

Chronic graft-versus-host disease, autoimmunity and microvascular pathology : an experimental approach to scleroderma

Citation for published version (APA):

Bos, G. M. J. (1989). *Chronic graft-versus-host disease, autoimmunity and microvascular pathology : an experimental approach to scleroderma*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Thesis. <https://doi.org/10.26481/dis.19890310gb>

Document status and date:

Published: 01/01/1989

DOI:

[10.26481/dis.19890310gb](https://doi.org/10.26481/dis.19890310gb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

**SUMMARY AND
CONCLUDING REMARKS**

SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS

Scleroderma or systemic sclerosis is a disorder of connective tissue and the (micro-)circulation. The simultaneous occurrence of skin lesions and vascular abnormalities – sometimes as a first sign of disease – has led to many speculations on the etiology of this disease : is scleroderma a microvascular disorder, or are microvascular changes secondary to other primary events ?

Chronic graft-versus-host skin pathology, in both man and rodents, shows striking similarities to scleroderma in man. Therefore, others have proposed experimental chronic graft-versus-host disease as a model to study the pathogenesis of scleroderma (see chapter I for literature review on scleroderma and graft-versus-host disease). However, thus far microvascular pathology had not been described in these models, whereas microvascular pathology is one of the hallmarks of scleroderma in man.

Therefore, the principle aim of this study was to establish the presence of microvascular skin pathology, if any, in an experimental model for scleroderma. The availability of an experimental model, showing both microvascular and histological lesions similar to scleroderma, might be worthwhile to elucidate its pathogenesis.

To study the skin microcirculation of rats *in vivo*, we have developed a model comparable to that used in man to study microvascular abnormalities in the nailfold. By the use of intravital microscopy, a clear picture of red blood cell columns of capillaries, smaller arterioles and venules of the superficial skin can be obtained in a hairless area adjacent to a toe. These pictures can be recorded on videotape and velocity measurements of red blood cells in the microvessels can be made off-line (chapter II). Only one model to study the skin microcirculation of rats has been described, where intravital microscopy is performed on the ear (Hertel, 1984). Since this model needs physical manipulation of the skin, to remove hairs, for optimal visualization of the microvessels, it was not appropriate for our study. We intended to avoid any physical or chemical damage to the skin of the rats possibly interfering with the development of chronic graft-versus-host disease. Besides, Hertel's model is not suitable to study reactive hyperemia, a parameter considered to be of interest to investigate the functionality of the microcirculation in models of experimental scleroderma.

The intravital microscopy model developed, turned out to be useful for our further studies. The pattern of the microvascular bed observed was similar in all animals investigated. Furthermore, the quality of the recordings was not hampered by aging of the animals, an important aspect because of the relatively long time period required for the development of experimental scleroderma in rats.

To assess the occurrence of microvascular skin pathology in experimental chronic graft-versus-host disease, bone marrow transplantations were performed in rats across full major histocompatibility barriers. By performing this bone marrow transplantation, chronic graft-versus-host disease was elicited which yielded histologically determined

skin pathology similar to that seen in scleroderma in man. *In vivo* these rats also showed microvascular capillary dilatations with a pattern similar to that in patients with scleroderma (chapter III). The latter observation supports the histological arguments to accept chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma.

In man, scleroderma has recently been classified in two subgroups. One form, diffuse cutaneous systemic sclerosis, is characterized by both skin and organ lesions indicative of scleroderma. Besides enlarged skin capillaries, these patients often show avascular areas in the microvascular bed of the skin nailfold. In the second group of patients, classified as limited cutaneous scleroderma, the disease is limited to the skin. In these patients capillary dilatations, but no avascular areas can be observed. Since the rats studied only showed skin pathology, and since avascular areas were not observed in these animals, we propose that this model for scleroderma represents limited cutaneous scleroderma and not diffuse cutaneous systemic sclerosis.

In addition to capillary abnormalities occluded arteries may also be observed in patients with scleroderma. In our model, the possible presence of arterial occlusions was investigated by eliciting reactive hyperemia reactions in the paws. As described in chapter III, no abnormal patterns of this reaction were observed in rats with chronic graft-versus-host disease. In addition, no lesions of the arteries were detected in skin biopsies. If arterial lesions are indeed absent in this model, this constitutes an important discrepancy between this model of experimental scleroderma and scleroderma in man. However, additional studies of the microcirculation are required to exclude the presence of arterial lesions in this model. Besides, the investigation of a larger number of animals might reveal arterial manifestations of disease.

After the presence of dilated capillaries had been established in this model, it was of interest to see whether microvascular lesions or histological lesions are primary in this model. Therefore, several attempts were made to study the development of clinical, histological and microvascular parameters prospectively. However, these attempts failed since we were not able to obtain enough animals with chronic graft-versus-host disease in later experiments. Although we have no definitive explanation for this failure, the absence of pathogens in the animals used may have been responsible for this phenomenon. The first experiments, which yielded the highest incidence of both acute and chronic graft-versus-host disease, were performed in animals possibly infected with a Sendai virus. It is known that viral infections can enhance the development of graft-versus-host disease. Since later experiments were performed in animals that were "specific pathogen-free" (no antibodies against pathogenic rodent bacteria and viruses detectable), this might explain the low incidence of graft-versus-host disease in these experiments.

To make the model of graft-versus-host disease more suitable for the study of the pathogenetic mechanisms in experimental scleroderma, a higher incidence of rats with chronic graft-versus-host disease per experiment is needed. To achieve this, two possibilities can be considered. Firstly, the same model can be reproduced using other rat strains. It is known that some rat strains are more susceptible to develop certain diseases, including chronic graft-versus-host disease, than others. Secondly, the number

of animals with acute graft-versus-host disease may be increased by adding donor T-lymphocytes to the grafted bone marrow transplant. Although this protocol might raise the risk of early death due to severe acute graft-versus-host disease, an optimal number of cells might possibly increase the incidence of chronic graft-versus-host disease.

The second aim of this study was to develop a new model for experimental scleroderma. Two arguments prompted us to seek for another model. Firstly, the fact that chronic graft-versus-host disease cannot definitively be seen as an autoimmune model, whereas scleroderma in man is likely to be so (see chapter I), and secondly, the low number of rats developing experimental scleroderma in the classical graft-versus-host model.

Hence, we have adopted the model of Glazier *et al.*, in which autoimmune disease is evoked by manipulation of hemopoietical reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation. Temporal administration of Cyclosporine-A after syngeneic bone marrow transplantation has been shown to induce an autoimmune reaction after withdrawal of the drug. This autoimmune reaction yields disease clinically and histologically indistinguishable from that elicited by the classical graft-versus-host reaction. In chapter IV, the pathology of this model is described. In the chronic phase of this autoimmune disease, remarkable similarities to chronic graft-versus-host disease were noticed, including scleroderma-like pathology. An inflammatory reaction with a mononuclear cell infiltrate and increased collagen formation in the lower dermis and subdermal regions in this model, were comparable to the histological manifestations of (early) scleroderma in patients.

Whether a folliculitis, prominently present in this experimental model, is also a main event in scleroderma in man is less clear. Inflammation around hair follicles has been described, but early inflammatory reactions in scleroderma are not restricted to hair follicles. This difference suggests that inflammatory (auto-)immune reactions against (unknown) antigens, which might be different in rat and man, might lead to similar pathology in the chronic phase of the disease. To what extent the target antigens attacked in the autoimmune experimental model are similar to those in human scleroderma cannot be concluded from the present study. Nevertheless, this model is the first to show that autoimmune phenomena may lead to scleroderma-like histological alterations.

Vascular abnormalities were not observed in the autoimmune model for scleroderma. In chapter IV it has been mentioned that the number of animals with scleroderma-like histopathological lesions may have been too small to observe vascular pathology. Besides, there may be a principal difference between classical chronic graft-versus-host disease and the Cyclosporine-induced autoimmune model. In the latter, changes in the chronic phase are mainly present in the lower dermis and subdermal region. At that level of the skin, vascular alterations cannot be observed by intravital microscopy.

To study the cellular mechanisms involved in the development of disease in the Cyclosporine-induced autoimmune model, we have analyzed the lymphocyte subsets after bone marrow transplantation. In this study it was demonstrated that reappearance of T-lymphocytes of the CD4 (W3/25) phenotype was suppressed as long as Cyclosporine-A was given, whereas the repopulation of this subset of cells was associated with the development of autoimmune disease, suggesting a role for these cells in initiating the disease (chapter V).

Cells of the CD4 phenotype are usually class II restricted T-helper cells. However, more recent studies have shown that cells with this phenotype may also effect killer activity. Therefore, if the CD4 positive lymphocytes do indeed initiate the autoimmune disease, this does not reveal the immunopathogenetic mechanisms involved in its progress. Hence, functional investigations on this CD4-lymphocyte subset are necessary to understand the mechanism(s) by which the disease is elicited, and, perhaps most importantly, to determine the antigen(s) against which their reactivity is directed.

Are chronic graft-versus-host disease and Cyclosporine-induced chronic autoimmunity in rats adequate models for scleroderma in man ?

The observation of capillary dilatations in the skin of rats with experimental scleroderma due to chronic graft-versus-host disease is an important argument to add to the already existing evidence that chronic graft-versus-host disease can be used as a model for scleroderma. Because of the manifestations of the disease (limited to the skin and no avascular areas in the skin microvascular bed) the model rather represents limited cutaneous scleroderma than diffuse cutaneous systemic scleroderma. However, the possible absence of arterial pathology is an important discrepancy between experimental and clinical scleroderma. It should be said that if arterial pathology cannot be demonstrated in further studies, the model does not fully represent systemic scleroderma in man.

In case of Cyclosporine-induced experimental scleroderma, the question regarding its relevance as a model for scleroderma in man is even more difficult to answer, since we observed no microvascular abnormalities thus far. Only screening of larger groups of animals with experimental scleroderma can prove or disprove the presence of microvascular manifestations in this model. Without vascular manifestations the model is unlikely to be fully representative for scleroderma in man.

It remains to be established whether the two models described reflect the immune mechanisms leading to scleroderma in man. Most importantly, it is intriguing to see that two fundamentally different models give rise to similar clinical and histological manifestations of the disease. This observation raises the question as to what the actual difference between these models might be. The acute phase in the classical graft-versus-host reaction is probably due to a reaction directed against histocompatibility antigens not shared between donor and recipient. In the Cyclosporine-A model, autoimmune phenomena are more likely to play a role.

It is unlikely that the primary events of scleroderma are in any respect related to the above described models, since in scleroderma acute graft-versus-host-like pathology or epidermal lesions have never been described, neither clinically nor histologically. How could these models then be related to scleroderma? In early scleroderma inflammatory reactions have been observed which suggest an (auto-)immune reaction against unknown antigens. The parallel between the experimental models and scleroderma in man could be that the acute phase of graft-versus-host/autoimmune disease induces the expression of formerly unexpressed neo- or auto-antigens. If tolerance against these antigens fails to be established, this may give rise to a continuous (auto-)immune reaction both in experimental chronic graft-versus-host disease and Cyclosporine-A induced autoimmune disease. This continuous (auto-)immune reaction might be comparable to the pathophysiological process in scleroderma in man, although the event(s) inducing expression of normally absent antigens remains unidentified.

The identification of the antigens responsible for the continuing (auto-)immune reaction in the experimental models described in this thesis, might trace the (auto-)antigens responsible for the (auto-)immune reactions leading to scleroderma in man.

**NEDERLANDSTALIGE
SAMENVATTING**

NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

Sclerodermie (Grieks: verharding van de huid) is een bindweefselziekte, waarbij voornamelijk de huid is aangedaan. Maar ook de slokdarm, longen, het hart en de nieren kunnen bij het ziekteproces betrokken zijn. Bij deze ziekte is er sprake van een toename van bindweefsel-afzetting in de hierboven genoemde organen, met als gevolg dat deze organen hun functie geheel of gedeeltelijk kunnen verliezen. Naast de toegenomen bindweefselafzetting, kunnen er bij patiënten met sclerodermie ook afwijkingen aan de bloedvaten optreden. Ook hierdoor kunnen organen belemmerd worden in hun functie. In het geval van een verminderde bloedvoorziening naar de huid, kan er sprake zijn van het zogenaamde Raynaud fenomeen (achtereenvolgens een witte, blauwe en rode verkleuring van met name de vingers), ten teken dat de doorbloeding (tijdelijk) belemmerd is. In voortgeschreden gevallen kan de belemmerde bloedvoorziening echter ook leiden tot afsterven van de huid.

De ontstaanswijze van sclerodermie is onduidelijk. Mogelijk is sclerodermie een autoimmuunziekte, d.w.z. de witte bloedcellen die bij normaal functioneren een rol spelen bij de bestrijding van indringers van buitenaf, richten zich nu tegen onbekende structuren (antigenen) van het eigen lichaam. Omdat bij sclerodermie zowel sprake is van afwijkingen aan de bloedvaten, alsook van een toegenomen afzetting van bindweefsel, is een lang bestaande vraag welke afwijkingen oorzaak en welke gevolg zijn. In de literatuur hierover kan men zowel aanwijzingen vinden dat afwijkingen aan de bloedvaten leiden tot beschadiging aan de organen, met als gevolg een verhoogde afzetting van bindweefsel, maar ook dat primaire beschadiging van de organen leidt tot afwijkingen van de bloedvaten.

Gezien het chronische karakter van sclerodermie, is het moeilijk om bij patiënten verder inzicht te verkrijgen in de oorzaak van het ziekteproces. Daarom hebben diverse onderzoekers getracht om diermodellen geschikt te maken voor het bestuderen van dit ziektebeeld. Eén van deze modellen is voortgekomen uit de observatie dat chronische afstotingsreacties na een beenmergtransplantatie, waarbij donor en ontvanger genetisch niet identiek zijn (de chronische graft-versus-host reactie), pathologische veranderingen laat zien die sterke gelijkenissen vertonen met de afwijkingen bij sclerodermie. Echter, bij dit model zijn geen afwijkingen aan de bloedvaten beschreven. Gezien het feit dat afwijkende bloedvaten een belangrijke rol spelen bij sclerodermie moet de relevantie van dit model betwijfeld worden. Bovendien, om de interactie van bindweefselziekte en vaatpathologie te kunnen bestuderen is de aanwezigheid van vaatpathologie een voorwaarde. Het eerste doel van ons onderzoek was er derhalve op gericht om te bestuderen of er in het model van chronische graft-versus-host ziekte aanwijzingen voor vaatpathologie gevonden konden worden.

Om deze vraagstelling te kunnen beantwoorden was allereerst de ontwikkeling van een systeem nodig waarbij de kleine bloedvaten in de huid van een rat (het proefdier waarmee in deze studie is gewerkt) kunnen worden geobserveerd. Bij patiënten is dit mogelijk door middel van intravitaal-microscopie, een techniek waarbij met een mi-

croscop haarvaten (capillairen) van de huid o.a. in de nagelriem zichtbaar kunnen worden gemaakt. Deze capillairen vertonen bij patienten met sclerodermie afwijkingen die met intravitaal-microscopie eenvoudig waarneembaar zijn. De techniek van intravitaal-microscopie is ook toegepast bij onze proefdieren. Een voordeel van deze techniek is dat bestudering van de huid-bloedvaten mogelijk is, zonder de huid daarbij te moeten beschadigen. Bovendien kunnen met deze techniek bij eenzelfde proefdier in de loop van de tijd dezelfde vaten bestudeerd worden (zie hoofdstuk 2).

Na de aanpassing van de techniek van intravitaal-microscopie voor ratten, is deze techniek toegepast op ratten waarbij sclerodermie was uitgelokt door middel van een graft-versus-host reactie ten gevolge van een beenmergtransplantatie. Bij die ratten die histologische (= weefselstructuur) aanwijzingen hadden voor sclerodermie van de huid, bleken dezelfde vaatafwijkingen (verwijding van de capillairen) voor te komen als waargenomen bij patienten met sclerodermie. De observatie van het tegelijkertijd optreden van bindweefselafwijkingen en het optreden van vaatpathologie in de huid wordt gezien als een nieuw argument om dit proefdiermodel te accepteren als model voor sclerodermie. Bovendien maakt deze combinatie van afwijkingen het mogelijk de hierboven beschreven vraagstelling over de interactie tussen vaatpathologie en bindweefselafwijkingen in dit model te bestuderen.

Behalve aan het model van de chronische graft-versus-host reactie, is in deze studie ook aandacht besteed aan een het ontwikkelen van een nieuw model voor sclerodermie. Dit model maakt gebruik van de waarneming dat een beenmergtransplantatie, waarbij het beenmerg van donor en ontvanger genetisch aan elkaar gelijk zijn (syngene), gecombineerd met het tijdelijk toedienen van het als immunosuppressivum bekende cyclosporine-A leidt tot een autoimmunreactie. Met andere woorden, de combinatie van bestraling en cyclosporine-A veroorzaakt een reactie waarbij de witte bloedcellen zich tegen structuren van het eigen lichaam richten. In dit model, waarbij nog weinig duidelijkheid bestaat over de reden waarom deze autoimmunreactie ontstaat, treden afwijkingen op die sterk lijken op de afwijkingen die ontstaan bij een graft-versus-host reactie zoals die hierboven beschreven is. In hoofdstuk 4 is een studie weergegeven, waarbij het beloop van deze autoimmunreactie bestudeerd is. Hieruit blijkt dat ook in dit tweede model, bij een langer bestaan van de autoimmunreactie, de afwijkingen in de huid duidelijke gelijkenissen vertonen met de afwijkingen zoals die gezien worden bij patienten met sclerodermie. Dit model kan dan ook gezien worden als een nieuw experimenteel model voor sclerodermie. Echter, het zoeken naar vaatpathologie met behulp van intravitaal-microscopie heeft in dit model nog geen waarneming van afwijkende capillairen opgeleverd. Bestudering van grotere aantallen ratten met deze vorm van sclerodermie is derhalve nodig om het wel of niet bestaan van vaatafwijkingen in dit model aan te tonen. Het moge duidelijk zijn dat slechts het optreden van deze vaatafwijkingen de gewenste bestudering van de interactie tussen vaatpathologie en verhoogde bindweefselafzetting mogelijk maakt.

Omdat de inductie van de autoimmunreactie na de combinatie van een syngene beenmergtransplantatie en het toedienen van cyclosporine-A verloopt via nog niet opgehelderde mechanismen, hebben wij binnen dit model het patroon van lymfocyten (T cellen, een subgroep van de witte bloedcellen) bestudeerd. Uit deze studie is gebleken dat T helper lymfocyten na de beenmergtransplantatie en gedurende de toediening van cyclosporine-A verminderd aanwezig zijn in het bloed. Na het stoppen van de cyclosporine-A toediening treedt een herstel op van deze T helper lymfocyten. Het weer verschijnen van deze lymfocyten in het bloed gaat samen met het ontstaan van de autoimmunreactie, hetgeen suggereert dat deze cellen een rol spelen bij de inductie van de autoimmunreactie (zie hoofdstuk 5).

Samenvattend heeft de studie beschreven in dit proefschrift betrekking op twee modellen ter bestudering van het ziektebeeld sclerodermie. In het eerste model, waarbij sclerodermie opgewekt wordt door middel van een afstotingsreactie na een beenmergtransplantatie, is zowel bindweefselpathologie alsook vaatpathologie gevonden gelijkend op die bij patienten met sclerodermie. Deze observatie maakt de bestudering van de interactie tussen vaatpathologie en bindweefselpathologie in dit model mogelijk. In het tweede model, waarbij een autoimmunreactie wordt uitgelokt na een beenmergtransplantatie met genetisch identiek beenmerg, zijn weliswaar ook aanwijzingen gevonden voor het bestaan van sclerodermie, maar konden (nog) geen vaatafwijkingen worden aangetoond. De bestudering van de aanwezigheid van lymfocyten in dit tweede model maakt het opstellen van een meer gedetailleerde hypothese met betrekking to de onderliggende mechanismen bij deze autoimmunreactie mogelijk.

Verdere uitwerking van deze modellen kan het inzicht in de mechanismen welke een rol spelen bij het ontstaan van de ziekte sclerodermie vergroten.