

# Аутоантительные биомаркеры в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей щитовидной железы

К.В. Ланцаков<sup>1</sup>, П.В. Белоусов<sup>2</sup>, В.Э. Ванушко<sup>1</sup>,  
А.Ю. Абросимов<sup>1</sup>, Д.В. Купраш<sup>3</sup>, Н.С. Кузнецов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Москва,

<sup>2</sup>Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,

<sup>3</sup>Институт молекулярной биологии Российской академии наук, Москва

**Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-90480**

Ланцаков К.В. – врач-хирург отдела хирургии эндокринных органов ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ; Белоусов П.В. – научный сотрудник кафедры иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Ванушко В.Э. – доктор мед. наук, главный научный сотрудник отдела хирургии эндокринных органов ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Абросимов А.Ю. – доктор медицинских наук, профессор отделения патоморфологии ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ; Д.В. Купраш – профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции Института молекулярной биологии Российской академии наук, Кузнецов Н.С. – профессор, доктор мед. наук, заведующий отделом хирургии эндокринных органов ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ.

На сегодняшний день “золотым стандартом” в диагностике опухолей щитовидной железы (ЩЖ) является тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ). Однако ТАБ в 15–30% наблюдений не позволяет дифференцировать доброкачественную природу опухоли от злокачественной. В целях поиска дополнительных индикаторов в предоперационной дифференциальной диагностике опухолей ЩЖ нами исследован диагностический потенциал 3 кандидатных раково-ассоциированных антигенов в клинической группе 22 доброкачественных и 26 злокачественных опухолей ЩЖ. Чувствительность и специфичность метода составили 55–60 и 95–100% соответственно ( $p < 0,001$ , точный критерий Фишера). Таким образом, была разработана прототипная панель антигенов для дифференциальной диагностики опухолей ЩЖ, которую можно рассматривать как платформу для дальнейших разработок с целью повышения точности предоперационной диагностики рака ЩЖ.

**Ключевые слова:** фолликулярная опухоль, рак щитовидной железы, аутоантительные биомаркеры, тонкоигольная пункционная биопсия.

## Autoantibody profiling of benign and malignant thyroid tumors and design of a prototype diagnostic array

K.V. Lanshchakov, P.V. Belousov, V.E. Vanushko,  
A.Yu. Abrosimov, D.V. Kuprash, N.S. Kuznetsov

Lanshchakov K.V. – surgeon, surgery department of FSI ERC; Belousov P.V. – staff scientist, chair of immunology, Moscow State University; Vanushko V.E. – MD PhD, main researcher of surgery department of FSI ERC; Abrosimov A.Yu. – MD PhD, professor of pathology of FSI ERC; D.V. Kuprash, professor, Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Kuznetsov N.S. – MD PhD, professor, head of surgery department of FSI ERC



Ланцаков Кирилл Владимирович – 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ. E-mail: k.lanshakov@mail.ru

Currently the “gold standard” in diagnostics of thyroid tumors is a fine-needle aspiration cytology (FNAC). However, FNAC cannot discriminate between benign and malignant thyroid tumors in 15 to 30% of observations. In order to develop an additional tool for differential diagnostics of thyroid tumors we evaluated the diagnostic performance of 3-antigen serum autoantibody signature in groups of benign ( $n = 22$ ) and malignant ( $n = 26$ ) thyroid tumors using a dot-blot ELISA-based analysis. The sensitivity and specificity of resultant array were estimated to be 55–60% and 95–100%, respectively ( $p < 0.001$  according to one-sided Fisher Exact Test). Thus, we created a prototype antigen array for differential diagnostics of thyroid tumors which can be regarded as a platform for design of more complicated panel, highly sensitive in thyroid cancer detection, which can significantly improve the accuracy of preoperative diagnosis of thyroid cancer.

**Key words:** follicular neoplasm, thyroid cancer, cancer-associated antigens, fine-needle aspiration biopsy.

## Введение

Дифференцированный рак щитовидной железы (ДРЩЖ) является наиболее частой злокачественной опухолью эндокринных желез и составляет 1–4% от всех злокачественных новообразований человека [16, 18]. Ведущим методом диагностики ДРЩЖ является тонкоигольная пункционная биопсия с последующим цитологическим исследованием пунктата. Но у этого метода в 15–30% случаев возникают определенные ограничения в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей, имеющих сходную цитологическую картину (фолликулярный рак, фолликулярная аденома, фолликулярный вариант папиллярного рака). При этом цитологический диагноз формулируется как “фолликулярная опухоль” или “фолликулярная неоплазия”, что является показанием к оперативному лечению [6, 15]. Окончательный диагноз может быть поставлен только по результатам планового гистологического исследования удаленного материала. Только 10–15% таких опухолей окажутся злокачественными. Соответственно, для выявления одного случая рака ЩЖ необходимо прооперировать от 7 до 10 больных, в действительности не нуждающихся в оперативном лечении. Поэтому поиск биомаркеров для точной дооперационной дифференциальной диагностики фолликулярных опухолей ЩЖ является весьма актуальной задачей.

## Материал и методы

В исследование включены 48 пациентов от 20 до 70 лет с узловыми поражениями ЩЖ более 1 см, оперированные в ФГБУ Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ в 2008–2009 гг. Все больные были разделены на 2 группы в зависимости от клинического диагноза, основанного на результатах планового гистологического исследования: в 1-ю группу включили 26 больных с ДРЩЖ, во 2-ю группу вошли 22 пациента с фолликулярными аденомами ЩЖ.

По результатам пункционной биопсии пациенты были распределены следующим образом: с ДРЩЖ – 13, с фолликулярной опухолью (фолликулярная неоплазия) – 35 больных. Клинические характеристики пациентов, включенных в исследование, приведены в табл. 1.

В исследование включали пациентов без онкологического анамнеза, с отрицательными результатами исследования в отношении ВИЧ-инфекции и гепатитов В и С.

Для определения аутоантительных биомаркеров использовали панель из трех рекомбинантных аутоантигенов – ANKRD30A/NY-BR-1, RGS5 и KIAA1864/HYDIN2, ранее идентифицированных нами при серологическом анализе аутоантигенного репертуара дифференцированных опухолей ЩЖ как мишени противоопухолевого гуморального иммунного ответа (П.В. Белоусов и соавт.,

**Таблица 1.** Клинико-демографические характеристики пациентов, включенных в исследование

	Цитология	Число больных	Возраст – медиана (размах), годы	Пол (ж : м)
ДРЩЖ	ПРЩЖ – 16, ФН – 10	26	46 (25–64)	21 : 5 (4,2)
ФАЩЖ	ФН	22	42 (22–69)	18 : 4 (4,5)

*Примечание.* ФН – фолликулярная неоплазия, ФАЩЖ – фолликулярная аденома ЩЖ, ПРЩЖ – папиллярный рак ЩЖ.

**Таблица 2.** Диагностические характеристики выбранных антигенов, их комбинаций и регрессионной модели

	DSn*	DSp	DAc	p-уровень		
				ДРЦЖ против ФАЦЖ	ФАЦЖ против УЗД	ДРЦЖ против ФАЦЖ+УЗД
ANKRD30A	5/26 (19%)	22/22 (100%)	27/48 (56%)	0,038	>0,99	0,0042
HYDIN2	5/26 (19%)	22/22 (100%)	27/48 (56%)	0,038	>0,99	0,0042
RGS5	5/26 (19%)	21/22 (95%)	26/48 (54%)	0,14	0,76	0,02
ANKRD30A+HYDIN2+RGS5	13/26 (50%)	21/22 (95%)	34/48 (71%)	<0,001	0,76	0
Логистическая регрессионная (ЛР) – модель с учетом возраста и цитологии	15/15 (100%)	13/20 (65%)	28/35 (80%)	<0,001	–	–

Примечание. DSn, DSp и DAc – диагностическая чувствительность, специфичность и точность соответственно.

статья готовится к печати). Аутоантитела к кандидатным аутоантигенам детектировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в формате гибридизации в точке на нитроцеллюлозном носителе (dot-ELISA). Количественную обработку данных, полученных при dot-ELISA-анализе, проводили с использованием программы Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics).

Анализ достоверности отличий в частотах реактивности индивидуальных антигенов в исследуемых группах проводили с помощью одностороннего критерия точной вероятности Фишера с поправкой Бонферрони в случае множественных сравнений. Для построения диагностического алгоритма использовали логистический регрессионный анализ с одновременным включением переменных и последующим ROC (Receiver Operating Characteristic)-анализом. Все расчеты проводили с использованием пакета статистических программ SPSS Statistics версии 17.0.

### Результаты и их обсуждение

Для идентификации аутоантигенов, вызывающих гуморальный иммунный ответ у пациентов с ДРЦЖ, мы применили подход, основанный на одновременной полуколичественной детекции аутоантител ко множеству антигенов с помощью гибридизации с рекомбинантными антигенами в точке на носителе (dot-ELISA-анализ) (П.В. Белоусов и соавт., статья готовится к печати). В резуль-

тате проведенного анализа мы отобрали антигены, удовлетворяющие следующим критериям:

- наличие аутоантител в среднем и высоком титре не менее чем у 10% пациентов с ДРЦЖ;
- общая реактивность в группе ДРЦЖ, включая ответы в низком титре, не менее 15%;
- общая реактивность в группе пациентов с доброкачественными узловыми образованиями ЦЖ не более 5%.

Данным критериям удовлетворяли три антигена: ANKRD30A/NY-BR-1, HYDIN2/KIAA1864 и RGS5 (табл. 2).

При использовании всех трех антигенов в виде единой диагностической панели показатели диагностической чувствительности, специфичности и точности составили 58; 95 и 75% соответственно (см. табл. 2).

Для повышения относительно низкой диагностической чувствительности в подгруппе пациентов с цитологическим диагнозом “фолликулярная неоплазия” мы провели логистическое регрессионное моделирование с включением в первоначальную грубую модель таких факторов, как возраст, пол и наличие цитологических изменений, подозрительных в отношении малигнизации. За исключением пола, все остальные факторы демонстрировали высокую предиктивную мощь и были включены в финальную модель (табл. 3). Для оценки диагностической

Таблица 3. Характеристики грубой и уточненной ЛР-моделей

	Коэффициент В		Стандартная ошибка		Статистика Вальда		р-уровень	
	ГМ***	УМ****	ГМ	УМ	ГМ	УМ	ГМ	УМ
RGS5+ANKRD30A+HYDIN2*	4,477	4,214	1,716	1,556	6,803	7,338	0,009	0,007
Цитология**	2,697	2,452	1,232	1,166	4,789	4,425	0,029	0,035
Возраст (годы)	-0,093	-0,088	0,049	0,046	3,697	3,668	0,055	0,055
Пол (1 – ж., 0 – м.)	0,994	–	1,152	–	0,744	–	0,388	–

\* Наличие аутоантител хотя бы к одному из трех антигенов (наличие – 1, отсутствие – 0).

\*\* Наличие на цитограмме пунктата изменений, подозрительных в отношении малигнизации (наличие – 1, отсутствие – 0).

\*\*\* ГМ – грубая модель. \*\*\*\* УМ – уточненная модель.

ценности полученной модели и определения оптимального порогового значения логистической вероятности мы применили ROC (Receiver Operating Characteristic)-анализ. При выбранном уровне отсечения показатели диагностической специфичности, чувствительности и точности составили 100; 65 и 80% соответственно.

Для проверки устойчивости моделирования была применена перекрестная проверка с одним отделяемым наблюдением (Leave-One-Out Cross-Validation). Кросс-валидированные диагностические характеристики при том же уровне отсечения совпали с таковыми для полной выборки, а корреляция изначальных и кросс-валидированных значений логистической вероятности для индивидуальных случаев была высокой ( $R^2 = 0,99$ ). Все это указывает на высокую устойчивость моделирования и потенциальную применимость созданной модели для дифференциальной диагностики фолликулярных опухолей ЩЖ.

В настоящее время идентифицировано множество биомаркеров, и многие из них продемонстрировали весьма обнадеживающие результаты в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей ЩЖ [4, 5, 7, 9, 10]. В то же время работы по идентификации циркулирующих биомаркеров начали появляться лишь в течение последних нескольких лет. Единственный циркулирующий биомаркер ДРЩЖ, а именно сывороточный тиреоглобулин, обладает диагностической ценностью лишь в отношении мониторинга заболевания исключительно после радикального удаления всей ткани ЩЖ (тиреоидэктомия) и непригоден для дооперационной

дифференциальной диагностики [27]. В настоящей работе мы впервые изучили возможность использования для этих целей циркулирующих антител к опухолеассоциированным аутоантигенам.

Аутоантитела, специфичные к опухолеассоциированным антигенам, в настоящее время являются одним из наиболее интенсивно изучаемых классов биомаркеров злокачественных опухолей [2, 3, 7, 8, 13, 29, 38]. По сравнению с классическими циркулирующими биомаркерами, представляющими собой “прямые” репортеры канцерогенеза (биологические субстанции, напрямую секретируемые опухолевыми клетками), аутоантитела являются своего рода “непрямыми” репортерами, отражающими реакцию иммунной системы на происходящие в опухоли молекулярные изменения [10, 11, 20, 25]. К преимуществам аутоантительных биомаркеров по сравнению с классическими секретируемыми опухолями гликопротеинами следует отнести высокую стабильность иммуноглобулинов G в пробах сыворотки и плазмы крови, высокое время полужизни, минимальные концентрационные флуктуации в зависимости от времени суток, приема лекарственных препаратов и других факторов и отсутствие специфических требований к забору материала и пробоподготовке [4]. Также важнейшим преимуществом аутоантительных биомаркеров является высокая (в типичных случаях – 90–100%) диагностическая специфичность в отношении очага злокачественного роста [7, 37, 38]. В то же время низкие показатели диагностической чувствительности (в типичных случаях – не более 10–20%) не позволяют использовать

данные субстанции в качестве индивидуальных биомаркеров. Эту проблему отчасти позволяет решить объединение нескольких антигенов в единую панель. Так, в нашем исследовании объединение трех антигенов в единую панель позволило значительно повысить диагностическую чувствительность при весьма незначительном снижении специфичности.

Еще одним важным аспектом аутоантительных биомаркеров является то, что соответствующие мишени аутоиммунного ответа представляют собой привлекательные цели-мишени для антигенспецифичной иммунотерапии. Многие аутоантигены, изначально идентифицированные как мишени В-клеточного иммунного ответа, в настоящее время проходят клинические испытания в различных протоколах терапевтической вакцинации, направленных на индукцию эффективного Т-клеточного (цитолитического) противоопухолевого ответа при различных злокачественных опухолях человека (меланома, рак почки, колоректальный рак и др.) [3, 15, 19, 36]. Применительно к ДРЩЖ указанные подходы могут оказаться актуальными в контексте лечения метастатических опухолей, рефрактерных к радиойодтерапии.

## Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании мы идентифицировали три мишени гуморального иммунного ответа у пациентов с ДРЩЖ, сывороточные аутоантитела к которым обладают дискриминирующей способностью в отношении фолликулярных опухолей ЩЖ, и продемонстрировали возможность улучшения диагностических характеристик идентифицированных биомаркеров с помощью логистического регрессионного моделирования.

В дальнейшем идентифицированные объекты и использованный подход могут стать основой для дополнительного диагностического метода, предназначенного для предоперационной стратификации пациентов с цитологическим диагнозом “фолликулярная неоплазия” в соответствии с риском злокачественного поражения ЩЖ и формирования группы низкого риска, в которой отказ от операции будет оправдан. В то же

время следует отметить, что настоящее исследование носит в значительной степени характер “proof of principle” в силу небольшого размера выборки и заведомо смещенного в сторону известных мишеней противоопухолевого ответа. Без сомнения, требуются дальнейшие исследования с использованием скрининговых (протеомные методы, экспрессионные библиотеки) подходов для идентификации новых и, возможно, клинически и биологически более релевантных объектов на независимых объемных выборках пациентов с фолликулярными опухолями ЩЖ в хорошо спланированных проспективных исследованиях.

## Список литературы

1. Adeniran A.J., Zhu Z., Gandhi M. et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30 (2): 216–222.
2. Au A.Y., McBride C., Wilhelm K.G. Jr. et al. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) disrupts normal PAX8 or PPARgamma transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* 2006; 147 (1): 367–376.
3. Begum S., Rosenbaum E., Henrique R. et al. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod. Pathol.* 2004; 17 (11): 1359–1363.
4. Brown L.M. et al. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol. Carcinog.* 2006; 45. (8): 613–626.
5. Cakir M., Grossman A.B. Medullary thyroid cancer: molecular biology and novel molecular therapies. *Neuroendocrinology* 2009; 90 (4): 323–348.
6. Cap J., Ryska A., Rehorkova P. et al. Sensitivity and specificity of the fine needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1999; 51, 509–515.
7. Chiappetta G., Toti P., Cetta F. et al. The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocyctic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocyctic hyperplastic lesions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87 (1): 364–369.
8. Ciampi R., Nikiforov Y.E. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007; 148 (3): 936–941.
9. Ciampi R., Giordano T.J., Wikenheiser-Brokamp K. et al. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* 2007; 14 (2): 445–452.
10. Ciampi R., Knauf J.A., Kerler R. et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (1): 94–101.

11. Du Villard J.A., Schlumberger M., Wicker R. et al. Role of ras and gsp oncogenes in human epithelial thyroid tumorigenesis. *J. Endocrinol. Invest.* 1995; 18 (2):124–126.
12. Fagin J.A., Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 22 (6): 955–969.
13. Fan Y., Shi L., Liu Q. et al. Discovery and identification of potential biomarkers of papillary thyroid carcinoma. *Mol. Cancer.* 2009.
14. Ghossein R.A., Leboeuf R., Patel K.N. et al. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma without extrathyroid extension: biologic behavior and clinical implications. *Thyroid.* 2007; 17, 655–661.
15. Greenspan F.S. The role of fine-needle aspiration biopsy in the management of palpable thyroid nodules. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997; 108: S26–S30.
16. Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T., Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J.Clin.* 2001; 51, 15–36.
17. Gregory Powell J., Wang X., Allard B.L. et al. The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition. *Oncogene.* 2004; 23 (20): 3634–3641.
18. Hundahl S.A., Fleming I.D., Fremgen A.M., Menck H.R. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995. *Cancer* 1998; 83: 2638–2648.
19. Johannes L. Bos. RAS oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682–4689.
20. Kim J., Giuliano A.E., Turner R.R. et al. Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann. Surg.* 2006; 244 (5): 799–804.
21. Kroll T.G., Sarraf P., Pecciarini L. et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000; 289:1357–1360.
22. Lui W.O., Zeng L., Rehrmann V. et al. CREB3L2-PPAR gamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis. *Cancer. Res.* 2008; 68 (17): 7156–7164.
23. Netea-Maier R.T., Hunsucker S.W., Hoevenaars B.M. et al. Discovery and Validation of Protein Abundance Differences between Follicular Thyroid Neoplasms. *Cancer Research* 2008; 68: 1572.
24. Nikiforov Y.E., Nikiforova M.N., Gnepp D.R., Fagin J.A. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene.* 1996; 13 (4): 687–693.
25. Nikiforova M.N., Kimura E.T., Gandhi M. et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88 (11): 5399–5404.
26. Nikiforov Y.E., Rowland J.M., Bove K.E. et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res.* 1997; 57 (9): 1690–1694.
27. Pacini F., Schlumberger M., Dralle H. et al. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur. J. Endocrinol.* 2006;154: 787–803.
28. Pasca di Magliano M., Di Lauro R., Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 21;97(24):13144-9. carcinoma [corrected]. *Science* 2000; 289 (5483):1357–1360. Erratum in: *Science* 2000; 289 (5484): 1474.
29. Placzkowski K.A., Reddi H.V., Grebe S.K. et al. The Role of the PAX8/PPARgamma Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *PPAR Res.* 2008; 29: 672829.
30. Reddi H.V., Mclver B., Grebe S.K., Eberhardt N.L. The paired box-8/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma oncogene in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007; 148 (3): 932–935.
31. Riesco-Eizaguirre G., Gutierrez-Martinez P., Garcia-Cabezas M.A. et al. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane. *Endocr. Relat. Cancer* 2006; 13 (1): 257–269.
32. Saavedra H.I., Knauf J.A., Shirokawa J.M. et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene.* 2000; 19 (34): 3948–3954.
33. Saenko V., Rogounovitch T., Shimizu-Yoshida Y. et al. Novel tumorigenic rearrangement, Delta rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. *Mutat Res.* 2003; 527 (1–2): 81–90.
34. Salajegheh A., Petcu E.B., Smith R.A., Lam A.K. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a diagnostic challenge for clinicians and pathologists. *Postgrad. Med. J.* 2008; 84: 78–82.
35. Santoro M., Papotti M., Chiappetta G. et al. RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87 (1): 370–379.
36. Suarez H.G. Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1998; 48 (5): 531–546.
37. Trovisco V., Vieira de Castro I., Soares P. et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J. Pathol.* 2004; 202 (2): 247–251.
38. Wojciechowska K., Lewinski A. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Regul.* 2006; 40 (4): 129–138.