

ЕКСПРЕСІЯ МРНК RET/PTC1/3 ТА BRAF^{WT/V600E} У ПУХЛИНАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ*

Гуда Б. Б., Пушкарьов В. М., Журавель О. В., Коваленко А. Є., Тарасенко Ю. М., Тронько М. Д.

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України»,
м. Київ, Україна
pushkarev.um@gmail.com

Проліферативні процеси у клітинах контролюються двома основними каскадами R13K/Akt та кіназами, що активуються мітогенами (MAPK) [1, 2]. Останній каскад контролює власне поділ клітини. Визначення проліферативного потенціалу пухлинних клітин — важливе завдання для оцінки агресивності пухлини. Раніше нами було продемонстровано значне збільшення вмісту ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у пухлинах щитоподібної залози (ЩЗ), особливо в агресивних пухлинах з метастазами, що свідчить про суттєве посилення проліферативних процесів [3, 4]. Мітогенний сигнальний шлях Ret/Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK-каскад) — пов'язує сигнали факторів росту на рецепторах клітинної поверхні з транскрипційними факторами, що регулюють експресію генів, які контролюють такі важливі клітинні процеси, як ангиогенез, ріст і проліферацію

клітин [2]. Цей сигнальний шлях часто є конститутивно активованим в деяких пухлинах в результаті хромосомних транслокацій RET/PTC, мутацій в генах BRAF (BRAF^{V600E}), RAS, деяких рецепторів цитокінів або надмірної експресії нормальних і мутованих рецепторів, таких як EGFR [5, 6]. В основі патогенезу раку щитоподібної залози (ЩЗ) також лежить неконтрольована активність різних сигнальних шляхів і, в першу чергу — MAPK-каскаду [7, 8]. Пригнічення цього каскаду специфічними інгібіторами посилює чутливість ракових клітин (в тому числі і карцином ЩЗ) до хіміотерапії [9, 10].

Сучасний тренд онкоендокринології — це пошук молекулярних маркерів агресивності пухлини. Знаючи їх, можна більш точно розрахувати об'єм оперативного втручання та дозу радіоактивного йоду. За мету роботи ставилося вивчення хромосомних

* Роботу виконано в межах планової наукової тематики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України» «Вивчення ролі ядерних транскрипційних чинників у опосередкуванні зовнішніх регуляторних механізмів в клітинах пухлин ендокринних органів» (державний реєстраційний № 0114U002155).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують повну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 17.01.2017.

транслокацій *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та мутацій *B-RAF (BRAF_{V600E})* в тканині багато-

вузлового зобу, фолікулярних та папілярних карциномах ЩЗ людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилися на післяопераційному матеріалі 29 хворих, одержаному у хірургічному відділенні Інституту. З них 10 з інкапсульованою РТС (ІРТС), 9 з неінкапсульованою РТС (НРТС), 3 з фолікулярною карциномою (ФТС), 4 з фолікулярною аденомою (ФА) та 3 з багатовузловим зобом (МНГ). Всі пацієнти перед оперативним втручанням підписували інформовану згоду на використання постоперативного матеріалу для наукових досліджень. Одразу ж після видалення тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при -80°C . Гістологічне заключення та його номер отримували з клінічної бази тканин ЩЗ ІЕОР. За умовно нормальну тканину щитоподібної залози приймали тканину, що за морфологічними критеріями не відрізнялася від нормальної.

Виділення та аналіз РНК.

РНК виділяли за допомогою наборів фірми «Qiagen» (США) згідно протоколу виробника. Тканину вагою біля 25 мг гомогенізували в 500 мкл лізис-буферу RLT, що містить гуанідин ізотіоціанат, в гомогенізаторі «TissueLyser» II MM200 фірми «Retsch» (ФРН) протягом 2 хв. Вміст пробірок центрифугували протягом 15 сек. Для виділення РНК до 320 мкл гомогенату додавали ще по 150 мкл буферу RLT, розводили з 590 мкл води без РНКаз та додавали 10 мкл готового розчину протеїнази К з набору. Суміш перемішували, інкубували при 55°C 10 хв і центрифугували в настільній центрифугі фірми «Eppendorf» (США) в стандартному кутовому роторі при 13000 об/хв протягом 3 хв. Супернатант (прибл. 1 мл) відбирали і додавали половину об'єму (до 0,5 мл) 96–100 % етанолу. Суміш перемішували і вміст пробірок переносили на спеціальну колонку. Після центрифугування колонок РНК залишалося на фільтрі. Фільтр промивали 350 мкл буферу RW1 (що містить солі гуанідину, етанол, і використовується для ефективного видалення вуглеводів, білків, жирних кислот та ін., які неспецифічно зв'язуються

з фільтром). Потім наносили ДНКазу в буфері RDD (склад і концентрації солей буферу забезпечують ефективне розщеплення ДНК, а також створюють умови для затримки РНК на колонці), інкубували при кімнатній температурі 15 хв і знову промивали буфером RW1. Після центрифугування протягом 15 сек при максимальній швидкості ротора і заміни пробірок для збирання центрифугату, фільтр двічі промивали буфером RPE (буфер для м'якої промивки, що містить етанол, для видалення слідів солей, які знаходяться на колонці), просушували центрифугуванням, переносили в конічну пробірку об'ємом 1,5 мл і розчиняли очищену РНК у 50 мкл води без РНКаз. Зберігали при -80°C . Контроль якості одержаних РНК здійснювали за допомогою спектрофотометра «Nanodrop» («Thermo Fisher Scientific Inc», США), капілярного електрофорезу на РНК-наночіпах у біоаналізаторі «Agilent-2100» («Agilent Technologies», США) та електрофорезу в 1 % агарозному гелі з додаванням у гель флуоресцентного барвника SYBRgreen або етидид бромід.

Аналіз експресії мРНК RET/PTC-1, RET/PTC-3 та B-Raf (wt/mut) методом ЗТ-ПЛР та методом ПЛР у реальному часі.

ПЛР. Реакцію зворотної транскрипції (ЗТ) проводили (ампліфікатор — «GeneTech» фірми «Stuart scientific») в реакційній суміші, що містила: стандартний буфер для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), 5 мМ хлористого магнію, по 1 мМ всіх дНТФ, інгібітор РНКаз (1 од/мкл), зворотну транскриптазу (2,5 од/мкл) («Sigma», США), суміш випадкових гексамерів (2,5 мкМ) та 1 мкг екстрагованої РНК. Інкубація проводилась за таких умов: 22°C — 10 хв, 42°C — 15 хв, 99°C — 5 хв, 4°C — 5 хв. Реакційна суміш для ПЛР містила 2,5 мкл кДНК, 2 мМ кожного з нуклеотидів, 2 мМ MgCl_2 , 1 о. а. Таq-ДНК полімерази, буфер (50 мМ Tris HCl pH 8.6, 50 мМ KCl, 0,1 % Tween-20) та по 15 рМ кожного праймера. Продукти ПЛР аналізували методом електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі з дода-

ванням у гель флуоресцентного барвника SYBRgreen або етидид броміду.

Кількісна ПЛР. Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням 1 мкМ оліго dT18 праймера, 2 мкг загальної РНК, 500 мкМ кожного дНТФ, 1 од./мкл зворотної транскриптази, 1 од./мкл інгібітора РНКаз та стандартного буферу в термоциклері «GeneAmp PCR System 2720» («Applied Biosystems», США).

2,5 мкл кДНК використовували для в 20 мкл реакційної суміші з SYBRgreen/Rox qPCR мастер-мікс («Thermo Fisher Scientific Inc», США). Для визначення експресії мРНК в зразках пухлинної тканини кількісну ПЛР проводили з наступними праймерами: *RET/PTC-1*: прямий — 5'-GAGCT-

GGAGACCTACAAACTGA-3', зворотній — 5'-CGTTGCCTTGACCACTTTTC-3'; *RET/PTC-3*: прямий — 5'-AAACCTGCCAGTGGTTATCAAG-3', зворотній — 5'-TCGCCTTCTCCTAGAGTTTTC-3'; *BRAFwt*: прямий — 5'-TAGGTGATT-TGGTCTAGCTACAGT-3'; *BRAFmut*: прямий — 5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGA-3'; зворотній *BRAF-R*: 5'-TCTGACTGAAAGC-TGTATGGATT-3'. Інтенсивність експресії бета-2-мікроглобуліну використовували як внутрішній контроль. Всі реакції проводили тричі при наступних умовах: 95 °C — 10 хв, і далі 40 циклів — 95 °C — 15 с та 60 °C — 40 с. Специфічність кількісної ПЛР визначали за допомогою аналізу кривих плавлення. Відносний рівень експресії мРНК рахували по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використання мініколонок фірми «Qiagen» забезпечує невисокий вихід РНК, але достатню ступінь її очистки від білка (A260/A280 ~ 2,0), ДНК та вуглеводів для подальшого аналізу молекулярно-генетичними методами. Аналіз РНК методом капілярного електрофорезу засвідчив її високу цілісність з показниками RIN (RNA integrity number) у межах 7,4–8,3, що наближається до значень позитивного контролю (клітини феохромоцитоми PC-12) та свідчить про відсутність суттєвої деградації РНК (рис. 1 А, Б).

Перебудови генів рецепторної тирозинкінази *RET* та мутації протеїнкінази *BRAF* були відсутні в тканинах багатовузлового зобу (MNG) та фолікулярної аденоми. У зразку 616T/N (багатовузловий зоб, 3 стадія) спостерігалась посилена експресія *BRAFwt* (не показано).

Аналіз післяопераційного матеріалу хворих на папілярний та фолікулярний рак ЩЗ виявив зміни експресії, наявність мутацій та перебудов генів у 11 зразках. Зразки з гістологічними номерами 173, 245, 367 та 396 були взяті з неінкапсульованих, інвазивних папілярних карцином (NPTC); зразки 130 та 352 — з інкапсульованих, неінвазивних пухлин папілярного раку (IPTC); зразок 479 — фолікулярна карцинома (FTC).

Попередньо визначали наявні мутації методом звичайної ЗТ-ПЛР, яка дозволяє

виявити експресію мутованих генів та генів дикого типу без її кількісної оцінки. Посилена експресія *BRAF* спостерігалась у зразках 173T/N, 130N, 479T. Мутація *BRAF* виявлена у зразку 352T (IPTC) та в клітинах лінії TPC1, що походять з папілярної карциноми (рис. 2). Мутований *BRAF* був виявлений також у зразку 130T (IPTC), причому в цьому ж зразку відмічено надекспресію і *BRAFwt* (не показано).

Перебудови *RET/PTC1* спостерігались у зразках 173T, 367T/N, 396T, 245T. Перебудови *RET/PTC3* відмічені в клітинах лінії TPC1 та зразках 245T і 352T (рис. 2).

Оскільки звичайна ЗТ-ПЛР не надає кількісної оцінки експресії генів, наступним завданням було застосування для аналізу мутацій і перебудов кількісної ПЛР (ПЛР у реальному часі). З рис. 3 видно, що вища інтенсивність експресії *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у пухлинній тканині спостерігається у неінкапсульованих пухлинах (NPTC1-3). Середнє значення експресії NPTC складає $2,38 \pm 0,67$ проти $1,15 \pm 0,05$ у IPTC.

Переваги методу кількісної ПЛР щодо методу звичайної ПЛР виразно проявляються на зразку 367 (NPTC2). Як видно з рис. 2, перебудова *RET/PTC1* з однаковою інтенсивністю експресії спостерігається і в пухлинній і в нормальній тканинах цього зразка. Проте кількісна ПЛР демонструє більш ніж 3,5-кратне зростання

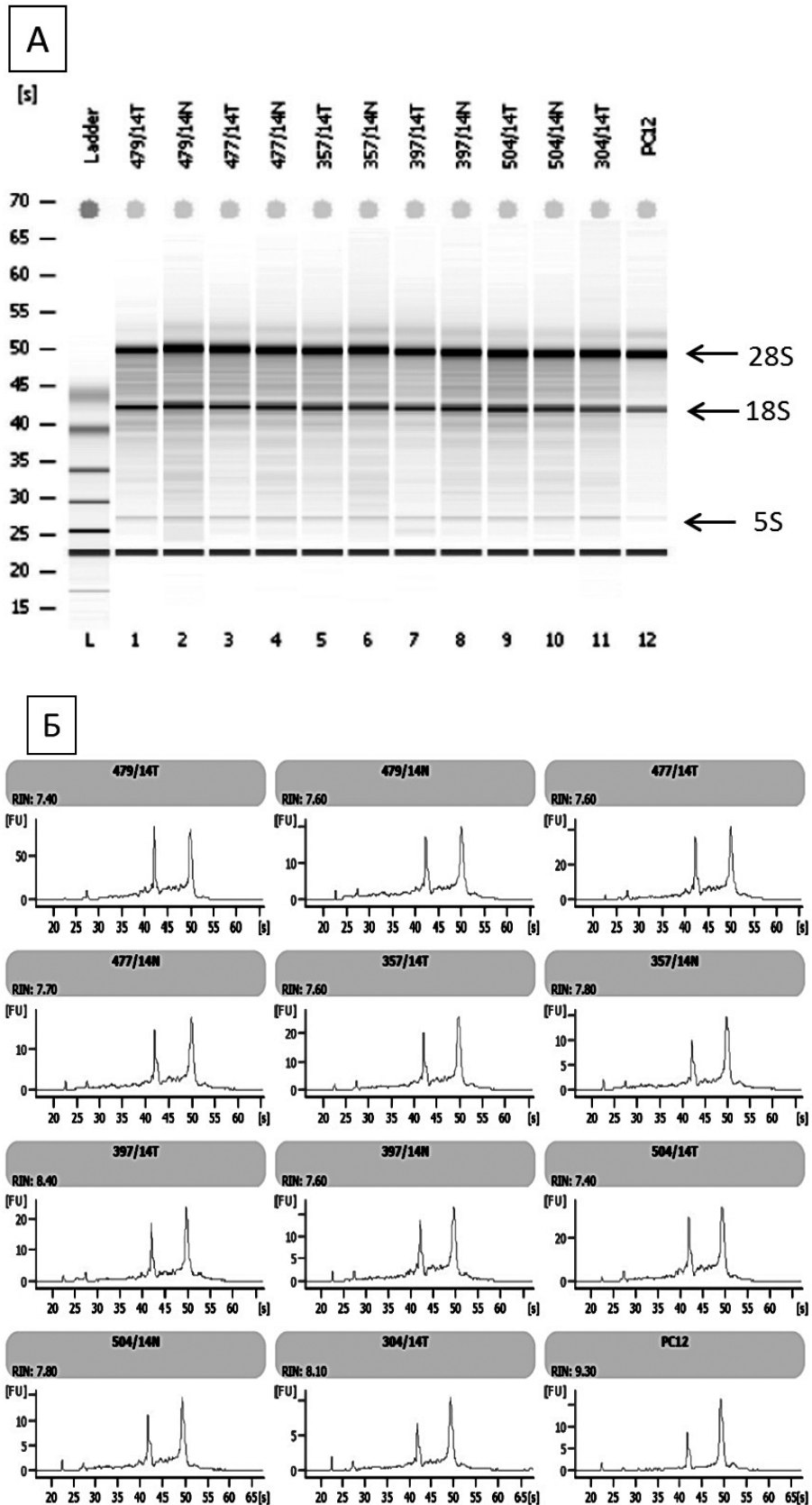


Рис. 1. Аналіз деяких зразків екстрагованої з тканини ЩЗ РНК методом капілярного електрофорезу.

А – розділення РНК за розмірами молекул. L (ladder) – маркери РНК.

Б – оцінка ступеня цілісності (RIN) одержаної РНК за співвідношенням 28S/18S/5S.

PC12 – позитивний контроль.

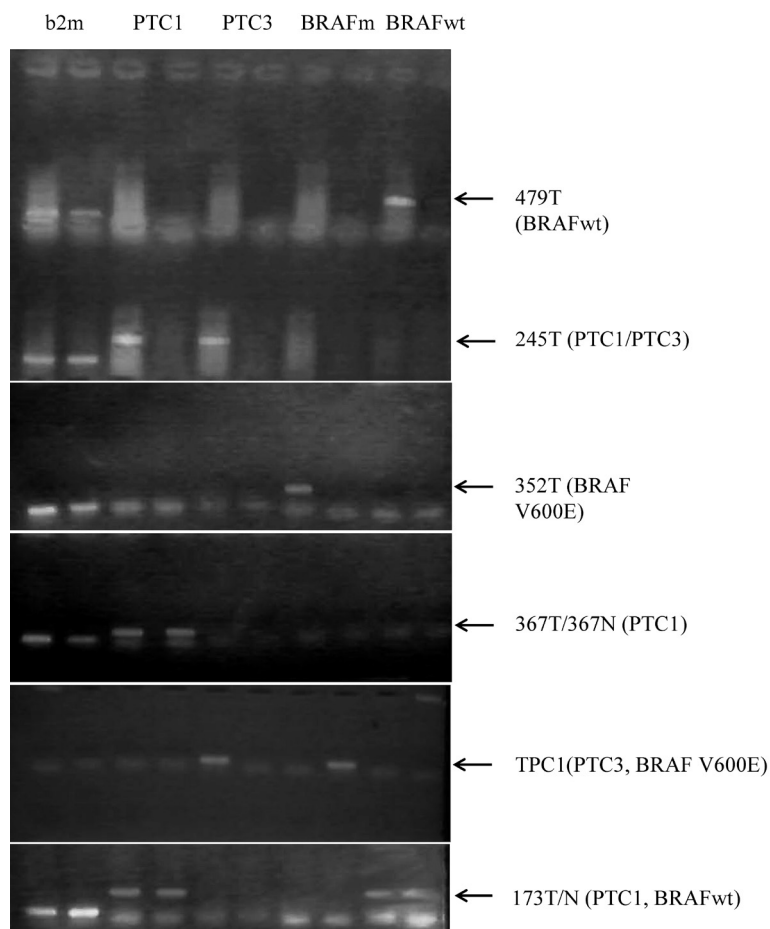


Рис. 2. Приклади визначення мутацій, перебудов та експресії генів *RET/PTC-1*, *RET/PTC-3* та *B-Raf* (wt/mut) в пухлинах ЩЗ методом ЗТ/ПЛР. FTC — зразок 479T, 245T-NPTC1, 352T-IPTC1, 367N/T-NPTC2, TPC1 — культивовані клітини папілярної карциноми. (Т – пухлина, N – умовно нормальна, незмінена тканина). Пояснення у тексті.

експресії *RET/PTC1* у пухлинній тканині у порівнянні з нормальною (рис. 3).

Одночасна експресія онкогенів в умовно нормальній та пухлинній тканині може пояснюватись контамінацією нормальної пухлини клітинами пухлини, а також тим, що нормальна тканина береться у хворої людини і є умовно нормальною тільки за морфологічними, а не біохімічними критеріями.

Потрібно відмітити, що зразок NPTC1 (245T) містив обидві перебудови *RET/PTC1* та *RET/PTC3* (рис. 2), хоча, як показав метод ПЛР у реальному часі, більш інтенсивною була експресія *RET/PTC3*. Такі подвійні перебудови в папілярних карциномах зустрічаються рідко ~ 1 % [12], свідчать про агресивність пухлини і характеризуються гіршим прогнозом. Вважається також, що *RET/PTC3*-позитивні карциноми

є більш інвазивними [7]. Крім того, перебудова *RET/PTC1* та підвищена експресія немутованої протеїнкінази *BRAF* (*BRAFWt*) одночасно спостерігалися у зразку 173, де було діагностовано оксифільноклітинну папілярну карциному з багатофокусним ростом, яка є більш агресивною формою карциноми (рис. 2). Можливо посилення експресії *BRAFWt* є наслідком перебудови *RET/PTC1*.

Мутації гена *BRAF* спостерігали у зразках 130T, 352T та 396T. Особливо інтенсивною експресією характеризувався зразок 130T, в якому рівень мРНК мутованого гена перевищував норму більш ніж у 20 разів (рис. 3).

Цікаві дані отримано в зразку 479T пухлинної тканини фолікулярної карциноми де ступінь експресії *BRAFWt* перевищував норму в 16 разів (рис. 3). Останній факт ви-

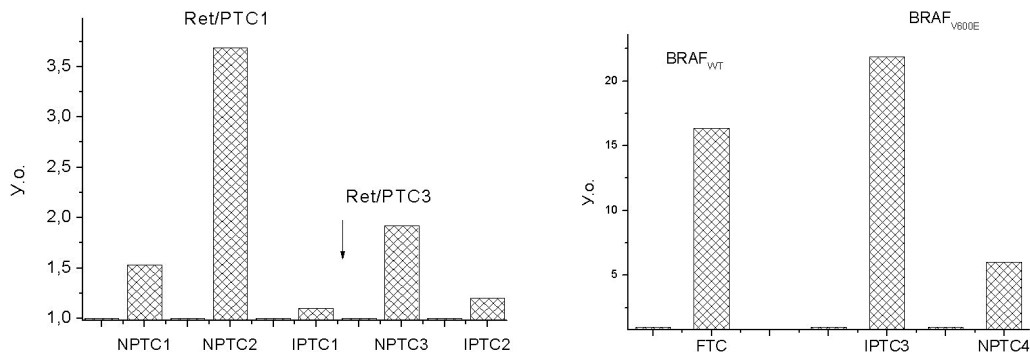


Рис. 3. Кількісний аналіз експресії мРНК *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та *BRAF* (wt/V600E). Абсциса — тип післяопераційної тканини. NPTC1-4 — гістологічні номери 173, 245, 367 та 396 — неінкапсульовані папілярні карциноми; IPTC — зразки 130 та 352 з інкапсульованих, неінвазивних пухлин папілярного раку; FTC — зразок 479 — фолікулярна карцинома. Ордината — рівень експресії гена у пухлині в умовних одиницях, нормалізований щодо експресії бета-2-мікроглобуліну та умовно нормальної тканини (лівий стовпчик для кожного зразка).

кликає інтерес, оскільки експресія PCNA у цих же зразках пухлини не відрізнялася від нормальної тканини, а кількість і активність ERK1/2 (протеїнкінази, що знаходиться нижче від BRAF в сигнальному ланцюгу) у нормальній тканині була вище ніж у пухлині [3, 4]. В попередніх роботах ми відмічали факт так званої токсичності онкогенів — явища, при якому продукти онкогенів, що спричинили утворення пухлини, гальмують ріст вже сформованої пухлини, викликають сенесценцію та апоптоз пухлинних клітин. У цьому випадку пухлина продукує спеціальні білки, такі як білок теплового шоку морталін, що захищають пухлину від токсичних продуктів

онкогенів шляхом пригнічення у пухлині експресії і активності протеїнкіназ MAPK-каскаду [4, 13–15]. З одержаних даних стає очевидним, що пригнічення MAPK-каскаду реалізується на рівні останньої протеїнкінази каскаду — ERK1/2. Таке пригнічення могло б відбуватися також на рівні другої протеїнкінази каскаду — MEK, проте той факт, що знижується не тільки активність, але й кількість ERK1/2 [4] (за рахунок гальмування експресії або посилення деградації білка), свідчить, що саме ERK є мішенню інгібуючих факторів. Можливо надекспресія *BRAFwt* є компенсаторною реакцією клітин на пригнічення експресії та інактивацію ERK1/2.

ВИСНОВКИ

1. Інтенсивність експресії *RET/PTC1* або *RET/PTC3*, а також наявність обох перебудов може свідчити про агресивність, інвазивність пухлини.
2. Дослідження експресії *RET/PTC1* та *RET/PTC3*, як додаткових молекулярних

маркерів агресивності папілярних карцином, може бути корисним для більш точного розрахунку об'єму оперативного втручання та визначення подальших лікувальних процедур.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, Purohit R. *Sci World J* 2013; 2013(756134):1-6. doi: 10.1155/2013/756134.
2. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. *J Clin Oncol* 2005; 23:6771-6790. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.036>
3. Guda BB, Pushkar'ov VV, Zhuravel' OV, et al. *Dopovidi NAN Ukrainy* 2015; 10:93-97. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.10.093>
4. Guda BB, Pushkarev VM, Pushkarev VV, et al. *J Endocrinol Metab* 2015; 1 (1002):1-5.
5. Caronia LM, Phay JE, Shah MH. *Clin Cancer Res* 2011; 17(24):7511-7517. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1155>
6. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8):1263-1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
7. Voskoboynyk LG. *Zhurn AMN Ukrainy* 2010; 16(4):605-629.
8. Xing M. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:184-199. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>
9. Montagut C, Settleman J. *Cancer Lett* 2009; 283(2):125-134. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.022>

10. Milosevic Z, Pesic M, Stankovic T, et al. *Transl Res* 2014; 164(5):411-423. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.06.005>
11. Livak KJ, Schmittgen TD. *Methods* 2001; 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
12. Nakazawa T, Kondo T, Kobayashi Y, et al. *Cancer* 2005; 104(5):943-951. <https://doi.org/10.1002/cncr.21270>
13. Park JI. *Front Biol (Beijing)* 2014; 9(2):95-103. <https://doi.org/10.1007/s11515-014-1299-x>
14. Park JI, Strock CJ, Ball DW, Nelkin BD. *Mol Cell Biol* 2003; 23(2):543-554. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.2.543-554.2003>
15. Wu PK, Hong SK, Veeranki S, et al. *Mol Cell Biol* 2013; 33(20):4051-4067. <https://doi.org/10.1128/MCB.00021-13>

ЕКСПРЕСІЯ мРНК RET/PTC1/3 ТА BRAF^{WT/MUT} У ПУХЛИНАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Гуда Б. Б., Пушкарєв В. М., Журавель О. В., Коваленко А. Є., Тарашенко Ю. М., Тронько М. Д.

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», м. Київ, Україна
pushkarev.um@gmail.com

Вивчали хромосомні транслокації гена рецепторної тирозинкінази RET/PTC1, RET/PTC3, мутації гена протеїнкінази BRAF (BRAFV600E) та експресію BRAF^{wt} у тканині багатовузлового зобу, фолікулярних та папілярних карциномах щитоподібної залози (ЩЗ) людини. З 29 зразків пухлинної тканини, що вивчались, посилення експресії, мутації та перебудови генів виявлені у 11 випадках. У більш агресивних, інвазивних пухлинах інтенсивність експресії RET/PTC1 та RET/PTC3 була вищою ніж у інкапсульованих пухлинах. В одному зразку пухлини папілярної карциноми знайдена подвійна перебудова гена RET — RET/PTC1 та RET/PTC3. Підвищена експресія протеїнкінази BRAF (BRAF^{wt}) спостерігалася у деяких зразках пухлинної тканини фолікулярної карциноми та багатовузлового зобу.

Обговорюється значення сигнального каскаду MAPK в пухлинах ЩЗ.

Ключові слова: щитоподібна залоза людини, високодиференційовані злоякісні пухлини, перебудови Ret/Ptc, мутації та експресія BRAF.

ЭКСПРЕССИЯ мРНК RET/PTC1/3 И BRAF^{WT/MUT} В ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Гуда Б. Б., Пушкарев В. М., Журавель Е. В., Пушкарев В. В., Коваленко А. Е., Тарашенко Ю. Н., Тронько Н. Д.

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», г. Киев, Украина
pushkarev.um@gmail.com

Изучали хромосомные транслокации гена рецепторной тирозинкиназы RET/PTC1, RET/PTC3, мутации гена протеинкиназы BRAF (BRAFV600E) и экспрессию BRAF^{wt} в ткани многоузлового зоба, фолликулярных и папиллярных карциномах щитовидной железы человека. Из 29 образцов тканей, которые изучались, изменения экспрессии, мутации и перестройки генов обнаружены в 11 случаях. В одном образце опухоли папиллярной карциномы найдена двойная перестройка гена RET — RET/PTC1 и RET/PTC3. В более агрессивных, инвазивных опухолях уровень экспрессии RET/PTC1 и RET/PTC3 был выше, чем в инкапсулированных опухолях. Повышенная экспрессия протеинкиназы BRAF (BRAF^{wt}) наблюдалась в некоторых образцах опухолевой ткани фолликулярной карциномы и многоузлового зоба.

Обсуждается значение сигнального каскада MAPK в опухолях щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа человека, высокодифференцированные злокачественные опухоли, перестройки RET/PTC, мутации и экспрессия BRAF.

RET/PTC1/3 AND BRAF^{WT/MUT} mRNA EXPRESSION IN TUMORS OF THE HUMAN THYROID

B. B. Guda, V. M. Pushkarev, O. V. Zhuravel, V. V. Pushkarev, A. Ye. Kovalenko, Y. M. Tarachenko, M. D. Tronko

SI «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine
pushkarev.um@gmail.com

There were studied the chromosomal translocation of receptor tyrosine kinase gene RET/PTC1, RET/PTC3, gene mutations of protein kinase B-RAF (BRAFV600E) and the expression of BRAF^{wt} in the multinodular goiter tissue, follicular and papillary carcinoma of the human thyroid. Of the 29 tissue samples which were studied, changes in the expression, gene mutations and rearrangements were detected in 11 cases (38 %). In one tumor sample of papillary carcinoma double rearrangement of the gene RET — RET/PTC1 and RET/PTC3 was found. In a more aggressive invasive tumors the expression level RET/PTC1 and RET/PTC3 was higher than in encapsulated tumors. It was observed the increased expression of protein kinase BRAF (BRAF^{wt}) in some samples of tumor tissue of follicular carcinoma and multinodular goiter.

The significance of MAPK signaling pathway in tumors of the thyroid was discussed.

Key words: human thyroid, highly differentiated malignant tumors, rearrangements RET/PTC, mutations and expression of BRAF.