ETH zürich

ETH Library

Effects of fibrogenic drugs on collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture

Doctoral Thesis

Author(s):
Kirchhofer, Daniel K.

Publication date:
1987

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000410078

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No. 8233

EFFECTS OF FIBROGENIC DRUGS ON COLLAGEN SYNTHESIS BY HUMAN SKIN FIBROBLASTS IN CULTURE

A DISSERTATION

submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
DANIEL K. KIRCHHOFER
dipl. microbiol.
born on November 22, 1957
citizen of Sursee and Bueron (Luzern)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ch. Schlatter, examiner
Prof. Dr. G. Zbinden, co-examiner

Zürich 1987

SUMMARY

Many drugs are known to induce fibrosis, a disease which is characterized by an excessive accumulation of connective tissue in the interstitial space. This serious disorder is the result of a complex process which is still not fully understood. Various factors can contribute to the development of fibrosis and a direct drug action on fibroblasts may be one of them. In this study the direct fibrogenic activity of various drugs was investigated by measuring collagen and noncollagen protein (NCP) synthesis of cultured human skin fibroblasts. A fibrogenic drug could be identified as a substance that stimulates collagen synthesis to a greater extent that NCP synthesis, resulting in an increased relative collagen synthesis (i.e. % collagen synthesis of total protein synthesis).

Identical cell material was used for all experiments, i.e. diploid human skin fibroblasts at passage 7. After optimizing the assay procedure, collagen and NCP synthesis were determined at various growth phases. Collagen as well as NCP synthesis markedly decreased during fibroblast growth from log growth phase to stationary phase. On the other hand, a 3-fold increase in relative collagen synthesis was observed at the stationary phase compared to cells at the log growth phase. The growth state-dependent modulations of collagen synthesis are of particular importance for this study since growth-inhibiting drugs such as nitrofurantoin and bleomycin were tested.

Four chemically unrelated fibrogenic drugs namely nitrofurantoin, amiodarone, practolol, and bleomycin were examined with this test system under standardized conditions. Nitrofurantoin, an antimicrobial drug and the antiarrhythmic agent amiodarone failed to induce a direct fibrogenic response. This finding suggests that both drugs do not cause fibrosis by directly stimulating collagen synthesis of fibroblasts. Furthermore, the beta-adrenoceptor blocking agent practolol induced inconsistent results. Some experiments revealed an increased but nonspecific collagen synthesis. Yet, these findings could not be confirmed in further experiments and, therefore, practolol could not be identified as a direct fibrogenic drug. However, the antitumor agent bleomycin clearly produced a direct

fibrogenic response, i.e. a specific stimulation of collagen synthesis. In addition, the cellular protein content and cell volume increased dramatically. The cell enlargment was probably due to intracellular accumulation of newly formed protein. However, these effects were restricted to proliferating cells since bleomycin inhibited collagen and NCP synthesis in non-dividing cells (at stationary phase). These observations suggest that a direct action of bleomycin on collagen synthesis of fibroblasts contributes to the development of fibrosis. Furthermore, cell proliferation may be a prerequisite for the drug's direct fibrogenic action.

The observation that only one of the four tested drugs produced a direct fibrogenic response correlates with the fibrogenic potency of the corresponding drugs, i.e. with the frequency of fibrosis observed in patients. Bleomycin is by far the most potent fibrogenic agent of the tested drugs. This could signify that this cell culture system may only be adequate to detect strong fibrogenic agents, or that bleomycin is actually the only one of the investigated drugs which can directly stimulate collagen synthesis. Thus, a complete assessment of the fibrogenic potency of chemically unrelated drugs can not be attained by this test system alone. Nevertheless, since the direct fibrogenic action of drugs such as bleomycin can be detected in vitro, a practical application of this test system seems worthwhile, e.g. for the assessment of the fibrogenic potency of chemical congeners during drug prescreening.

Zusammenfassung

Es sind viele Medikamente bekannt, die beim Menschen Fibrosen verursachen können. Fibrosen sind charakterisiert durch exzessive Bildung und Akkumulation von Bindegewebe. Die physiologischen Prozesse, die zu einer solchen Krankheit führen, sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedenen Vorgängen und Faktoren wurde eine Rolle in der Fibrose-Bildung zugesprochen, wobei auch eine direkte Wirkung der Substanz auf die Bindegewebsproduktion der Fibroblasten in Betracht gezogen wurde. In dieser Arbeit wurde die direkte fibrogene Aktivität von verschiedenen Wirksubstanzen von Medikamenten untersucht. Dazu wurde die Syntheserate von Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen (NKP) von kultivierten menschlichen Hautfibroblasten bestimmt. Eine fibrogene Substanz wird - im Idealfall - die Kollagensynthese stärker stimulieren als die Synthese von NKP, was zu einer erhöhten relativen Kollagensyntheserate (= prozentualer Anteil der Kollagensynthese an der totalen Proteinsynthese) führt.

Für alle Experimente wurde identisches Zellmaterial verwendet, d.h. diploide menschliche Hautfibroblasten in Passage 7. Nachdem die Bestimmungsmethode optimiert war, wurde die Kollagensynthese in verschiedenen Wachstumsphasen der Zellen bestimmt. Sowohl Kollagen- als auch NKP-Synthese nahmen während des Wachstums von der logarithmischen zur stationären Phase beträchtlich ab. Im weiteren wurden bei Zellen in der stationären Phase eine 3-fach erhöhte relative Kollagensynthese, verglichen mit Zellen in der logarithmischen Phase, festgestellt. Die Kenntnis über wachstumsabhängige Veränderungen der Kollagensynthese ist für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung, da wachstumshemmende Substanzen wie Bleomycin und Nitrofurantoin getestet wurden.

Vier chemisch nicht verwandte fibrogene Substanzen, nämlich Nitrofurantoin, Amiodaron, Practolol und Bleomycin wurden mit dem entwickelten Zellkultur-Testsystem untersucht. Das Bakteriostatikum Nitrofurantoin und das Antiarrhythmikum Amiodaron erzeugten keine Erhöhung der Kollagensynthese. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese beiden Substanzen Fibrosen nicht durch eine direkte Wirkung auf die Fibroblasten

verursachen. Untersuchungen mit dem Beta-Blocker Practolol führten zu uneinheitlichen Ergebnissen. In einigen Experimenten wurde eine Stimulierung der Kollagensynthese gefunden. Andere Versuch zeigten jedoch keine Wirkung der Substanz und deshalb konnte auch Practolol nicht als direkt fibrogen identifiziert werden. Hingegen induzierte Bleomycin, ein Zytostatikum aus Streptomyces verticillus, eine deutliche fibrogene Antwort, d.h. eine spezifische Stimulierung der Kollagensynthese. Im weiteren wurde dabei eine dramatische Erhöhung des Zellprotein-Gehaltes sowie des Zellvolumens festgestellt. Die Vergrösserung der Zellen war vermutlich auf die intrazelluläre Akkumulation von neu synthetisiertem Protein zurückzuführen. Diese Effekte waren aber auf proliferierende Zellen beschränkt, denn Zellen in der stationären Phase reduzierten die Kollagen- und NKP-Synthese unter dem Einfluss von Bleomycin. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Bleomycin durch eine direkte Wirkung auf die Kollagensynthese von Fibroblasten, wenigstens teilweise, zur Fibrosebildung beitragen kann. Zusätzlich scheint der Proliferations-Zustand eine notwendige Voraussetzung für die Entfaltung der direkt fibrogenen Wirkung von Bleomycin zu sein.

Der Befund, dass nur eine der vier getesteten Substanzen eine direkte fibrogene Antwort erzeugte, korreliert gut mit dem fibrogenen Potential der entsprechenden Medikamente. Bleomycin induziert nämlich Fibrosen mit der weit grössten Häufigkeit. Dies könnte bedeuten, dass dieses Zellkultursystem nur stark fibrogene Substanzen erkennt, oder dass Bleomycin die einzige der vier getesteten Substanzen darstellt, welche direkt fibrogen wirkt. Auf jeden Fall kann dieses Zellkultur-Testsystem nicht zur vollständigen Abschätzung des fibrogenen Potentials von chemisch unterschiedlichen Substanzen herangezogen werden. Eine praktische Anwendung dieses Testsystems wäre dennoch denkbar; beispielsweise könnte das fibrogene Potential von chemischen Derivaten von Substanzen wie Bleomycin im Verlauf eines Prescreening-Tests abgeschätzt werden.