

# Ocena stężenia bFGF i TGF- $\beta$ 1 w surowicy krwi chorych z bielactwem nabytym – badanie pilotażowe

Estimation of bFGF and TGF- $\beta$ 1 sera concentrations in vitiligo patients – pilot study

Grażyna Chodorowska, Joanna Bartosińska, Małgorzata Dąbrowska-Członka, Bartłomiej Wawrzycki, Maria Juszkiewicz-Borowiec

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Lublinie, kierownik Katedry i Kliniki: prof. AM, dr hab. n. med. Grażyna Chodorowska

Post Dermatol Alergol 2008; XXV, 1: 1–4

## Streszczenie

**Wprowadzenie:** Bielactwo nabyte jest chorobą skóry, której patogeneza nie została w pełni poznana. Uważa się, że pewną rolę w rozwoju schorzenia może odgrywać zaburzenie równowagi cytokin wydzielanych przez keratynocyty i fibroblasty. Niektóre z nich, w tym zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostowy (bFGF lub FGF-2), mogą pobudzać proliferację komórek barwnikowych, z kolei inne, takie jak transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), są parakrynnymi inhibitorami proliferacji melanocytów i melanogenezy. Ponadto uważa się, że TGF- $\beta$  może wykazywać działanie immunosupresyjne, hamując proliferację limfocytów T i B.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto 21 pacjentów z bielactwem oraz 17 zdrowych ochotników. Stężenie bFGF i TGF- $\beta$ 1 w surowicy krwi oznaczono przy użyciu techniki immunoenzymatycznej ELISA.

**Wyniki:** Średnie stężenie bFGF w surowicy krwi obwodowej chorych z bielactwem wynosiło 9,4769 $\pm$ 4,8497 pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej 8,5733 $\pm$ 3,6386 pg/ml. Różnica ta nie była istotna statystycznie ( $p=0,587047$ ). Średnie stężenie TGF- $\beta$ 1 w surowicy krwi obwodowej chorych z bielactwem wynosiło 52,4931 $\pm$ 17,7362 ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej 44,6654 $\pm$ 15,9378 ng/ml. Różnica ta także nie była istotna statystycznie ( $p=0,181621$ ).

**Wnioski:** W świetle rozbieżnych wyników badań przedstawionych w piśmiennictwie dotyczących roli bFGF i TGF- $\beta$ 1 w bielactwie trudno jest sformułować ostateczne wnioski. Istnieje potrzeba dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmu działania bFGF w procesie repigmentacji oraz możliwości wykorzystania immunosupresyjnego działania TGF- $\beta$  w leczeniu bielactwa.

**Słowa kluczowe:** bielactwo, bFGF, TGF- $\beta$ 1, melanocyty.

## Abstract

**Introduction:** Vitiligo is an acquired skin disease of unknown aetiopathogenesis. It is believed that the development of this disease is influenced by disturbed production of keratinocyte and fibroblast cytokines, both quantitatively and qualitatively. Some of the cytokines including basic fibroblast growth factor (bFGF/FGF-2) stimulate proliferation of pigment cells, whereas other cytokines including transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. Moreover, immunosuppressive activity of TGF- $\beta$  is thought to decrease T and B lymphocyte proliferation.

**Material and methods:** The study included 21 vitiligo patients as well as 17 healthy volunteers. Evaluation of the bFGF and TGF- $\beta$ 1 sera levels was performed by means of immunoenzymatic ELISA method.

**Results:** The mean sera concentration of bFGF in the vitiligo patients was 9.4769 $\pm$ 4.8497 pg/ml (mean value  $\pm$  standard deviation), whereas in the controls 8.5733 $\pm$ 3.6386 pg/ml. The difference was not statistically significant ( $p=0.587047$ ). The mean sera concentration of TGF- $\beta$ 1 in the vitiligo patients was 52.4931 $\pm$ 17.7362 ng/ml (mean value  $\pm$  standard deviation), whereas in the controls 44.6654 $\pm$ 15.9378 ng/ml. The difference was not statistically significant ( $p=0.181621$ ).

**Conclusions:** Since the results of studies on bFGF and TGF- $\beta$  presented in the literature are inconsistent, the role of cytokines in the vitiligo development is still inconclusive. Therefore, in order to clarify the effect of bFGF on repigmentation of vitiliginous lesions as well as the possibility of using TGF- $\beta$  immunosuppressive activity in vitiligo treatment, further studies are required.

**Key words:** vitiligo, bFGF, TGF- $\beta$ 1, melanocytes.

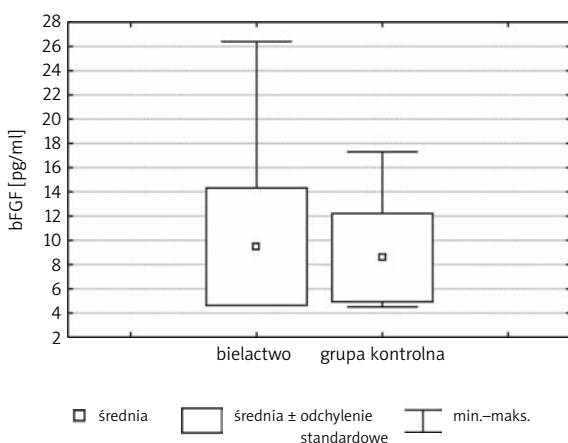
---

**Adres do korespondencji:** lek. med. Joanna Bartosińska, Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Radziwiłłowska 13, 20-080 Lublin, tel. +48 602 724 298, faks +48 81 532 36 47, e-mail: jbartosi@medclub.pl

## Wprowadzenie

Bielactwo nabyte charakteryzuje się występowaniem na skórze wyraźnie odgraniczonych, różnej wielkości i kształtu odbarwionych plam, będących następstwem braku lub zmian strukturalnych melanocytów naskórka [1]. Melanocyty, odpowiadające za produkcję melaniminy, są komórkami wywodzącymi się z grzebienia nerwowego, które w okresie życia płodowego wędrują wzdłuż całej długości cewy nerwowej i docelowo osiedlają się w warstwie podstawnej naskórka, mieszkach włosowych, błonie naczyniowej gałki ocznej, prążku naczyniowym ucha wewnętrznego oraz oponie miękkiej mózgu [2].

Etiopatogeneza bielactwa nie została dotychczas poznana, ale podkreśla się znaczenie czynników genetycznych, autoimmunologicznych, autocytotoksycznych, neurogennych [1]. W proliferacji melanocytów i melanogenezie ważną rolę odgrywa mikrośrodowisko naskórka. Uważa się, że keratynocyty i melanocyty tworzą czynnościowe i anatomiczne połączenie określane jako tzw. naskórkowa jednostka melaninowa (ang. *epidermal melanin unit*) [1, 3]. W prawidłowym jej funkcjonowaniu kluczowe znaczenie mają cytokiny, produkowane przez keratynocyty i fibroblasty, w tym czynniki wzrostowe, pobudzające proliferację komórek barwnikowych, takie jak czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i monocytów (GM-CSF), zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostowy (bFGF lub FGF-2), czynnik komórek macierzystych (SCF), endoteliny [3]. Melanocyty mają na powierzchni swoiste receptory FGFR-1 i c-kit, odpowiednio dla bFGF i SCF [4]. Z kolei parakrynnymi inhibitorami proliferacji melanocytów i melanogenezy są interleukiny 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), 6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [3].



Ryc. 1. Porównanie stężeń bFGF w surowicy chorych z bielactwem i osób z grupy kontrolnej

## Cel pracy

W świetle rozbieżnych wyników dotyczących udziału bFGF i TGF- $\beta$ 1 w etiopatogenezie bielactwa nabytego, przeprowadzono własne oznaczenia tych cytokin.

## Materiał i metody

Badaniem objęto 21 pacjentów z bielactwem nabytym, w tym 10 kobiet i 11 mężczyzn, w wieku 9–55 lat, hospitalizowanych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Dermatologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Lublinie. Choroba trwała 2–20 lat. Wszyscy chorzy mieli rozсіяną postać bielactwa. Grupę kontrolną stanowiło 17 zdrowych ochotników dobranych pod względem płci i wieku. Surowicę uzyskaną z krwi obwodowej pacjentów i osób z grupy kontrolnej przechowywano do czasu wykonania oznaczeń w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Stężenie bFGF i TGF- $\beta$ 1 oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA, używając odczynników R&D Systems Europe Ltd.: Human FGF Basic, Quantikine oraz Bender MedSystems GmbH, Europe: Human TGF- $\beta$ 1, Instant ELISA.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej, odzwierciedlającej poziom przeciętny i odchylenia standardowego, mierzącego stopień rozproszenia pomiarów wokół średniej. Podano także wartości minimalne i maksymalne. W celu porównania różnic między grupą chorych a kontrolną wykorzystano test U Manna-Whitneya. Zależności uważano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Stężenie bFGF w surowicy krwi obwodowej chorych z bielactwem wynosiło 5,347–26,400 pg/ml, średnio  $9,4769 \pm 4,8497$  pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej 4,494–17,296 pg/ml, średnio  $8,5733 \pm 3,6386$  pg/ml (ryc. 1). Analiza porównawcza powyższych wyników wykazała brak istotnej statystycznie różnicy między grupą chorych a kontrolną ( $p = 0,587047$ ).

Stężenie TGF- $\beta$ 1 w surowicy krwi obwodowej chorych z bielactwem wynosiło 23,844–87,912 ng/ml, średnio  $52,4931 \pm 17,7362$  ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej 7,140–71,312 ng/ml, średnio  $44,6654 \pm 15,9378$  ng/ml (ryc. 2). Analiza porównawcza powyższych wyników wykazała brak istotnej statystycznie różnicy między grupą chorych a kontrolną ( $p = 0,181621$ ).

## Omówienie wyników

Wpływ bFGF oraz TGF- $\beta$  na proliferację melanocytów i melanogenezę oraz ich udział w etiopatogenezie bielactwa nabytego nie jest do końca wyjaśniony w piśmiennictwie.

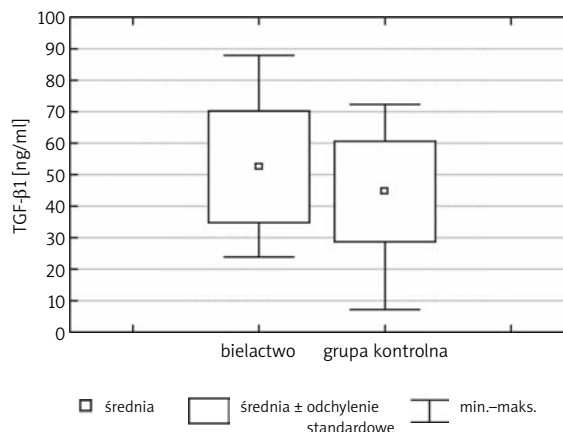
bFGF jest czynnikiem wzrostowym działającym mitogenicznie i angiogenicznie na różne rodzaje komórek pochodzących z mezodermy i ektodermy. Istnieją 4 izoformy bFGF

o masach cząsteczkowych 18, 22, 23, 24 kD. Większość badań dotyczy izoformy o masie cząsteczkowej 18 kD, która wywiera działanie biologiczne, wiążąc się z receptorem FGFR. Wydzielany przez keratynocyty i fibroblasty bFGF jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania melanocytów. W warunkach fizjologicznych komórki barwnikowe nie mają zdolności produkowania bFGF, natomiast jest on wytwarzany przez komórki czerniaka i znamion dysplastycznych. Zablokowanie syntezy i działania bFGF w linii komórek czerniaka prowadzi do zahamowania wzrostu guza [4, 5].

Zaobserwowano, że bFGF pobudza migrację i proliferację melanocytów, tym samym może odgrywać ważną rolę w procesie repigmentacji przy współdziałaniu wielu innych czynników wydzielanych przez keratynocyty i fibroblasty, takich jak leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), endotelina 1 (ET-1), czynnik komórek macierzystych (SCF), wątrobowy czynnik wzrostu (HGF), melanotropina, czynnik wzrostu naskórka (EGF) czy płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) [2].

Badania histopatologiczne ujawniły, że w obrębie plam bielactwych brak jest aktywnych melanocytów albo są one uszkodzone. Zaobserwowano, że w środkowej i dolnej części pochwki zewnętrznej mieszka włosowego pozostają niedojrzałe melanocyty, charakteryzujące się brakiem aktywności enzymatycznej, tzw. DOPA-negative. Podczas remisji choroby dochodzi do aktywacji, proliferacji i migracji melanocytów, co klinicznie ujawnia się pojawieniem okotomieszkowych wysp repigmentacji [2]. Ponadto badania za pomocą mikroskopu elektronowego ujawniły, że w bielactwie dochodzi do zmian strukturalnych keratynocytów o charakterze zwyrodnienia wodniczkowego, obrzmienia organeli i zagęszczenia cytoplazmy. Sugeruje to, że w patogenezie choroby istotną rolę może odgrywać zaburzenie homeostazy cytokin w obrębie naskórkowej jednostki melaninowej, które prowadzi do nasilenia apoptozy melanocytów [6]. Potwierdza to opisywana u chorych z bielactwem zmniejszona ekspresja chroniących przed apoptozą białek Bcl-2 i p53, przy jednoczesnym wzroście białek Bax, FLIP, kaspazy 3, 8, 9, wykazujących przeciwstawne działanie [7].

Badania przeprowadzone przez Horikawa i wsp. [8] wskazują, że czynniki mitogenne, takie jak bFGF, ET-1, SCF oraz LTC<sub>4</sub>, indukują chemokinezę i chemotaksję melanocytów. Podobne wyniki przedstawili Zhang i wsp. [9], którzy w badaniu *in vitro* na pożywkach z fibronektyną zaobserwowali, że bFGF zwiększa przyleganie i migrację melanocytów. Ostatnie doniesienia opublikowane przez Wu i wsp. [10] sugerują, że w hodowli keratynocytów dochodzi do zwiększenia uwalniania bFGF pod wpływem naświetlań wąskopasmowym promieniowaniem UVB (NB UVB) o długości 311 nm, uznawanym obecnie za najbardziej skuteczną metodę leczenia bielactwa [1]. Ponadto stwierdzono, że za migrację melanocytów może częściowo odpowiadać zwiększona pod wpływem czynników mitogennych ekspresja p125<sup>FAK</sup> (ang. *phosphorylated focal adhesion kinase*) na melanocytach [11]. Na podstawie powyższych wyników badań część autorów sugeruje możliwość zastosowania bFGF w leczeniu bielactwa.



Ryc. 2. Porównanie stężeń TGF- $\beta$ 1 w surowicy chorych z bielactwem i osób z grupy kontrolnej

Z kolei Bradford i wsp. [12] potwierdzają, że bFGF wprawdzie stymuluje proliferację komórek barwnikowych, ale jednocześnie wywiera działanie hamujące na melanogenezę, zależnie od dawki.

Dane z piśmiennictwa sugerują ponadto, że do wystąpienia repigmentacji konieczne są morfologiczne i funkcjonalne zmiany w melanocytach oraz działanie wielu innych czynników, takich jak białko macierzy zewnątrzkomórkowej – kolagen typu IV oraz różne receptory integryn, które warunkują migrację komórek [8].

Sprzeczne dane prezentują Edmondson i wsp. [13], którzy uważają, że keratynocyty wydzielają bFGF w zbytnim stężeniu, aby pobudzać proliferację melanocytów [3, 18]. Na podstawie badań *in vivo* zakładają oni, że bFGF zwiększa liczbę melanocytów jedynie w obecności hormonu wzrostu i/lub insulinowego czynnika wzrostu (IGF-1).

Jeszcze inne wyniki prezentują Ozdemir i wsp. [14], którzy wykazali, że u pacjentów z bielactwem stężenie bFGF w surowicy jest wyższe istotnie statystycznie niż u zdrowych ( $p < 0,001$ ), co wg autorów odpowiada za hamowanie melanogenezy.

Badania przeprowadzone przez Yanga i wsp. [15] wskazują, że usunięcie bFGF z hodowli melanocytów zmniejsza cytotoksyczny wpływ 4-TBP (ang. *4-tertiary butylphenol*). Sugeruje to, że bFGF zwiększa wrażliwość melanocytów na toksyczny wpływ 4-TBT, a tym samym może odgrywać rolę w patogenezie bielactwa.

Moretti i wsp. [3] przeprowadzili badania immunohistochemiczne mające na celu porównanie ekspresji różnych cytokin w obrębie plam bielactwych, skóry na granicy odbarwień oraz skóry niezmięnionej. Autorzy zaobserwowali w obrębie plam bielactwych znaczne obniżenie ekspresji cytokin stymulujących komórki barwnikowe – GM-CSF, SCF i bFGF. Przeciwnie badacze donoszą o wysokim stężeniu IL-6, TNF- $\alpha$  o działaniu hamującym na

melanogenezę w obrębie odbarwionych zmian. Ponadto niezależnie od miejsca pobrania wycinka skóry obserwowano bardzo niską aktywność TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  tworzy rodzinę białek wywierającą wielokierunkowe działanie, odpowiadając za proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek [16]. W skórze właściwej zwiększa odkładanie macierzy międzykomórkowej oraz pobudza angiogenezę w procesie gojenia ran. W naskórku hamuje wzrost komórek, biorąc tym samym udział w homeostazie tkankowej [17].

TGF- $\beta$  produkowany przez pobudzone keratynocyty jest czynnikiem o silnych właściwościach immunosupresyjnych. Hamuje proliferację limfocytów T i B oraz aktywność komórek NK [18]. Uważa się, że w obrębie plam bielactwych zmniejszona jest liczba regulatorowych limfocytów T CD25+ (*T regs*), które produkują IL-10 i TGF- $\beta$ . Brak tych immunosupresyjnych cytokin umożliwia proliferację i migrację limfocytów T cytotoksycznych, prowadząc do depigmentacji [19]. Część autorów sugeruje, że właściwości immunosupresyjne cytokin TGF- $\beta$  i IL-10 można w przyszłości wykorzystać w leczeniu bielactwa [20].

Odmienne poglądy przedstawili Alanko i Saksela [17], którzy wykazali, że TGF- $\beta$  może wywierać działanie proapoptotyczne w stosunku do melanocytów. W warunkach prawidłowych produkowane przez keratynocyty warstwy podstawnej czynniki wzrostowe, takie jak bFGF oraz czynnik wzrostu nerwów, chronią melanocyty przed apoptozą indukowaną TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  pobudza ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), co także może przyczynić się do hamowania melanogenezy [16].

Wielu autorów mimo prezentowanych rozbieżnych wyników jest zgodnych, że bFGF i TGF- $\beta$ 1 odgrywają rolę w patogenezie bielactwa. Brak w piśmiennictwie jednoznacznych wniosków skłonił autorów do przeprowadzenia oznaczeń stężenia tych cytokin w surowicy pacjentów z bielactwem.

W przeprowadzonych oznaczeniach nie obserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniach bFGF i TGF- $\beta$  między grupą badaną i kontrolną. Może to wynikać ze zbyt małej liczby przebadanych chorych, różnic dotyczących wieku pacjentów, długości trwania bielactwa i mogącym stąd wynikać stopniu aktywności choroby. Autorzy uważają, że bFGF i TGF- $\beta$  odgrywają rolę w patogenezie bielactwa, a badanie należy traktować jako pilotażowe, stanowiące fragment dalszej całości.

Stosowane dotychczas metody leczenia bielactwa, tj. fototerapia, preparaty miejscowe, przynoszą jedynie krótkie okresy remisji i częściową poprawę zmian skórnych. Lepsze poznanie mechanizmów patogenetycznych w bielactwie ułatwi opracowanie nowych metod terapeutycznych, którymi może okazać się wykorzystanie działania mitogennego bFGF i immunosupresyjnego TGF- $\beta$ .

## Piśmiennictwo

1. Placek W. Bielactwo nabyte. *Przegl Dermatol* 2006; 93: 629-36.
2. Yu HS. Melanocyte destruction and repigmentation in vitiligo: a model for nerve cell damage and regrowth. *J Biomed Sci* 2002; 9: 564-73.
3. Moretti S, Spallanzani A, Amato L, et al. Vitiligo and epidermal microenvironment: possible involvement of keratinocyte-derived cytokines. *Arch Dermatol* 2002; 138: 273-4.
4. Giehl KA, Nägele U, Volkenandt M, Berking C. Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 7-14.
5. Nesbit M, Nesbit HK, Bennett J, et al. Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes. *Oncogene* 1999; 18: 6469-76.
6. Moretti S, Spallanzani A, Amato L, et al. New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res* 2002; 15: 87-92.
7. Dell'anna ML, Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 406-11.
8. Horikawa T, Norris DA, Yohn JJ, et al. Melanocyte mitogens induce both melanocyte chemokinesis and chemotaxis. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 256-9.
9. Zhang XQ, Feng J, Mou KH, et al. Effects of bFGF and alpha-MSH on adhesion and migration of human melanocytes in vitro. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 35: 161-4.
10. Wu CS, Yu CL, Wu CS, et al. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004; 13: 755-63.
11. Wu CS, Lan CC, Chiou MH, Yu HS. Basic fibroblast growth factor promotes melanocyte migration via increased expression of p125 (FAK) on melanocytes. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 498-502.
12. Bradford CS, Sun L, Barnes DW. Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994; 3: 78-86.
13. Edmondson SR, Russo VC, McFarlane AC, et al. Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor in melanocyte growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1638-44.
14. Ozdemir M, Yillar G, Wolf R, et al. Increased basic fibroblast growth factor levels in serum and blister fluid from patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 438-9.
15. Yang F, Abdel-Malek Z, Boissy RE. Effects of commonly used mitogens on the cytotoxicity of 4-tertiary butylphenol to human melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999; 35: 566-70.
16. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1482-91.
17. Alanko T, Saksela O. Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis in normal melanocytes but not in nevus cells grown in type I collagen gel. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 286-91.
18. Jakóbisziak M, Gołąb J, Zagożdżon R. Cytokiny. W: *Immunologia*. Kruczyńska K (red.), PWN, Warszawa 1998; 263-86.
19. Oyarbide-Valencia K, van den Boorn JG, Denman CJ, et al. Therapeutic implications of autoimmune vitiligo T cells. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 486-92.
20. Shahmoradi Z, Darougheh A, Misaghian S. Association of alopecia universalis, generalized vitiligo and Graves' disease. *J Res Med Scien* 2005; 10: 398-400.