

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIV, 35

SECTIO D

1969

Katedra i Klinika Okulistyczna. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Tadeusz Krwawicz

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Kazimierz GERKOWICZ,
Izabela KOŻUCHOWSKA-WŁODARSKA,
Józef STASZYC

Immunopresyjne działanie Trenimonu w doświadczalnej keratoplastyce

Иммунопрессионное воздействие тренимона (*Trenimon*)
в экспериментальной кератопластике

Immunosuppressive Action of Trenimon in Experimental Keratoplasty

Wykorzystanie możliwości współczesnej techniki operacyjnej w zakresie przeszczepiania tkanek i narządów jest nadal ograniczone trudnościami w opanowaniu procesów immunologicznych powodujących odrzucenie przeszczepu przez jego biorcę. Ponieważ swoistość antygenów transplantacyjnych jest uwarunkowana genetycznie, przyjęcie przeszczepów bez wywołania objawów niezgodności tkankowej jest możliwe tylko u osób o identycznym genotypie. Tej podstawowej zasady immunologii tkankowej nie podważają korzystne wyniki uzyskiwane przy transplantacji allogenicznych przeszczepów rogówki, która dzięki swej budowie histologicznej stanowi naturalny przykład istnienia tzw. „bariery biologicznej” umożliwiającej utrzymanie stanu tolerancji immunologicznej biorcy. W pozbawionej naczyń rogówce biorcy antygeny transplantacyjne przeszczepu mają utrudniony czy uniemożliwiony kontakt z immunologicznie kompetentnymi komórkami biorcy i nie indukują produkcji skierowanych przeciw sobie przeciwciał. W tych warunkach odrzucenie przeszczepu obserwuje się znacznie rzadziej aniżeli przy transplantacjach allogenicznych wykonywanych do rogówek bliznowatych, bogato unaczynionych.

Celem zmniejszenia względnie wykluczenia reakcji immunologicznej w przebiegu transplantacji rogówki przeprowadzono dotychczas liczne badania nad osłabieniem właściwości antygenowych używanych przeszczepów rogówkowych względnie nad zmniejszeniem wrażliwości biorcy (8, 10, 11, 12, 13, 15). Ostatnio żywe zainteresowanie budzi możliwość farmakologicznej kontroli reakcji immunologicznej drogą wywołania w ustroju biorcy przeszczepu, stanu tolerancji immunologicznej. Stan taki zapewniłby trwale utrzymanie nie tylko przeszczepów allogenicznych, ale umożliwiałby również transplantacje przeszczepów rogówkowych ksenogenicznych. Pomimo że leki immunosupresyjne stwarzają zachęcające perspektywy w chi-

urgii przeszczepów, zbyt mała liczba odpowiednich spostrzeżeń u zwierząt doświadczalnych i u ludzi (5, 7, 14, 15, 21, 24, 25) nie pozwala jeszcze na właściwą ocenę możliwości ich szerokiego stosowania w keratoplastyce. Konieczna przy tym ostrożność jest uwarunkowana między innymi ujemnym wpływem wywieranym przez środki immunosupresyjne na wewnątrzkomórkowe procesy metaboliczne i gojenie się ran (6, 22) oraz niebezpieczeństwem dużego osłabienia mechanizmów odpornościowych biorcy przeszczepu. Te niekorzystne objawy uboczne obserwuje się niejednokrotnie już w czasie podawania środków cytostatycznych. Mogą one również stanowić późne powikłania tego leczenia, przy czym częstość ich występowania zależy nie tylko od rodzaju używanego leku i jego dawki, ale w dużym stopniu od indywidualnej reakcji organizmu. Z tych względów wywołane farmakologicznie stany tolerancji immunologicznej u biorców przeszczepów rogówkowych wymagają dalszych badań zaplanowanych w różnych układach doświadczalnych, pozwalających ustalić dawkowanie i czas stosowania danego środka — optymalne dla uzyskania jego działania immunosupresyjnego przy maksymalnym wykluczeniu wpływu toksycznego.

BADANIA WŁASNE

Nasze badania będące tematem obecnego doniesienia dotyczyły immunosupresyjnego działania Trenimonu stosowanego w przebiegu transplantacji przeszczepów ksenogenicznych i allogenicznych rogówki u królików. W ocenie tych badań uwzględniono wpływ Trenimonu (środka antymitotycznego firmy Bayer) na utrzymanie się i przejrzystość przeszczepów rogówkowych oraz zachowanie się wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych w obrębie przeszczepionego płata i rogówki biorcy.

Badania przeprowadzono u 23 królików albinosów, u których uprzednio powtarzając uraz termiczny spowodowano powstanie unaczynionej blizny rogówki umiejscowionej paracentralnie w odległości około 1—2 mm od rąbka. Po uzyskaniu blizny wykonywano keratoplastykę warstwową śródrogówkową wg metody Krwa w i c z a (13). Ogólną ilość zwierząt doświadczalnych podzielono na 4 grupy: u 4 królików I grupy wykonano przeszczepienia rogówki allogenicznej na jednym oku zwierzęcia. U 7 zwierząt II grupy wykonano na jednym oku przeszczepienia świeżej rogówki ksenogenicznej, pobranej ze zwłok ludzkich po upływie 3—8 godzin po śmierci. W III grupie obejmującej 6 królików wykonano przeszczepienia allogenicznej rogówki zwierzęcej początkowo na oku prawym, doszczepiając następnie po upływie 12—14 dni przeszczep warstwowi allogeniczny do rogówki oka lewego. W IV grupie obejmującej 6 królików przeprowadzono przeszczepienie ksenogenicznej rogówki ludzkiej początkowo na oku prawym, doszczepiając następnie po 12—14 dniach przeszczep ksenogeniczny do rogówki oka lewego wg Babela i Bourquin (1). Zwierzętom doświadczalnym podawano Trenimon dożylnie w ilości 0,1 mg/kg wagi zgodnie z przyjętym schematem: pierwsza iniekcja w dniu poprzedzającym operację, kolejne siedem iniekcji w odstępach trzydniowych, ostatnia w dwudziestym szóstym dniu po wykonanej transplantacji. U zwierząt z doszczepianymi przeszczepami jedną z dawek Trenimonu podawano przed drugą keratoplastyką. U wszystkich zwierząt oznaczano leukocytozę przed i w czasie leczenia Trenimonem oraz obserwowano wpływ tego środka na wygląd i zachowanie się królików, ich łaknienie i ciężar ciała. Obserwacje przeszczepionego płata prowadzono od dnia operacji codziennie kontynuując je do 104 dnia po keratoplastyce.

Badania histochemiczne przeprowadzano na preparatach z wycinków zawierających fragment rogówki królika i przeszczepianego płata.

Dla badań przeglądowych preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną. W badaniach histochemicznych posługiwano się następującymi metodami barwienia:

1. Barnetta i Seligmana — dla wykrycia grup sulfhydrylowych, związanych z białkiem (BSH) (2).
2. Barwienie PAS wg Mac Manusa (17, 26).
3. Feulgena — oznaczanie kwasu dezoksyrybonukleinowego (9).
4. Metodą Bracheta — na obecność kwasu rybonukleinowego (4).
5. Aktywność fosfatazy zasadowej oznaczano przez sprzęganie z barwnikami dwuazowymi w modyfikacji Lojdy (16).
6. Aktywność fosfatazy kwaśnej — oznaczano wg Gomoriego.
7. Aktywność adenozyotrójfosfatazy — wg Padykuli i Hermana (18).

WYNIKI BADAŃ

Podawany według ustalonego przez nas schematu Trenimon nie wpływał ujemnie na stan ogólny zwierząt, jak również nie powodował u nich wyraźnego, krytycznego spadku liczby leukocytów. Zgon trzech zwierząt stwierdzony w czwartym tygodniu po przeprowadzonej keratoplastyce był spowodowany zakażeniem, na którego przebieg podawany Trenimon nie miał uchwytne go wpływu. U królików I grupy jednostronne allogeniczne przeszczepy rogówkowe przez cały okres obserwacji zachowały całkowitą przejrzystość nie wykazując makroskopowo ani mikroskopowo cech choroby płata.

U zwierząt II grupy z wykonanym przeszczepem ksenogenicznym rogówki na jednym oku, obserwowano w 3 dniu dość słabo wyrażony odczyn rogówkowy w postaci wnikania naczyń, które następnie wrastały do przeszczepionego płata w piątym — szóstym dniu. W 10 dniu po operacji tylko u jednego królika stwierdzono delikatne zmętnienie przeszczepu, które ustąpiło około 32 dnia po zabiegu. U innych zwierząt przejrzyste przeszczepy wykazywały rozpoczynające się delikatne zmętnienie dopiero około 25 dnia po operacji (ryc. 1). Zmętnienia te powiększały się w następnych dniach utrzymując się do 32—50 dnia, po czym ustępowały dość szybko. W okresie pomiędzy 70 a 104 dniem od wykonanej transplantacji przeszczepy rogówkowe pozostawały całkowicie przejrzyste (ryc. 2). U żadnego z badanych królików nie obserwowano wyraźnych odczynów w rogówce biorcy ani reakcji zapalnych tęczówki.

Obserwacje III grupy zwierząt z przeszczepami allogenicznymi na obu oczach wykazywały całkowite zachowanie przejrzystości przeszczepów przez cały okres obserwacji. W wyniku obserwacji IV grupy zwierząt, u których wykonano kolejne przeszczepienie ksenogenicznych przeszczepów na obu oczach, zaobserwowano u 1 królika zmętnienie prze-

szczepu pierwszego oraz u 2 zwierząt zmętnienie przeszczepów drugich, podczas gdy pierwsze przeszczepy pozostały przejrzyste. Zmętnienie przeszczepu pierwszego wystąpiło w 4 tygodniu po keratoplastyce, podobnie zresztą jak zmętnienie przeszczepów drugich, które pojawiło się w 4 tygodniu po operacji.

Badania histologiczne i histochemiczne rogówki u zwierząt z przejrzystymi przeszczepami przeprowadzono po zakończeniu obserwacji klinicznej zwierząt (po 104 dniach). Płat przeszczepu był na całej swej powierzchni pokryty nabłonkiem wielowarstwowym płaskim, a elementy komórkowe przeszczepu i rogówki królika biocytry wykazywały prawidłową strukturę. Intensywność barwienia się rogówki przeszczepu była taka sama zarówno w odniesieniu do barwników kwaśnych, jak też zasadowych (ryc. 3). W miejscu odpowiadającym bliźnie łączącej przeszczep z rogówką królika nie stwierdzono obecności nacieków komórkowych charakterystycznych dla zmian zapalnych.

Wolne grupy SH stwierdzano w jądrach i cytoplazmie komórek nabłonka z podobnym nasileniem odczynu w nabłonku rogówki królika i przeszczepu. Dodatni odczyn na obecność wolnych grup SH występował również w komórkach pozostałych warstw rogówki i przeszczepu (ryc. 4). Dodatni odczyn na obecność białkowych grup SH stwierdzany w oglądanych preparatach wykazywał równomierne ich rozmieszczenie w komórkach rogówki i przeszczepu. Grupy SH były obecne w jądrach i w cytoplazmie. Widoczne jest nieco większe nasilenie odczynu w okolicy jąder.

W cytoplazmie komórek nabłonka przeszczepu i rogówki królika występują ziarnistości PAS dodatnie (pomimo zablokowania grup aldehydowych dimedonem) odpowiadające złogom wewnątrzkomórkowym glikogenu. Pod wpływem diastazy krystalicznej ilość ziarnistości PAS dodatnich uległa znacznemu zmniejszeniu, co pozwala sądzić, że składają się one z glikogenu i mukopolisacharydów. Ziarnistości PAS pozytywne stwierdza się w podobnych ilościach w nabłonku przeszczepu i rogówki królika, nie wykazano ich natomiast w innych warstwach zarówno rogówki królika, jak i transplowanego płata.

Przy pomocy odczynu Feulgena stwierdzono pojedyncze ziarnistości lub ich skupienia odpowiadające DNA w obrębie jąder komórkowych. Intensywność tego odczynu w jądrach komórek przeszczepu była podobna, jak w rogówce królika (ryc. 5). W cytoplazmie i jąderkach komórek nabłonka rogówki i przeszczepu barwienie metodą Bracheta uwidacznia ziarnistości odpowiadające RNA. Odczyn pyroninochłonny znika po trawieniu rybonukleazą, przy czym szybciej ulega wytrawieniu RNA cytoplazmy aniżeli RNA zawarty w jąderkach. Porównanie nasilenia odczynu na obecność RNA w komórkach przeszczepu i rogówki królika

pozwala stwierdzić nieco większe nasilenie dodatniego odczynu w okolicy ich zrostu (ryc. 6).

Aktywność Fz wykazano w komórkach warstwy nabłonkowej oraz w komórkach warstwy właściwej zarówno przeszczepu, jak i rogówki królika (ryc. 7). Ziarenka fosfataz dodatnie zlewają się w dość duże konglomeraty układając się bliżej wolnej powierzchni komórek. Pewne nasilenie odczynu wykazującego pobudzenie aktywności Fz obserwuje się w komórkach blizny łączącej rogówkę z przeszczepem.

We wszystkich komórkach nabłonka rogówki i przeszczepu wykazano dodatni odczyn na aktywność Fk. Odpowiadające tej fosfatazie ziarnistości skupiają się w okolicy jądra. Odnosi się wrażenie, że komórki walcowate nabłonka wykazują większą od innych aktywność Fk. Stwierdza się również w komórkach warstwy właściwej rogówki królika i przeszczepu odczyn na fosfatazę kwaśną.

W cytoplazmie komórek nabłonka rogówki wystąpił odczyn na ATP-azę w postaci drobnych ziarnistości skupiających się zwłaszcza wokoło jądra. Odczyn na aktywność ATP-azy jest równie intensywny w nabłonku rogówki, jak i w komórkach tej warstwy przeszczepu (ryc. 8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Trenimon, stosowany w omawianych badaniach jest lekiem cytostaticznym należącym do grupy środków alkilujących, które w dużym stężeniu powodują rozpad jąder komórkowych, a w odpowiednio mniejszych dawkach tylko hamują procesy mitozy. Mechanizm antymitotycznego działania Trenimonu nie jest całkowicie wyjaśniony, wiadomo jednak, że wiąże się on z pewnymi zaburzeniami wewnątrzkomórkowej przemiany materii. Najistotniejszym z tych zaburzeń jest zahamowanie glikolizy, z którym wiąże się zmniejszenie ilości zawartego w komórkach kwasu adenozynotrójfosforowego będącego głównym źródłem energii dla wielu cykli przemiany materii. Trenimon wywiera również bezpośredni wpływ na kwasy nukleinowe obniżając wyraźnie ich syntezę oraz metabolizm białek komórkowych. Znajduje to swój wyraz morfotyczny w zmianach strukturalnych jądra i jąderkach.

Podobnie jak inne środki cytostatyczne z grupy alkilujących, Trenimon hamuje powstawanie reakcji immunologicznych oddziaływując na tzw. fazę produkcyjną syntezy przeciwciał (19, 23). Dla wykorzystania immunosupresyjnego wpływu tego środka należy go więc podawać równocześnie z antygenem lub też jeden do dwu dni przed zadziałaniem antygeny na ustrój. W przypadku przeszczepów tkankowych powstaje również problem jak długo należy podawać środki wywołujące stan immunologicznej tolerancji w ustroju biorcy przeszczepów. Dotychez-

sowe postępowanie ma charakter raczej empiryczny, nie umiemy bowiem z całą pewnością stwierdzić, kiedy przeszczep przestaje być antygenowo czynny i w jakim okresie po transplantacji jego antygeny przestają indukować powstawanie przeciwciał w ustroju biorcy. Za wczesne przerwanie podawania środków immunosupresyjnych może, jak wiadomo, spowodować ujawnienie objawów reakcji immunologicznych uszkadzających przeszczep (23, 24), natomiast długie leczenie omawianymi preparatami zwiększa niebezpieczeństwo powstawania szkodliwych objawów ubocznych.

Uwzględniając trudności opracowania dokładnego schematu immunosupresyjnego leczenia Trenimonem w przypadkach keratoplastyki u królików uważaliśmy za słuszne podawanie tego środka w okresie pierwszych 4 tygodni po wykonaniu transplantacji, ponieważ w okresie tym najczęściej powstają objawy tzw. choroby płata, warunkujące jego odrzucenie lub zmętnienie. Podawany zgodnie z przyjętym w naszych badaniach schematem Trenimon, jak wynika z przedstawionych spostrzeżeń, nie powodował powstania całkowitej tolerancji immunologicznej u królików w przebiegu keratoplastyki ksenogenicznej.

W przebiegu keratoplastyki allogenicznej, wykonanej na jednym oku zwierzęcia, obserwowano zmętnienia przeszczepów, które występowały jedynie przejściowo. Zmętnienie większej ilości przeszczepów drugich w przebiegu obustronnej keratoplastyki ksenogenicznej odpowiada niedostatecznie zahamowanym reakcjom immunologicznym gospodarza, wywołanym antygenem pierwszego przeszczepu. Trenimon nie znosząc całkowicie reakcji immunologicznej powodował jednakże wyraźne jej zmniejszenie, o czym świadczą obserwacje przeprowadzone nad zachowaniem się przeszczepów ksenogenicznych, które nie otrzymywały leków cytostatycznych. Kożuchowska (12) wykonując keratoplastykę ksenogeniczną u 10 królików obserwowała zmętnienie pierwszego przeszczepu u dwu zwierząt i u wszystkich dziesięciu zmętnienie drugich przeszczepów.

Trenimon, podawany dożylnie królikom w ilościach i w czasie określonym schematem doświadczenia, nie powodował wyraźnie uchwytnych zmian strukturalnych w jądrach komórkowych rogówki królika oraz przeszczepionego płata. Na podstawie badań histochemicznych sądzimy, że nie wpływał on ujemnie na metabolizm wewnątrzkomórkowy. Badane przez nas fragmenty przemiany węglowodanowej i białkowej, a także aktywność niektórych enzymów w warstwach wszczepionego płata, odpowiadały odpowiednim etapom prawidłowego metabolizmu wewnątrzkomórkowego poszczególnych warstw rogówki, przy czym nasilenie odczynów dodatnich było podobne.

Lauzieri i wsp. (14) stwierdzili, że stosowanie 6-merkaptopuryny u psów po przeprowadzonej całkowitej keratoplastyce ksenogenicznej pozwala jedynie uzyskać osłabienie i zmniejszenie nasilenia reakcji immunologicznych tylko w czasie do dwudziestu dni po operacji. Leibowitz i Elliott (15), a także Soob i Basu (cyt. wg autora poz. 14), uważają, że krótko stosowana terapia środkami z grupy antymetabolitów jak 6-merkaptopuryna czy immuran opóźniają reakcje immunologiczne powodując odrzucenie przeszczepów rogówki, ale nie blokują ich całkowicie. Być może, że nieuzyskanie całkowitej tolerancji immunologicznej u zwierząt leczonych środkami antymetabolicznymi jest zależne od zbyt małych dawek tych leków, ponieważ np. u królików dla zupełnego zahamowania reakcji immunologicznych przy pomocy 6-merkaptopuryny konieczne jest podawanie tego leku w bardzo wysokich toksycznych dawkach (23). W warunkach naszego postępowania doświadczalnego uzyskaliśmy pod wpływem podawania Trenimonu nie całkowite, jednakże wyraźne hamowanie i zmniejszenie reakcji immunologicznej w przebiegu keratoplastyki doświadczalnej. Wyniki naszych badań, podobne do uzyskiwanych przez innych autorów po stosowaniu środków immunosupresyjnych, wskazują na celowość dalszych badań nad przydatnością tych środków w keratoplastyce.

PIŚMIENNICTWO

1. Babel J., Bourquin J. B.: *Brit. J. Ophthal.* **36**, 529—536, 1952.
2. Barnett R., Seligman A.: *Science* **16**, 523—528, 1952.
3. Bilski R.: *Skrypt metod histochemicznych*, Warszawa, T.T.H.C. 1963.
4. Brachet J., Jeener R.: *Bioch. Bioph. Acta* **2**, 423—430, 1948.
5. Elliott J., Leibowitz H.: *AMA Arch. Ophthal.* **76**, 709—715, 1966.
6. Elliott J., Leibowitz H.: *AMA Arch. Ophthal.* **76**, 334—337, 1966.
7. Ellis Ph., Sellyei L., Kurland L.: *Amer. J. Ophthal.* **61**, 709—715, 1966.
8. Faure J.: *Arch. D'Ophthal.* **24**, 603—620, 1964.
9. Feulgen R.: cyt. wg Pearse, *Histochemia Teoretyczna Stosowana*, P.Z.W.L. Warszawa 1957.
10. Goldfeld N., Bazina T.: *Viest. Oftal.* **80**, 28—31, 1967.
11. Kozuchowska-Włodarska I., Staszyc J.: *Klin. Oczna* **36**, 477—480, 1966.
12. Kozuchowska-Włodarska I.: *Klin. Oczna* **37**, 845—851, 1967.
13. Krwawicz T.: *Klin. Oczna* **30**, 129—142, 1960.
14. Lauzieri M., Secchi A., Gabrieli G.: *Amer. J. Ophthal.* **61**, 715—718, 1966.
15. Leibowitz H., Elliott J.: *AMA Arch. Ophthal.* **76**, 338—344, 1966.
16. Lojda Z., Ereš B., Pelichowa H.: *Histochemie* **3**, 428—454, 1964.
17. Mc Manus J.: *J. Path. Bact.* **58**, 93—99, 1946.
18. Padykula H., Herman E.: *J. Histochem. et Cytochem.* **3**, 161—195, 1955.
19. Patkowski J.: *Post. Hig. i Med. Doświad.* **21**, 755—783, 1967.

20. Payrau R., Bonel L., Guyard M.: Ann. D'Ocul. 191, 636—669, 1958.
21. Polack F.: AMA Arch. Ophthal. 74, 685—689, 1965.
22. Romanowski J., Kubicki B.: Pol. Tyg. Lek. 22, 1971—1973, 1967.
23. Schwartz R., Eisner A., Demeshek W.: J. Clin. Investigation 38, 1394—1403, 1959.
24. Sellyei L., Ellis Ph.: Amer. J. Ophthal. 61, 702—709, 1966.
25. Urrets-Zavalía cyt. wg Elliott i Leibowitz poz. 5.
26. Zawistowski S.: Technika Histologiczna, PZWL, Warszawa 1965.

Otrzymano 14.XII.1968.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Widoczne delikatne zmętnienie przeszczepu po 25 dniach.

Ryc. 2. Płat przeszczepionej rogówki przejrzysty po 70 dniach.

Ryc. 3. Przeszczep przejrzysty. W warstwie właściwej rogówki gospodarza widoczny fragment przeszczepu. Utrwal. Carnoy. Barw. hematoksyliną Delafielda i eozyną. Pow. ca 200 ×.

Ryc. 4. Przeszczep przejrzysty. Wolne grupy -SH uwidocznione w komórkach nabłonka wg m. Barnetta i Seligmana. Utrwal. w 1% roztworze kwasu trójchlorooctowego w 80% etanolu. Pow. ca 200 ×.

Ryc. 5. Przeszczep przejrzysty. W jądrach komórek widoczny jest dodatni odczyn Feulgena na DNA. Utrwal. w płynie Carnoy. Metoda Feulgena. Pow. ca 200 ×.

Ryc. 6. Przeszczep przejrzysty. RNA wybarwiony wg m. Bracheta występuje w większej ilości w sąsiedztwie jądra komórkowego i w jąderkach. Utrwal. w płynie Carnoy. Pow. ca 200 ×.

Ryc. 7. Przeszczep przejrzysty. Ziarenka aktywne na Fz wykazane wg m. sprzęgania zlewają się tworząc duże konglomeraty. Utrwal. w zimnym acetonie. Metoda sprzęgania wg Lojdy. Pow. ca 200 ×.

Ryc. 8. Przeszczep przejrzysty. Wyczernione elementy ATP-azy tworzą skupiska w komórkach nabłonka. Skrawki świeże, nieutrwalone. Metoda Padykuli i Hermana. Pow. ca 200 ×.

РЕЗЮМЕ

Наблюдения проводились на 25 венских белых кроликах, у которых проводилась интрароговичная аллогеническая и ксеногеническая слоистая кератопластика путем подачи в качестве биологического средства тренимона. Проведены также гистохимические исследования прозрачных интрароговичных трансплантатов. В результате наблюдений установлено отчетливое торможение и уменьшение иммунологических реакций, происходящих под влиянием этого препарата. Полученные результаты указывают на целесообразность исследований пригодности тренимона в кератопластике.

SUMMARY

In 23 rabbits, intracorneal lamellar keratoplasty, using allogenic and xenogenic grafts, was combined with administration of Trenimon as an

immunosuppressive preparation. The grafts which remained transparent were also examined histochemically. The experiment demonstrated slowing-downs and reduction of the immunological reaction under the influence of Trenimon. Further studies on the usefulness of Trenimon in keratoplasty ought to be continued.

LEGEND TO THE FIGURES

Fig. 1. Delicate clouding of the graft, 25 days after operation.

Fig. 2. Corneal graft, 70 days after operation.

Fig. 3. Transparent graft. A fragment of the graft is seen in the *substantia propria* of the host. Fixed according to Carnoy, stained with Delafield's haematoxylin and eosin. Magn. about $\times 200$.

Fig. 4. Transparent graft. Free SH groups demonstrated in the epithelial cells by the method of Barnett and Seligman. Fixed in 1% solution of trichloroacetic acid in 80% ethanol. Magn. about $\times 200$.

Fig. 5. Transparent graft. In the cell nuclei positive Feulgen's reaction to DNA is seen. Fixed in Carnoy's solution. Feulgen's method. Magn. about $\times 200$.

Fig. 6. Transparent graft. RNA, stained according to Brachet, occurs in considerable quantities in the vicinity of the cell nucleus and nucleolus. Fixed in Carnoy's solution. Magn. about $\times 200$.

Fig. 7. Transparent graft. Alkaline phosphatase-active granules, visualized by the coupling method, merge into large conglomerates. Fixed in cold acetone. Coupling method according to Lojda. Magn. about $\times 200$.

Fig. 8. Transparent graft. ATP-ase elements, stained black, accumulate in the epithelial cells. Fresh, non-fixed sections. Method of Padykula and Herman. Magn. about $\times 200$.



