga adalah tinggi dalam populasi kajian (Madhavan & Nor Hayati, 1996). Pecahan ekspresi RET/PTC di kalangan kes karsinoma, adalah seperti berikut; 11/12 (91.7%) Karsinoma tiroid papilari, 3/3 (100%) Karsinoma tiroid mikropapilari, 2/3 (66.7%) Karsinoma tiroid folikular, 1/1 (100%) Karsinoma sel Hürthle, 2/2 (100%) Karsinoma tiroid insular, 1/1 (100%) Karsinoma tiroid gabungan medulari papilari dan 3/4 (75%) Adenoma. Ekspresi RET/PTC pada lesi tersebut pula menggambarkan peranan antigen tersebut ke arah perubahan kemalignansi (Pacini & DeGroot, 2001). Penemuan ini dikuatkan lagi oleh ekspresi RET/PTC yang meningkat secara gradual serta berbeza secara signifikan di antara kumpulan normal (4.7%), goiter (28.6%) dan neoplasia (36.5%) ($p < 0.05$; $p = 0.018$). Turut didapati, kes-kes yang mengekspresi RET/PTC lebih berisiko untuk menjadi malignan berbanding yang tidak mengekspresi RET/PTC (OR=0.131; Selang Keyakinan 95% 0.027-0.645; $p < 0.05$; $p = 0.008$). Walaubagaimanapun, analisa kemandirian untuk kes-kes yang mengekspresi RET/PTC, tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan terhadap metastasis jauh ($p > 0.05$; $p = 0.228$).

Manakala ekspresi p53 di kalangan kes-kes barah pula adalah; 3/12 (25%) Karsinoma tiroid papilari, 1/3 (33.3%) Karsinoma tiroid mikropapilari, 1/3 (33.3%) Karsinoma tiroid folikular dan tiada ekspresi (0.0%) pada kes-kes Karsinoma sel Hürthle, Karsinoma tiroid insular, Karsinoma tiroid campuran medulari papilari mahupun Adenoma tiroid. Walaubagaimanapun, ekspresi p53 di antara kumpulan normal (0.0%), goiter (6.3%) dan neoplasia (7.9%) tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p>0.05$; $p=0.519$). Risiko untuk kes-kes yang mengekspresi p53 menjadi malignan adalah tidak signifikan (OR=0.412; Selang Keyakinan 95% 0.098-1.738; $p>0.05$; $p=0.272$). Turut di dapati juga kemandirian pesakit tidak dipengaruhi oleh ekspresi p53 ($p>0.05$; $p=0.989$). Penemuan ini menguatkan lagi pendapat bahawa p53 tidak terlibat dalam perubahan kemalignansi. Ini mencadangkan bahawa p53 sememangnya terlibat dalam sifat agresif sesuatu karsinoma (LaPerle, *et al.* 2000).

Sebenarnya perjuangan untuk memahami proses malignansi masih belum selesai. Peranan kedua-dua gen tersebut dalam jaringan pengisyaratan sel menuntut banyak lagi penemuan baru. Hasil penyelidikan ini memberitahu kita prognostik kaitan ekspresi gen tersebut. **Kami amat positif bahawa jika diberikan lebih lagi peruntukan kewangan dan masa, maka lebih banyak hasil akan dapat dituai pada masa akan datang.**

Kesimpulanya, peranan RET/PTC adalah lebih ketara berbanding p53 untuk meramalkan perubahan MNG menjadi barah. Walaubagaimanapun, Adalah di harapkan hasil kajian preliminari ini akan membuka jalan kepada kajian selanjutnya ke arah memahami penglibatan MNG sebagai lesi prekursor kepada kanser tiroid serta penghasilan kit diagnostik cepat.

RUJUKAN

- Bancroft, J.D., Cook, H.C. & Stirling, R.W. (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. Edinburgh : Churchill Livingstone.
- Hollywood, D.P. & Barton, C.M. (1994). *Oncogenes and tumour suppressor genes*. In *Cancer a molecular approach*. (Lemoine, N., Neoptolemos, J. & Cooke, T., ed.), p. 13-41. Edinburgh : Blackwell Scientific Publications.
- LaPerle, K., Jhiang, S.M. & Capen, C.C. (2000). Loss of p53 Promotes Anaplasia and Local Invasion in ret/PTC1-Induced Thyroid Carcinomas. *Am. J. Pathol.* **157**, 671-677.
- Mayr, B., Pötter, E., Goretzki, P., Rüschoff, J., Deitmeir, W., Hoang-Vu, C. & Brabant, G. (1998). Expression of Ret/PTC1,-2,-3,- Δ 3 and -4 in German papillary thyroid carcinoma. *Br. J. Cancer.* **6(77)**, 903-906.
- Madhavan & Nor Hayati. (1996). Spectrum of thyroid diseases in hospital Universiti Sains Malaysia : a study of 300 consecutive cases. In Abstracts second national conference on medical sciences. *Mal. J. Med. Sci.* **3(2)**, 58.
- Pacini, F. & DeGroot, L.J. (2001). Thyroid neoplasia. In *Endocrinology*, 4th edn. (DeGroot, L.J., Jameson, J.L., Burger, H.G., Loriaux, D.L., Marshall, J.C., Melmed, S., Odell, W.D., Potts, Jr. J.T. & Runbenstein, A.H., ed.), p. 1541-1566. New York : W.B. Saunders Company.

LAMPIRAN

PEWARNAAN H&E DAN IMMUNOHISTOKIMIA RET/PTC DAN p53

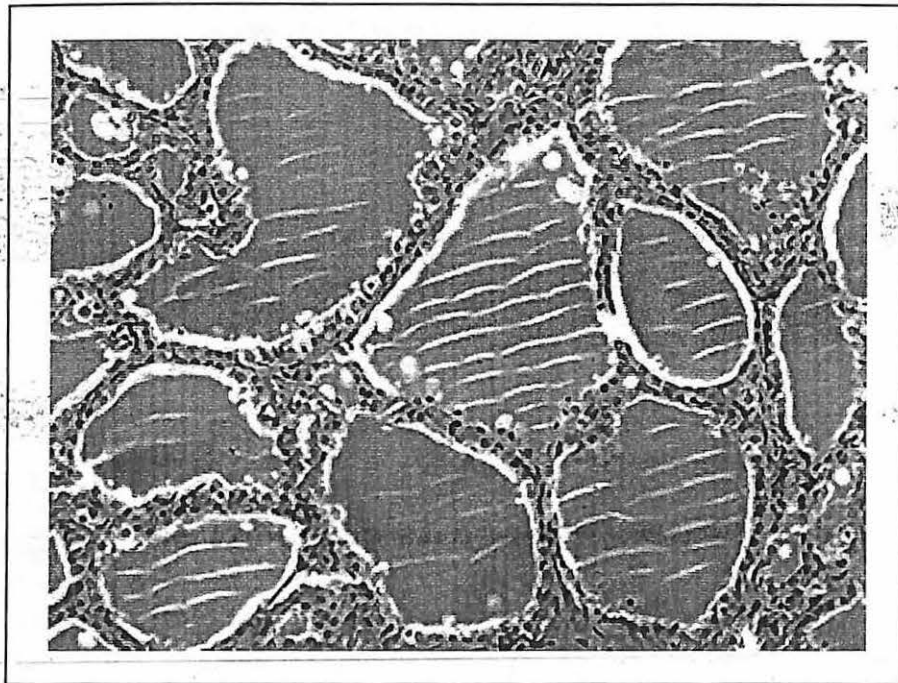


Plate 4.1 : H&E staining in papillary thyroid carcinoma follicular variant
(Case No. 5; Magnification x 10)



Plate 4.2 : RET/PTC IHC staining in follicular variant of papillary thyroid carcinoma
showing mild (+1) cytoplasmic positivity in the tumour cells
(Case No. 18; Magnification x 10)

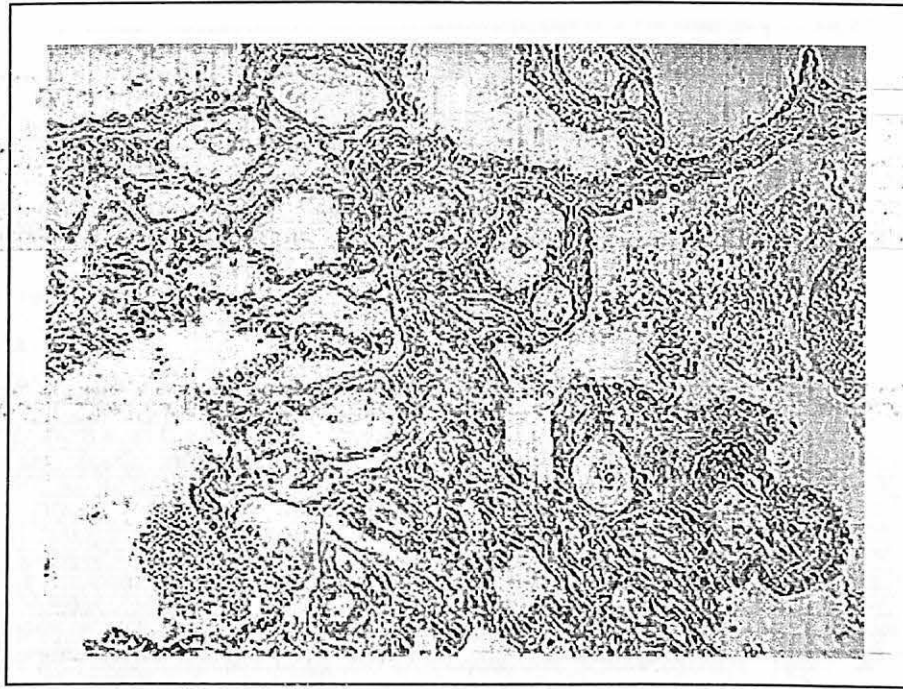


Plate 4.3 : RET/PTC IHC staining in papillary thyroid carcinoma showing strong (+3) cytoplasmic positivity in tumour cells (Case No. 21; Magnification x 10)

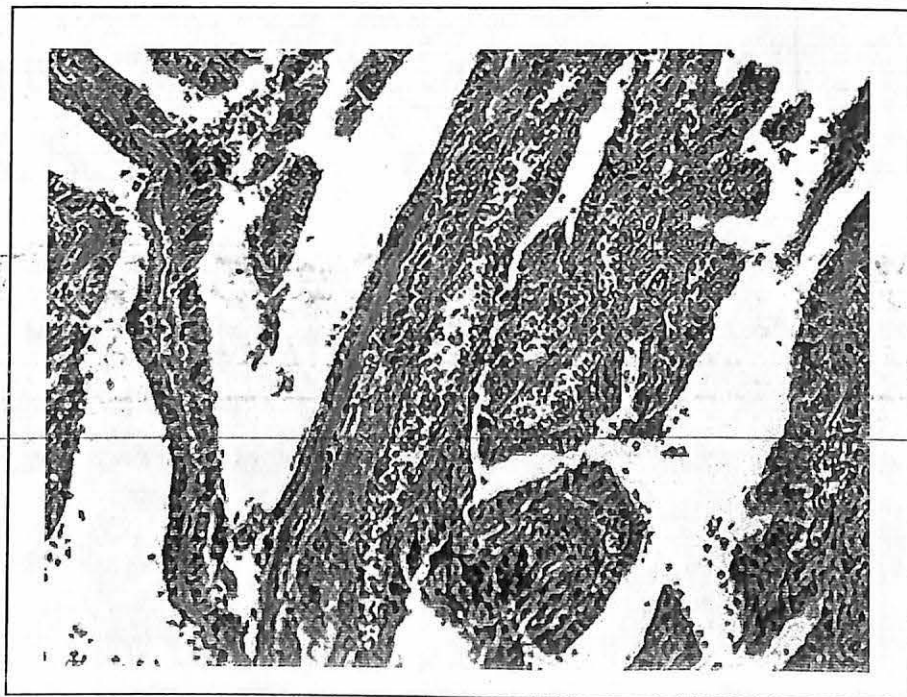


Plate 4.4 : H&E staining in papillary thyroid carcinoma showing fibrovascular invasion (Case No. 45; Magnification x 10)

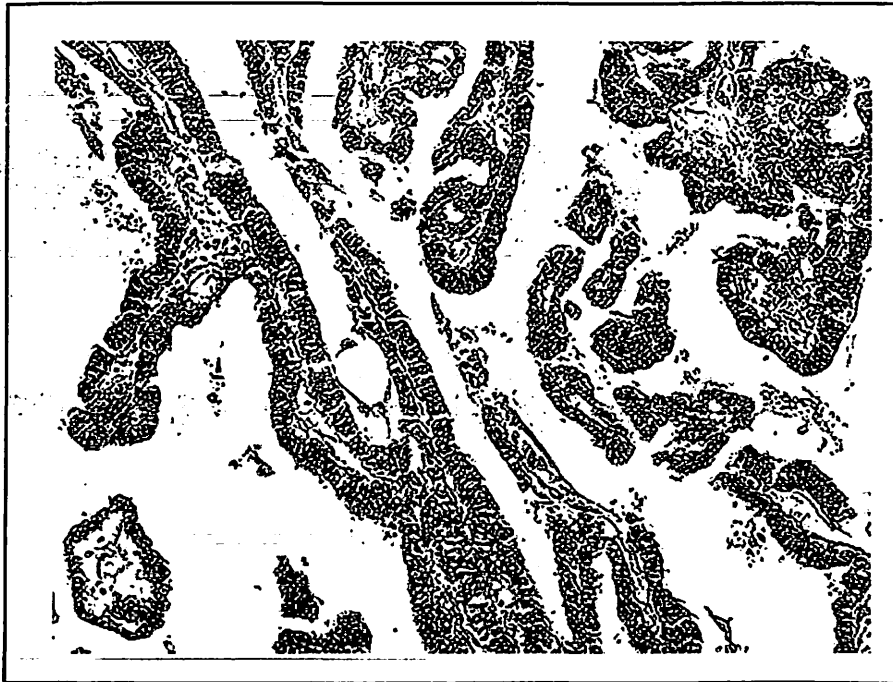


Plate 4.5 : RET/PTC IHC staining in papillary thyroid carcinoma showing strong (+3) cytoplasmic positivity in tumour cells (Case No. 45; Magnification x 10)

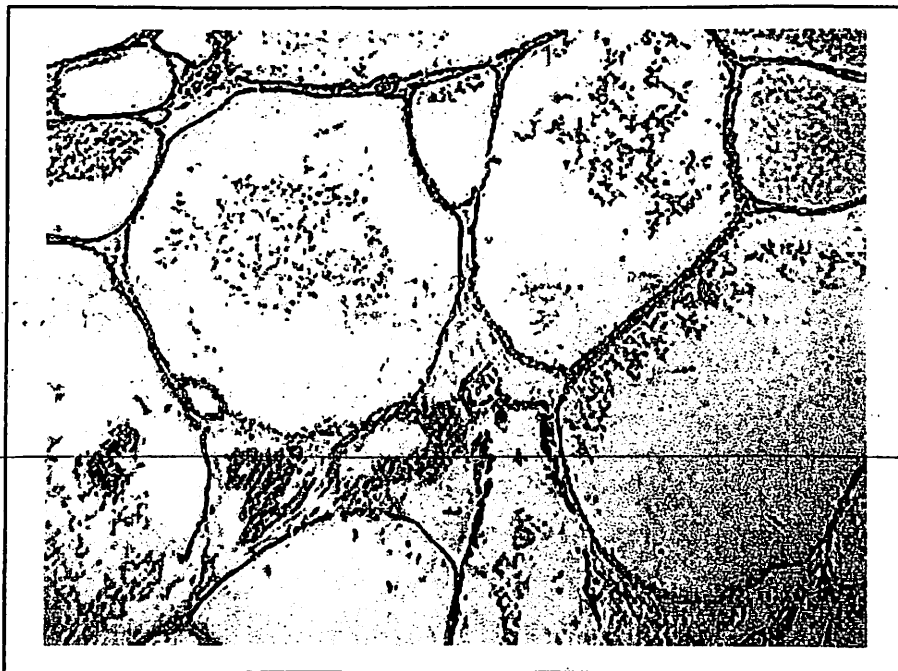


Plate 4.6 : RET/PTC IHC staining in papillary thyroid carcinoma showing strong (+3) cytoplasmic positivity in the tumour cells (Case No. 53; Magnification x 5)