

Caffeine이 *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine과 sulfadimethoxine에 의해 유발된 갑상선 피막의 섬유성 증식에 미치는 영향

손화영* · 윤원기¹ · 지영혼² · 류시윤 · 김정란³ · 조성환

충남대학교 수의과대학

¹한국생명공학연구원

²제주대학교 수의학과

³국가전문행정연수원 통계연수원

(계재승인: 2003년 11월 20일)

Effects of caffeine on capsular fibrous proliferation induced by *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and sulfadimethoxine in the thyroid glands

Hwa-young Son*, Won-kee Yoon¹, Young-heun Jee², Si-yoon Ryu
Jung-ran Kim³, and Sung-whan Cho

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

²Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

³Statistical Training Center, National Institute of Professional Administration, Daejeon 305-703, Korea

(Accepted: November 20, 2003)

Abstract : Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), a central nervous system stimulant, is contained in various foods, beverages and over-the-counter medications. Sulfadimethoxine (SDM) is one of the anti-thyroid agents and induces proliferation of thyroid capsule in two stage thyroid carcinogenesis model using *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). In this study, we examined the effect of caffeine on fibrous proliferation of thyroid capsule in DHPN and SDM-treated rats. Five-week-old male F344 rats were given a single subcutaneous injection of DHPN (2,800 mg/kg, body weight). Starting one week thereafter, SDM (1,000 ppm in drinking water) with or without caffeine (1,500 ppm in diet) was administered for 12 weeks. All animals were autopsied and histopathological examination of the thyroid glands was performed. Thyroid follicular proliferative changes were induced in all rats treated with DHPN+SDM. In addition, the proliferation of perithyroidal fibrous tissue and pleomorphic thyroid follicular cells within the capsule were observed in DHPN+SDM treated group. Caffeine would not be related to these lesions in this experimental condition, although pentoxifylline, a methylxanthine derivative, has an antifibrotic effects.

Key words : caffeine, sulfadimethoxine, capsular fibrosis, histopathology

서 론

갑상선 종양의 발생과 관련하여 방사선이나 항갑상선 제제, 발암물질, 항암물질 등에 관한 연구가 많이 이루어

어지고 있다 [12, 14, 22]. 항갑상선 제제는 thioamides, aniline 유도체, polyhydric phenols 등이 있으며, 갑상선호르몬의 생성과정 중 일부에 영향을 미치어 음성피먹임 기전에 의한 뇌하수체 전엽에서 갑상선자극호르몬(TSH)

이 논문은 2001년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음

*Corresponding author: Hwa-young Son

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

[Tel: 82-42-821-6787, Fax: 82-42-821-6787, E-mail: hyson@cnu.ac.kr]

의 분비 증가에 의해 갑상선의 증식을 유발하는 것으로 알려져 있다 [14]. Sulfadimethoxine(SDM)은 항균제로서 aniline유도체를 지닌 sulfonamide의 하나이며, 갑상선 내에서 과산화효소의 작용을 억제하여 갑상선 호르몬의 합성을 방해한다 [15, 21]. 다른 항갑상선 제제들과 마찬가지로 SDM도 뇌하수체와 갑상선의 음성되먹임기전을 통하여 갑상선 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다 [21]. 발암성 실험은 대부분 장기간에 걸쳐 수행되나, 최근 *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN)을 이용한 랫드의 2단계 갑상선 발암 모델이 확립된 이후에는 더 짧은 기간에 갑상선 종양의 유발 및 억제효과를 판별할 수 있게 되었다 [15]. 이 2단계 발암모델에서 SDM은 12주 이내에 갑상선 소포상피세포의 증식성 병변을 유발하며, 이에 관한 많은 연구보고가 이루어지고 있으나 [15, 21-23], 갑상선 피막의 섬유성 증식에 대한 연구보고는 없다.

카페인은 식물성 알칼로이드에 속하는 대뇌피질의 감각중추를 흥분시키는 작용을 하는 물질이며, 위액분비 촉진, 이노작용 등도 가지고 있다. 천연 카페인은 견과류, 종자류 및 몇몇 식물의 잎 등에서 얻을 수 있으며, 또한 차, 커피, 코코아, 콜라, 초콜릿 등의 기호식품과 두통약 등에 많이 사용되고 있어 사람에게 노출량이 많은 물질이다 [4]. 암과 관련하여 카페인이 그 원인이 된다는 확실한 증거는 아직까지는 없다 [10]. 그러나 카페인은 실험적으로 성장호르몬, 갑상선호르몬(T₃, T₄, TSH)에 변화를 유발하며 [6, 26], 최근 카페인이 요오드 결핍에 의한 갑상선의 증식성 병변을 촉진시키는 것으로 나타나는 등 [22] 부작용에 대한 관심이 증가하고 있다. 한편 methylxanthine 유도체의 하나인 pentoxifylline은 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 간 위성세포의 증식과 교원질의 합성을 억제한다고 하였으며 [18], 신장에서도 섬유화를 완화시킨다고 하였다 [13]. 그러나 xanthine 화합물이 간과 신장이외의 장기에서 나타나는 섬유화에 미치는 영향에 관한 연구보고는 아직까지 없다. 따라서 본 연구에서는 DHPN

을 투여한 랫드에서 SDM에 의해 발생하는 갑상선의 증식성 병변을 포함한 변화의 병리조직학적 특징과 대표적인 xanthine 유도체 중 하나인 카페인이 갑상선 피막의 섬유성 증식에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육환경

이 실험에 4주령의 수컷 F344 랫드를 사용하였으며, 사육케이지에 나무 깔집을 깔아주고 5마리씩 배치하여 온도는 23±2°C, 상대습도는 60±5%, 명암주기 12L/12D의 조건에서 사육하였다. 1주 동안 적응시킨 후, 아무런 이상이 없는 동물을 선택하여 실험에 사용하였고, 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시험군의 구성, 시험물질 및 투여방법

시험군은 랫드를 실험군당 10마리씩 배치하였으며, *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine(DHPN) 투여군, sulfadimethoxine(SDM) 투여군, DHPN+SDM 투여군 및 DHPN+SDM+카페인 투여군을 두었다(Fig. 1). DHPN은 Nacalai Tesque Inc.(Kyoto, JAPAN) 2,800 mg/kg을 단회 피하 투여하였으며, SDM과 카페인(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)은 각각 음수에 1,000 ppm, 사료에 1,500 ppm 농도로 12주간 급여하였다. DHPN과 SDM의 투여 용량은 이전의 연구결과들로부터 갑상선의 증식성 병변을 유발할 수 있는 용량으로 설정하였다 [22, 23].

부검 및 병리조직학적 검사

시험물질을 12주간 투여한 후 부검하여 갑상선을 적출한 후 중량을 측정하고 10% 중성완충포름알린 용액에 고정한 다음 통상적인 방법에 의해 조직표본을 제작하였다. H-E 염색하여 광학현미경으로 갑상선 종양의 분화정도 및 섬유성 증식병변의 형태학적 변화를 알

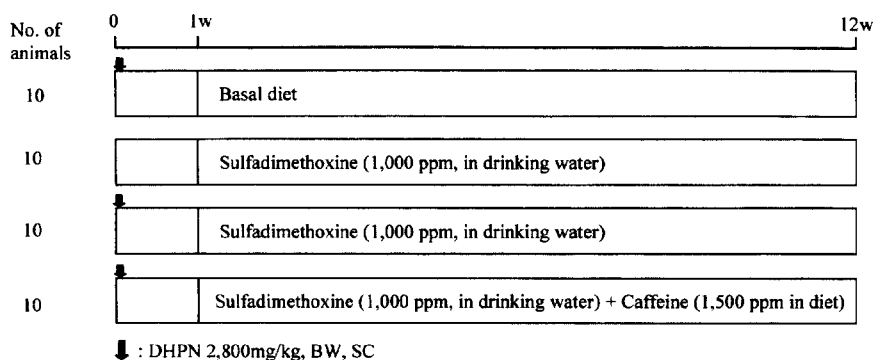


Fig. 1. Experimental design.

아보았으며, 교원섬유를 확인하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. 갑상선에서 섬유성 증식이 일어난 피막의 두께는 왼쪽 및 오른쪽 갑상선에 대하여 혈관신생이나 여포세포가 없는 부분을 3곳 선정하여 측정하였다. 또한 교원질의 종류를 알아보기 위하여 500배 희석한 랫드 교원질 I형 항체(Cedarlane Lab., Canada)를 ABC 법(Vector, USA)으로 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 갑상선의 증식성 병변은 Botts 등 [3]의 방법에 준하여 소포세포 과형성, 소포세포선종, 소포세포선암종으로 구분하였다.

통계분석

모든 실험군의 체중과 갑상선의 무게는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, ANOVA로 분석하여 유의성이 인정된 경우는 Duncan's multiple range test를 실시하여 대조군과 유의성을 검증하였다. 피막의 두께는 DHPN+SDM군과 DHPN+SDM+카페인 투여군에서만 측정하여 평균값과 표준편차로 나타내었으며, Student's *t*-test를 실

Table 1. Final body and relative thyroid gland weights

Treatment	BW (g)	Thyroid (mg/BW)
DHPN	306.2±8.90	6.77±0.44
SDM	247.7±19.6*	34.80±4.3*
DHPN+SDM	235.9±23.7*	95.21±21.36*
DHPN+Caffeine+SDM	201.9±16.7*	86.36±8.38*

Values are mean±SD. BW : Body weight.

DHPN : *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (2,800mg/kg, sc).

SDM : Sulfadimethoxine (1,000 ppm in drinking water).

Caffeine (1,500 ppm in diet).

*Significantly different from DHPN group value at $P<0.05$.

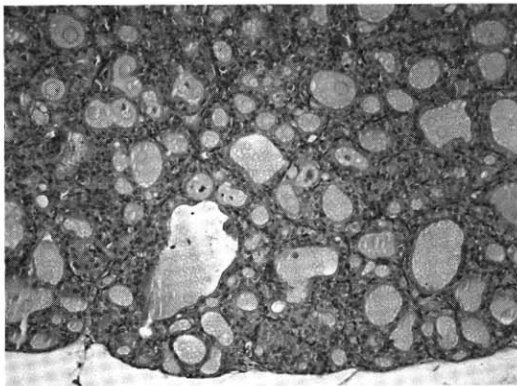


Fig. 2. Thyroid gland of sulfadimethoxine treated rat showing diffuse follicular cell hyperplasia and surrounded by a capsule containing of a thin layer of connective tissue. H-E stain, ×100.

시하여 2요인 즉, (왼쪽 갑상선, 오른쪽 갑상선)과 3곳의 반복측정에 대한 투여군 들의 비교를 Generalized Linear Model procedure를 실시하여 유의성을 검증하였다.

결 과

부검 시 SDM을 투여한 군에서 육안적으로 갑상선은 양쪽 모두 매우 종대되어 기관지와 주변의 결합조직을 압박하고 있었다. 특히 DHPN을 전치치한 군에서는 갑상선이 두꺼운 섬유성 막으로 싸여있었다.

장기중량 측정 결과 갑상선의 절대 및 체중에 대한 상대중량은 SDM 투여에 의해 DHPN 단독 처리군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 증가하였으며, DHPN과

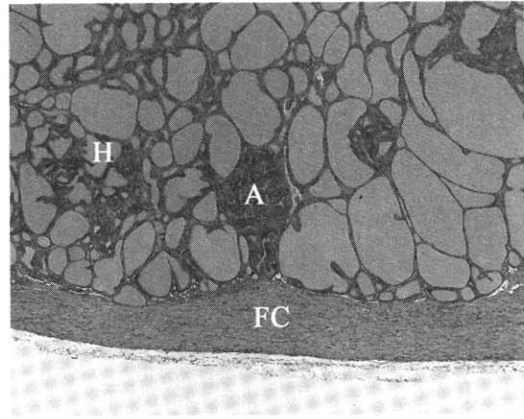


Fig. 3. Thyroid gland of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine +sulfadimethoxine treated rat showing follicular cell hyperplasia (H) and adenoma (A) and surrounded by a thick fibrous capsule (F). H-E stain, ×100.

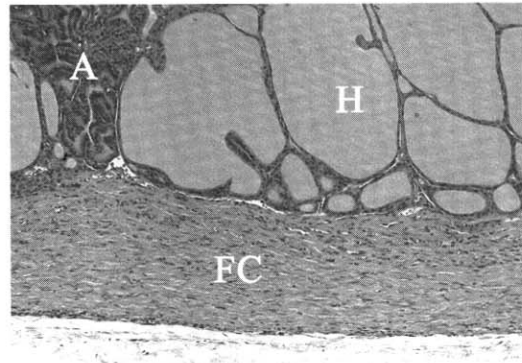


Fig. 4. Higher magnification of Fig. 3. Showing band-like thick fibrous capsule (F) formation, A: follicular cell adenoma, H: follicular cell hyperplasia. H-E stain, ×200.

SDM의 혼합 투여에 의해 현저히 증가하였다. 카페인은 이 변화에 큰 영향을 주지 않았다(Table 1).

병리조직학적으로 DHPN을 단독 처리한 군에서는 갑상선에 아무런 변화가 없었다. SDM을 단독 처리한 군에서는 갑상선 소포세포의 미만성 과형성이 관찰되었으며(Fig. 2), DHPN+SDM 및 DHPN+SDM+카페인 투여 군에서는 국소성 소포세포 과형성, 소포세포선종, 소포세포선암증이 발생하였으며, 또한 갑상선의 피막에 현저한 섬유성 증식이 일어나서 두꺼운 섬유성 피막을 형성하였다(Figs. 3~5). 섬유성 피막은 갑상선 주위를 따라 증식하여 두꺼운 띠 모양을 형성하고 있으며, 주로 섬유

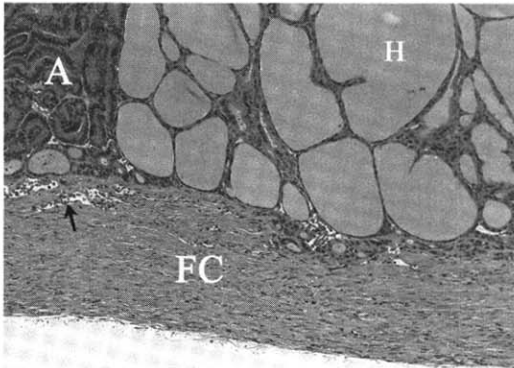


Fig. 5. Thyroid gland of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine +sulfadimethoxine+caffeine treated rat showing diffuse follicular cell hyperplasia and adenoma (A) and surrounded by a thick fibrous capsule (FC). Arrow: blood vessel, H-E stain, $\times 200$.

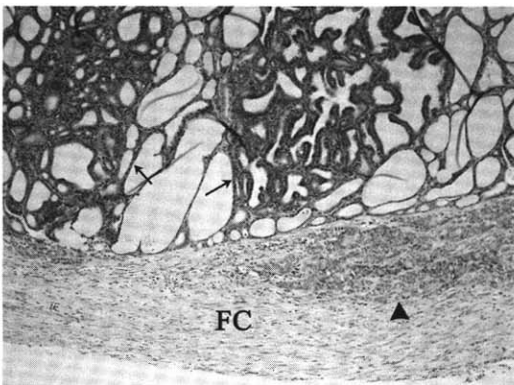


Fig. 6. Thyroid gland of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine +sulfadimethoxine treated rat showing invasive-like lesion (arrow head) in the fibrous capsule (FC) around follicular cell hyperplasia (arrow). H-E stain, $\times 200$.

Table 2. Thickness of fibrous capsule (um)

Treatment	Thyroid-left	Thyroid-right
DHPN+SDM	162.7 \pm 63.64	172.7 \pm 61.58
DHPN+Caffeine+SDM	166.0 \pm 71.69	175.3 \pm 41.38

Values are mean \pm SD.

DHPN : *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (2,800 mg/kg, sc).

SDM : Sulfadimethoxine (1,000 ppm in drinking water).

Caffeine (1,500 ppm in diet).

아세포와 교원섬유로 구성되어 있었으며, 교원섬유는 특수 염색을 통해 확인하였다. 면역조직화학적 염색 결과 이 섬유는 I형 교원섬유 항체에 음성 반응을 보였다. 일부에서는 핵이 창백하고 이형성이 심한 다양한 크기의 세포들이 피막 내에서 관찰되었다. 이러한 세포들은 증식성 병변과 인접한 부위에서 주로 관찰되었으며, 때로 미만성 과형성이 일어난 세포주변의 피막에서도 관찰되었다(Fig. 6). 카페인은 이러한 피막의 섬유성 증식에 큰 영향을 미치지 않았다(Table 2).

고 찰

일반적으로 실질 장기의 섬유화는 만성 자극에 의해 발생한다. 이 실험 결과, 갑상선에서 DHPN+SDM 투여에 의해 12주의 짧은 기간에 현저한 피막의 섬유성 증식이 일어났으며, 이는 갑상선을 비롯한 다른 장기에서 일어나는 섬유화를 연구하는 모델로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 피막의 현저한 증가는 종양세포의 성장을 제한하려는 숙주의 반응으로 사료된다 [11]. 그러나 페노바비탈과 같은 갑상선증식 유발물질들이나 [23]

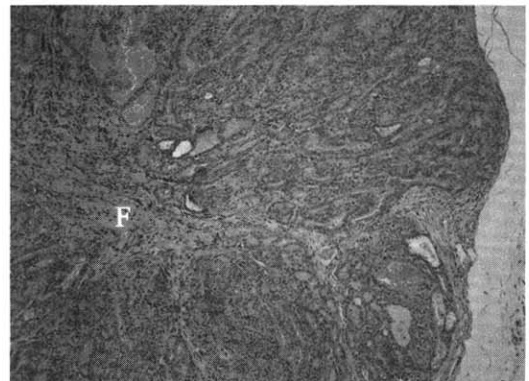


Fig. 7. Spontaneous follicular cell carcinoma of rat thyroid gland showing stromal fibrosis (F) and surrounded by a capsule containing a thin layer of connective tissue. H-E stain, $\times 100$.

자연적으로 발생한 종양의 경우(Fig. 7)는 이러한 피막의 증식이 현저하게 나타나지 않는 것으로 보아 SDM이 다른 갑상선 자극 물질들과 상승작용을 통하여 피막의 증식에 직접적으로도 작용하는 것으로 사료된다. 카페인은 이러한 피막의 섬유성 증식에 큰 영향을 미치지 않았다. 카페인과 섬유화의 상관관계에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 이전의 연구 결과 methylxanthine 유도체인 pentoxifylline은 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 간 위성세포의 증식과 교원질의 합성을 억제한다고 하였으며 [18], 신장에서도 근섬유세포 증식 억제 및 만성염증, 섬유화를 완화시키고 *in vitro*에서 섬유모세포의 증식을 억제시킨다고 하였다 [13]. 그러나 본 실험에서 xanthine 유도체의 하나인 카페인이 갑상선에서 나타난 피막의 섬유성 증식이나 섬유모세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보아 xanthine 유도체들 사이에도 섬유세포의 분화에 미치는 영향은 다른 것으로 사료되며, 카페인이 신장이나 간장의 섬유화에 미치는 영향에 대한 연구 보고도 아직까지 이루어지지 않고 있기 때문에 xanthine 유도체들이 섬유세포의 증식이나 장기의 섬유화에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

실질장에서 섬유화는 간, 비장, 폐, 피부, 골수 등에서 관찰되며, 특히 간장에서 흔히 나타난다 [3]. 이들 장기에서 염증 또는 화학물질 등의 다양한 자극에 의해 발생하는데 피부에서는 방사선 조사에 의해 교원질 I형과 II형이 증가하며 [19], thioacetamide를 장기간 투여하면 간에서 섬유화가 유발된다 [9]. 또한 choline 결핍, 간염 바이러스 감염, 만성 알콜 섭취에 의해서도 발생하는데 이 경우 간세포암으로 발전하는 것으로 알려져 있다 [25]. 간세포암의 경우에도 종양주변부나 종양의 격벽에도 현저한 섬유화가 흔히 관찰된다 [11]. 갑상선에서는 실험적으로 유발된 자가면역성 갑상선염이나 유두상 선암종, 호르몬 이상성 갑상선 종대에서 간질의 섬유화가 나타나는 것으로 알려져 있다 [3, 5, 8, 20]. 이와 같이 장기의 섬유화는 각종 질병 및 종양의 발생과 밀접하게 관련되어 있다. 그러나 갑상선 피막의 섬유성 증식과 이의 생물학적 특성 및 의의에 대한 보고는 아직까지 없는 실정이다. 교원섬유는 결합조직의 구조단백질로 19종의 교원섬유가 있는 것으로 알려져 있으며, I형 교원질은 세포의 간질의 주요 구성성분이다 [17]. 간장에서는 섬유화의 가장 민감한 marker로 hyaluronic acid, laminine, procollagen IV type이며, procollagen III type, fibronectin, tenascin, unduline도 사용된다 [24]. 갑상선에서는 이에 관한 연구보고가 없어 본 연구에서는 세포의 간질, 즉 결합조직에 가장 많이 존재하는 I형 교원질에 대하여만 알아보았다. 그러나 I형 교원질에 음성 반응을 보여 이

이외에 다른 marker를 이용한 추가적인 연구가 필요하다.

일반적으로 종양을 양성과 악성으로 구분하고자 할 때 침윤성 발육양상과 세포의 이형성이 매우 중요한 의미를 갖는다 [3]. 많은 양성 종양이 종양 주위에 섬유성 피막을 형성하며 이 피막은 종양과 종양 주위 정상 조직의 섬유성 기질에서 유래하여 구성된다 [7]. 이와 같이 피막화는 양성종양에서 특징적으로 관찰되지만, 피막을 형성하지 않는다고 하여 악성종양으로 분류할 수는 없다. 예를 들어, 간세포암종의 경우에는 두꺼운 섬유성 피막이 관찰되는데, 이는 악성종양에서도 피막화가 일어남을 보여준다 [11, 16]. 간세포암종에서 형성되는 섬유성 피막은 질병에 대한 생존율이 향상되어 질병의 예후가 양호함을 의미하나 간질의 섬유화는 예후가 불량함을 시사한다 [1]. 그러나 본 실험에서 관찰된 갑상선에서 섬유성 피막의 증식과 발생기전에 대해서는 알려진 바가 없으며, 갑상선에서 SDM 또는 종양형성과정에서 나타날 수 있는 피막의 섬유화와 섬유세포의 증식에 관해서는 추후 연구가 필요하다. 특히, 사람에게서 갑상선과 부갑상선의 증식선 병변을 치유하기 위해 결절내 에탄올을 주입한 후에 부작용으로 이러한 피막의 섬유화가 나타나는 것으로 알려져 있는데 [2] 이러한 피막의 섬유화에 대한 추가적인 연구는 상기의 치료법의 부작용을 해소하거나 유발 기전을 밝히는데 도움이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Abdel-Wahab, M., Sultan, A., el-Ghawalby, A., Fathy, O., el-Ebidy, G., Abo-Zeid, M., Aboel-Enin, A., Abdallah, T., Fouad, A., el-Fiky, A., Gadel-Hak, N. and Ezzat, F. Is resection for large hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients beneficial? Study of 38 cases. *Hepatogastroenterology* 2001, **48**, 757-761.
2. Bennedbaek, F. N., Karstrup, S. and Hegedus, L. Percutaneous ethanol injection therapy in the treatment of thyroid and parathyroid diseases. *Eur. J. Endocrinol.* 1997, **136**, 240-250.
3. Botts, S., Jokinen, M. P., Isaacs, K. R., Meuten, D. J. and Tanaka, N. Proliferative lesions of the thyroid and parathyroid glands, E-3. *In* Guides for Toxicologic Pathology. pp. 1-12. STP/ARP/AFIP, Washington DC, 1991.
4. Bu-Abbas, A., Clifford, M. N., Walker, R. and Ioannides, C. Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic Phase II activities by green tea. *Food Chem. Toxicol.* 1998, **36**, 617-621.

5. **Chen, K., Wei, Y., Sharp, G. C. and Braley-Mullen, H.** Inhibition of TGFbeta1 by anti-TGFbeta1 antibody or lisinopril reduces thyroid fibrosis in granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.* 2002, **169**, 6530-6538.
6. **Clozel, M., Branchaud, C. L., Tannenbaum, G. S., Dussault, J. H. and Aranda, J. V.** Effect of caffeine on thyroid and pituitary function in newborn rats. *Pediatr. Res.* 1983, **17**, 592-595.
7. **Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., Robbins, S. L. and Schmitt, B.** Pathologic basis of disease. pp. 223-225, 3rd ed. Saunders Philadelphia, 1984.
8. **Ghossein, R. A., Rosai, J. and Heffess, C.** Dysmorphogenetic Goiter: a clinicopathologic study of 56 cases. *Endocr. Pathol.* 1997, **8**, 283-292.
9. **Honda, H., Ikejima, K., Hirose, M., Yoshikawa, M., Lang, T., Enomoto, N., Kitamura, T., Takei, Y. and Sato, N.** Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002, **36**, 12-21.
10. **International Agency for Research on Cancer:** Coffee, tea, meat, methylxanthins and methylglyoxal. *In* IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Suppl. 51, pp. 291-390. IARC Scientific Publications, Lyon, 1991.
11. **Ishizaki, M., Ashida, K., Higashi, T., Nakatsukasa, H., Kaneyoshi, T., Fujiwara, K., Nouse, K., Kobayashi, Y., Uemura, M., Nakamura, S. and Tsuji, T.** The formation of capsule and septum in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch.* 2001, **438**, 574-580.
12. **Kitahori, Y., Hiasa, Y., Konishi, N., Enoki, N., Shimoyama, T. and Miyashiro, A.** Effect of propylthiouracil on the thyroid tumorigenesis induced by *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine in rats. *Carcinogenesis* 1984, **5**, 657-660.
13. **Lin, S. L., Chen, Y. M., Chien, C. T., Chiang, W. C., Tsai, C. C. and Tsai, T. J.** Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, **13**, 2916-2929.
14. **McClain, R. M.** Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutat. Res.* 1995, **333**, 131-142.
15. **Onodera, H., Mitsumori, K., Takahashi, M., Shimo, T., Yasuhara, K., Kitaura, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.** Thyroid proliferative lesions induced by anti-thyroid drugs in rats are not always accompanied by sustained increases in serum TSH. *J. Toxicol. Sci.* 1994, **19**, 227-234.
16. **Ooi, L. P., Crawford, D. H., Gotley, D. C., Clouston, A. D., Strong, R. W., Gobe, G. C., Halliday, J. W., Bridle, K. R. and Ramm, G. A.** Evidence that "myofibroblast-like" cells are the cellular source of capsular collagen in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997, **26**, 798-807.
17. **Prockop, D. J. and Kivirikko, K. I.** Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 1995, **64**, 403-434.
18. **Raetsch, C., Jia, J. D., Boigk, G., Bauer, M., Hahn, E. G., Riecken, E. O. and Schuppan, D.** Pentoxifylline down regulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut.* 2002, **50**, 241-247.
19. **Rieki, R., Parikka, M., Jukkola, A., Salo, T., Risteli, J. and Oikarinen, A.** Increased expression of collagen types I and III in human skin as a consequence of radiotherapy. *Arch. Dermatol. Res.* 2002, **294**, 178-184.
20. **Sarma, N. H., Ramesh, K., Nagarajan, S., Grant, J. J. and Barrett, P. D.** Thyroid gland papillary carcinoma with fibromatosis-like stroma: case report. *East. Afr. Med. J.* 1998, **75**, 728-729.
21. **Shimo, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Ueno, Y., Katayama, J., Saito, A. and Takahashi, M.** Effect of rat thyroid proliferative lesion development by intermittent treatment with sulfadimethoxine. *Cancer Lett.* 1995, **96**, 209-218.
22. **Son, H-Y., Nishikawa, A., Kanki, K., Okazaki, K., Kitamura, Y., Lee, K-Y., Umemura, T. and Hirose M.** Synergistic interaction between excess caffeine and deficient iodine on the promotion of thyroid carcinogenesis in rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine. *Cancer Sci.* 2003, **94**, 334-337.
23. **Son, H-Y., Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikeda, T. and Hirose, M.** Lack of modification by environmental estrogenic compounds of thyroid carcinogenesis in ovariectomized rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn. J. Cancer Res.* 2000, **91**, 966-972.
24. **Szantova, M. and Kupcova, V.** Biochemical markers of fibrogenesis in liver diseases. *Bratisl. Lek. Listy.* 1999, **100**, 28-35.
25. **Takase, S., Takada, A., Urashima, S., Enyama, K. and Fujii, M.** Changes in the markers related to collagen synthesis in the liver of chronically alcohol treated rats. *Gastroenterol. Jpn.* 1992, **27**, 54-60.
26. **Wolff, J. and Varrone, S.** The methyl xanthines-a new class of goitrogens. *Endocrinology* 1969, **85**, 410-414.