

Benzalkonium Chloride에 의한 각막내피세포 구조와 기능의 변화

박 원 태 · 김 기 산

= 요 약 =

Benzalkonium chloride(BAC)가 각막내피세포의 기능과 미세구조에 대한 영향을 알아보고자 하였다. 백색가토 16마리를 대상으로 한눈은 실험군, 반대편 눈은 대조군으로 사용하였고 실험군은 다시 0.01%, 0.001%, 0.0002% 및 0.0001% BAC의 4군으로 나누었다. Dual-chambered specular microscope를 변형시킨 perfusion system에 가토의 각막을 고정하여 인공전방을 형성한 후 각 실험군의 각막내피세포는 해당농도의 BAC가 첨가된 glutathione-bicarbonate Ringer(GBR)용액을, 대조군에는 GBR용액만을 관류하였다. 관류하는 동안 매 15분마다 각막두께를 측정하여 시간에 따른 각막두께의 변화(각막부종률)를 비교 분석하였다. 관류실험후 각막은 투과전자현미경관찰을 위해 2.5% glutaraldehyde용액에 고정하였다. 0.0001% BAC군의 각막부종률은 대조군과 차이가 없었으나($p>0.05$) 0.0002%, 0.001%, 0.01%에서는 각막부종률이 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다($p<0.05$). 전자현미경검사상 0.0001% BAC군에서는 정상적인 각막내피세포 소견을 보였으나, 0.0002% BAC군과 0.001% BAC군에서는 가역적인 세포손상의 소견이 나타났고 0.01% BAC군에는 핵막이 소실되고 세포내소기관이 파괴되는 비가역적 세포손상이 일어났다. 그러므로 장기간 BAC를 포함한 점안약을 점안할 때에, 특히 각막상피의 장벽기능이 없는 각막궤양등의 질환시에는 주의가 필요할 것으로 사료된다(한안지 40:2423~2430, 1999).

= Abstract =

The Changes of Ultrastructure and Function of the Corneal Endothelial Cell Caused by Benzalkonium Chloride

Won-Tae Park, M.D., Ki-San Kim, M.D.

<접수일 : 1999년 4월 21일, 심사통과일 : 1999년 7월 8일>

계명대학교 의과대학 안과학교실

Address reprint requests to Ki-San Kim, M.D.

Department of Ophthalmology, Dongsan Medical Center, Keimyung University School of Medicine

#194 Dongsan-dong, Jung-ku, Taegu, 700-712, Korea

Tel : 82-53-250-7708, 7703, Fax : 82-53-250-7705

* 본 논문의 요지는 1998년 제 80차 대한안과학회 춘계 학술대회에서 구연발표되었음.

The purpose of this study was to evaluate alterations in corneal endothelial cell function and ultrastructure caused by benzalkonium chloride(BAC). Sixteen albino rabbits(32 eyes) were used for this study. One cornea of each matched pair was assigned to experimental group and the other cornea to control group. The experimental groups were divided into 4 groups, of which corneal endothelium were perfused with 0.01%, 0.001%, 0.0002%, and 0.0001% BAC. After paired rabbit corneas were isolated and mounted in the in vitro dual-chambered specular microscope, experimental corneas of each matched pair were perfused with different concentrations of BAC. Control corneas were perfused with glutathione-bicarbonate-Ringer solution(GBR). Corneal thickness was measured every 15 minutes throughout the perfusion period. Swelling rates were calculated by linear regression analysis, and compared to swelling rate of each paired mate perfused with GBR alone. At the end of perfusion, the corneas were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution for transmission electron microscopy(TEM). Swelling rates of rabbit corneas perfused with BAC, 0.0001% did not differ significantly from control corneas($p>0.05$). But, 0.0002%, 0.001%, and 0.01% BAC differed significantly from control corneas($p<0.05$). BAC, 0.0001% showed normal corneal endothelial findings, but 0.0002% and 0.001% BAC showed reversible endothelial cellular injury. BAC, 0.01% showed irreversible endothelial cellular injury such as loss of nuclear membrane and disruption of cellular organelles. The results of this study indicate that long-term use of topical eye solutions containing BAC might induce corneal endothelial damage, especially in the absence of epithelial barrier such as corneal ulcer (J Korean Ophthalmol Soc 40:2423~2430, 1999).

Key Words : Benzalkonium chloride, Corneal endothelium, Corneal swelling rate

Benzalkonium chloride(BAC)는 가장 널리 사용되어지는 보존제(preservative)로 우수한 항균작용, 약제의 안정성과 각막투과 항진작용이 있으나, 강력한 양이온 세제효과로 인한 각막상피세포의 손상을 일으킨다고 알려져 있다^{1,2)}. BAC와 thimerosal 등의 보존제와 약제에 노출된 각막상피세포의 주사전자현미경적 소견¹⁾, 상용되는 점안제에 노출후 토끼 각막의 전기생리학적 연구³⁾, 배양된 각막상피세포에 의한 보존제의 세포독성에 관한 연구⁴⁾, 보존제가 포함한 점안제에 노출한 후 5,6-carboxyfluorescein을 이용한 각막상피세포의 투과성 측정⁵⁾ 등의 보존제들에 의한 각막상피세포의 영향에 대한 여러 보고들이 있다. 또한 안구 표면질환(ocular surface disorder) 환자가 장기간 보존제가 포함된 점안제의 과용으로 인해 각막내피세포의 손상이 생겨 전층 각막이

식술을 했다는 증례보고가 있다⁶⁾. 저자들은 각막내피세포를 장시간 보존제에 노출시킨 후 각막부 종률의 측정과 전자현미경검사소견으로 각막내피세포의 기능과 구조에 변화를 일으키는 BAC의 농도를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

백색가토(2~3kg) 16마리(32안)를 대상으로 하였고, 한눈은 실험군으로, 반대편 눈은 대조군으로 사용하였다. 실험군은 다시 0.01%, 0.001%, 0.0002% 그리고 0.0001% BAC (Janssen chemica company, 미국)군으로 나누었다. 과량의 근육이완제(pancuronium bromide)를 근육주사하여 가토를 희생시킨 후 안구를 적출하여 공막연을 약 2~3mm 포함하여 각막

을 절제한 후 Dikstein과 Maurice⁷⁾가 고안한 경면 현미경을 변형시킨 관류계에 공막연을 포함한 각막을 고정하여 인공전방을 형성하였다. 각막상피세포가 건조됨을 방지하고 또한 현미경의 대물렌즈가 접촉될 때 깨끗한 상을 얻기 위해 각막상피세포 표면 위를 실리콘 유(Dow corning 200 Fluid, 한국 다우코닝 주식회사, 한국)로 도포하였다. 각막내피세포의 관류는 실험군에서는 우선 glutathione-bicarbonate-Ringer (이하 GBR) 용액만으로 1시간 정도 관류하여 각막 두께가 안정이 된 후에 BAC와 혼합하여 원하는 농도로 각각 만들어서 이 용액으로 계속 2시간 이상 더 관류하였다. 대조군은 계속 GBR용액만으로 같은 시간동안 관류하였다. GBR용액은 NaCl 111.56mM, KCl 4.82mM, NaHCO₃ 29.20mM, glucose 5.01mM, CaCl₂ · 2H₂O 1.04mM, MgCl₂ · 6H₂O 0.78mM, NaH₂PO₄ 0.86mM, glutathione 0.30mM (Sigma Chemical Co., 미국)를 용해하여 pH 7.4로 조정하고 삼투압은 285~300mOsm이 되게 하였다. 이때 관류액의 온도는 37°C, 관류속도는 0.1 ml/min으로 일정하게 관류하고, 인공전방내의 압력은 약 15~20mmHg이 되도록 하였다. 관류하는 동안 매 15분마다 경면 현미경에 부착된 미세 초점 조절기기를 이용하여 각막두께를 측정하고 시간별로 측정된 각막두께를 선형회귀분석을 이용하여 각막부종률을 계산하고 실험군과 대조군을 비교하였다. 통계적 분석을 위해서는 student t-test가 사용되었으며 p값이 0.05미만인 경우를 유의한 것으로 보았다. 관류실험이 끝난 후 각막을 전자현미경검사를 위해 2.5% glutaraldehyde용액으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고, 0.1M phosphate buffer로 수세한 후 1% OsO₄용액에 2시간 후고정을 실시한 다음 같은 원총용액으로 세척하여 계열 에탄올로 탈수시켰다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법에 의한 epon혼합물로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간동안 방치하여 열증합을 시켰다. 포매된 조직을 1μm 두께로 박절한 후 toluidine blue염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형

초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색의 간섭색을 나타내는 초박절편(40~50nm)을 얻어서 grid에 부착한 뒤 Watson 및 Reynolds 방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

결 과

0.01% BAC로 관류한 군에서는 각막부종률이 $100.35 \pm 8.85 \mu\text{m}/\text{hr}$ 이었고, GBR만으로 관류한 대조군에서는 $5.12 \pm 1.08 \mu\text{m}/\text{hr}$ 으로 0.01% BAC로 관류한 경우 유의한 각막부종이 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 1). 투과전자현미경소견상 대조군은 대부분의 사립체(mitochondria)와 내형질세망(endoplasmic reticulum)은 정상이었고 약간의 세포질내의 공포형성이 있는 정상적인 소견을 보였고 0.01% BAC군은 세포막이 불규칙하고

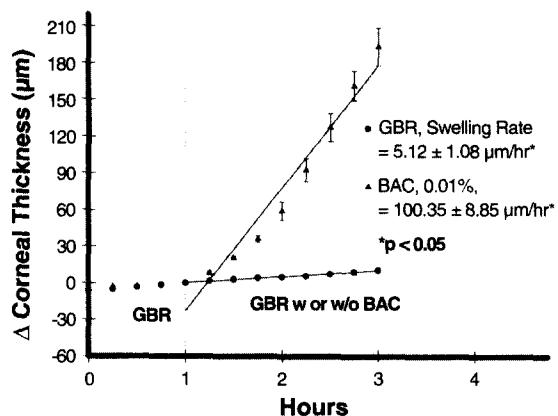


Figure 1. Corneal swelling rates in rabbit corneas perfused with 0.01% BAC : Paired rabbit corneas were perfused with a control solution(GBR solution) for about 1 hour stabilization period. After stabilization period, one cornea of each matched pair was perfused with 0.01% BAC for additional 2 to 3 hours, and the control cornea with GBR. The rabbit corneas perfused with 0.01% BAC showed increase in corneal thickness at the mean swelling rate of $100.35 \pm 8.85 \mu\text{m}/\text{hr}$, which differed significantly from swelling rate of control cornea perfused with GBR($5.12 \pm 1.08 \mu\text{m}/\text{hr}$).

Figure 2. (A) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with GBR shows normal endothelial ultrastructure ($\times 10,000$). (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with 0.01% BAC shows irreversible endothelial cellular injury such as shrunken cytoplasm, loss of nuclear membrane and disruption of cellular organelles ($\times 12,000$).

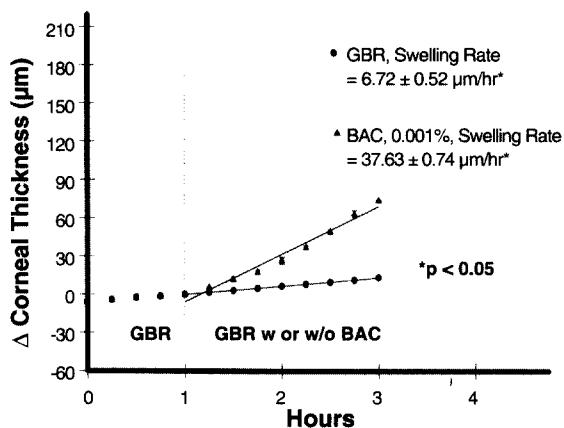


Figure 3. Corneal swelling rates in rabbit corneas perfused with 0.001% BAC : Paired rabbit corneas were perfused with a control solution (GBR solution) for about 1 hour stabilization period. After stabilization period, one cornea of each matched pair was perfused with 0.001% BAC for additional 2 to 3 hours, and the control cornea with GBR. The rabbit corneas perfused with 0.001% BAC showed increase in corneal thickness at the mean swelling rate of $37.63 \pm 0.74 \mu\text{m}/\text{hr}$, which differed significantly from swelling rate of control cornea perfused with GBR ($6.72 \pm 0.52 \mu\text{m}/\text{hr}$).

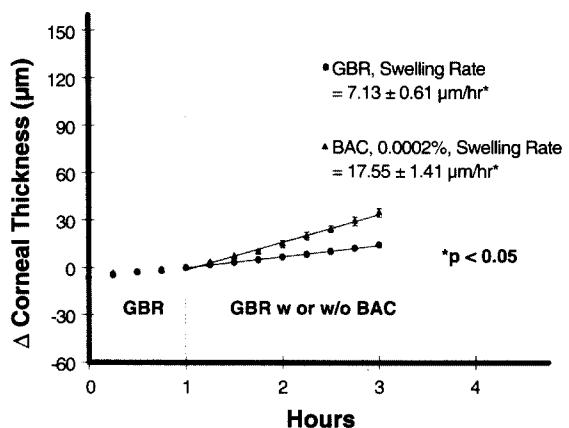


Figure 4. Corneal swelling rates in rabbit corneas perfused with 0.0002% BAC : Paired rabbit corneas were perfused with a control solution (GBR solution) for about 1 hour stabilization period. After stabilization period, one cornea of each matched pair was perfused with 0.0002% BAC for additional 2 to 3 hours, and the control cornea with GBR. The rabbit corneas perfused with 0.0002% BAC showed increase in corneal thickness at the mean swelling rate of $17.55 \pm 1.41 \mu\text{m}/\text{hr}$, which differed significantly from swelling rate of control cornea perfused with GBR ($7.13 \pm 0.61 \mu\text{m}/\text{hr}$).

Figure 5. (A) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with 0.001% BAC shows reversible cellular injury such as dilated endoplasmic reticulum and mitochondria, and vacuoles in the cytoplasm ($\times 8,000$). (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with 0.0002% BAC also shows reversible cellular injury such as dilated endoplasmic reticulum and mitochondria, and vacuoles in the cytoplasm, but intercellular tight junction is intact ($\times 12,000$).

세포질의 용적이 줄어들었으며 핵막의 소실, 세포질내의 공포형성과 세포소기관의 파괴가 보이는 등 비가역적인 세포손상이 보였다(Fig. 2). 0.001%와 0.0002% BAC군에서도 실험군에서는 각막부종률이 각각 $37.63 \pm 0.74 \mu\text{m}/\text{hr}$, $17.55 \pm 1.41 \mu\text{m}/\text{hr}$ 로써 대조군의 $6.72 \pm 0.52 \mu\text{m}/\text{hr}$, $7.13 \pm 0.61 \mu\text{m}/\text{hr}$ 과는 두 군간에 역시 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$) (Fig. 3, 4). 투과전자현미경 소견상 0.001% BAC군은 전반적인 내형질세망과 사립체의 확장 및 세포질내의 공포형성이 있는 가역적인 세포 손상이 보였고 0.0002% BAC군은 다소 세포질의 팽창이 있었으나 융합막(tight junction)은 온전하였으며 전반적인 내형질세망과 사립체의 확장 및 세포질내의 공포형성이 있는 가역적인 세포 손상이 보였다(Fig. 5). 그러나 0.0001% BAC군에서는 각막부종률이 $6.18 \pm 1.42 \mu\text{m}/\text{hr}$ 이었고, GBR만으로 관류한 대조군에서는 $6.67 \pm 1.07 \mu\text{m}/\text{hr}$ 으로 유의한 각막부종이 없었다($p > 0.05$) (Fig. 6). 투과전자현미경 소견상 0.0001% BAC군은 세포질내의 몇 개의 작은 공포와 내형질세망의 확장이외에 세포막, 세포소기관 등이 정상적으로 잘 유지되었다(Fig. 7).

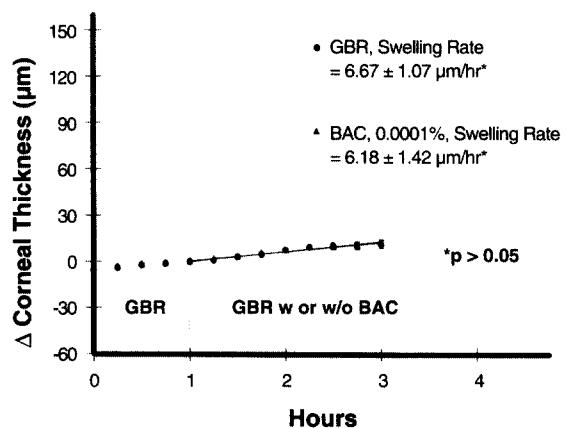


Figure 6. Corneal swelling rates in rabbit corneas perfused with 0.0001% BAC : Paired rabbit corneas were perfused with a control solution (GBR solution) for about 1 hour stabilization period. After stabilization period, one cornea of each matched pair was perfused with 0.0001% BAC for additional 2 to 3 hours, and the control cornea with GBR. The rabbit corneas perfused with 0.0001% BAC showed increase in corneal thickness at the mean swelling rate of $6.18 \pm 1.42 \mu\text{m}/\text{hr}$, which did not differ significantly from swelling rate of control cornea perfused with GBR ($6.67 \pm 1.07 \mu\text{m}/\text{hr}$).

Figure 7. Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with 0.0001% BAC shows normal-looking endothelial ultrastructure except for mild dilatation of the endoplasmic reticulum and a few small vacuoles in the cytoplasm ($\times 10,000$).

고 찰

안과영역에서 사용되어지는 대부분의 점안제는 BAC, chlorhexidine digluconate, polyquaternium-1, thimerosal 등의 보존제를 포함하고 있다. 그 중에 BAC가 가장 많이 사용되어지며 현재 상용화되는 BAC의 농도는 0.005%에서 0.033%이다. BAC는 alkylbenzyldimethylammonium chloride의 혼합물이며 약제의 안정성과 항균력을 증가시키며 약제의 조직투과성을 증가시킨다^{1,2)}. 그러나, BAC는 안구표면질환을 더 악화시키고 표재성 점상각막염(superficial punctate keratitis), 상피내소낭(intraepithelial microcyst), 그리고 외상후 각막상피의 재생의 지연을 초래하는 등의 각막의 독성도 알려져 있다⁴⁾. BAC를 점안시 각막상피에 대한 독성은 널리 알려져 있는데, BAC는 각막의 표층상피세포를 탈락시키거나 융합막을 파괴시킴으로써 각막상피의 투과성을 증가시킨다는 전자현미경 및 전기생리학적 연구^{3,8)}와, 0.01% BAC를 토끼 각막에 한번 점안한 후 주사전자현미경으로 촬영했을 때 1시간 후에는 대부분의 각막 상피의 표면

세포의 탈락이 일어나고 3시간 후에는 각막 상피 두번째층의 세포의 탈락이 일어난다는 보고¹⁾ 등이 대표적인 예다. 반복각막진무름(reccurent corneal erosion)이나 각막궤양 환자에서는 눈물과 각막실질 사이의 장벽기능을 하는 각막상피가 없기 때문에 각막상피가 존재할 때보다 약제의 투과성이 증가되어 보존제가 각막내피세포까지 전달이 될 수 있기 때문에 각막내피세포에 대한 영향을 생각해야 한다.

본 연구에서 각각 다른 농도의 BAC로 관류하였을 때 각막부종률은 0.0001% BAC에서만 대조군과 차이가 없었고 0.0002%, 0.001%, 0.01% BAC에서는 의의있는 각막부종률을 보여서 각막내피세포의 기능 이상을 초래하는 BAC의 농도는 0.0001% 보다 높은 농도인 것으로 생각된다. 또 관류하는 BAC의 농도가 증가할수록 각막의 두께가 증가했으며 BAC의 농도에 따라 0.0001%에서 0.001% BAC 농도 사이의 각막부종률의 증가폭이 0.001%에서 0.01% BAC 농도 사이보다 더 커졌다. Green 등⁹⁾의 백색가토의 분리된 각막내피쪽으로 3시간동안 BAC의 각막내피세포에 미치는 영향에 대한 연구를 보면 6.5×10^{-6} %에서 6.5×10^{-3} %까지 다른 농도의 BAC를 관류하여 각막내피의 손상을 일으키는 농도의 한계치는 대략 6.5×10^{-5} %와 6.5×10^{-4} % 사이라고 하였으며 관류하는 BAC의 농도가 증가할수록 각막의 두께가 증가했다고 하였다. 방수의 회전율(turnover rate)때문에 전방 방수내의 보존제의 농도가 시간에 따라 옅어지므로 결국 각막내피가 보존제에 노출되는 시간이 중요한데, Green 등⁹⁾은 단지 15분동안 보존제를 각막내피에 노출하더라도 다음 두시간동안 각막부종을 유발시키고 45분동안 보존제를 각막내피에 노출한 경우 3시간 노출한 경우와 각막부종률이 비슷하다고 하여 일정시간 이상 노출되면 비가역적인 손상이 급속히 발생된다고 하였다.

대부분의 점안제는 국소점안할 때 전방내의 농도가 각막 표면의 농도보다 약 1/1000배로 낮아진다고 한다⁹⁾. 따라서 0.01% BAC로 점안하면 전방내의 농도는 0.00001%가 된다. 본 연구에서 각막내피손상을 일으키는 BAC의 한계농도가

0.0001%로 위의 농도는 1/10에 해당되어 안전할 것으로 생각할 수 있다. Sasamoto 등¹⁰은 7일동안 하루에 정상각막을 가진 토끼의 결막낭에 6번 0.005% BAC 용액을 점안하고 난 후 광학현미경과 전자현미경적 소견상 각막내피세포의 병적인 소견은 없다고 보고하였다. Green 등⁹은 0.133% BAC로 상피를 제거한 각막에 5번 점안할 때 각막내피세포의 기능이나 구조의 변화가 없었다고 하였다. 그러나, 56세 전성각막염 환자에서 장기간 BAC를 포함한 안약의 점안으로 각막내피의 손상을 일으켜 전총각막이식술을 시행하였다는 증례 보고⁶와 백색가토의 정상각막에 0.01% BAC 용액을 3분 간격으로 40회 점안 후 각막내피세포의 비정상적인 전자현미경적 소견이 일어난다는 보고¹¹가 있어 BAC에 의한 각막내피세포의 손상 가능성을 항상 염두에 둬야 하겠다.

약물로 인한 세포손상의 조직학적 변화는 가역적인 변화와 비가역적 변화로 나뉘는데, 가역적 변화는 세포질내의 공포형성, 원형질막의 변화, myelin figure의 생성, 사립체의 팽창과 감소, 형질내세망과 골지체의 팽창, 조면소포체로부터 리보조음(ribosome)의 탈파립, polysomes의 분리, 세포막의 수포 형성 등이며, 비가역적 변화는 원형질막과 세포소기관막의 심한 손상, 무정형 음영(amorphous densities)을 가진 사립체의 심한 팽창, 변질된 단백질을 의미하는 솜털같은 물질(fluffy material), 세포질내의 myelin figure와 무정형의 osmophilic debris 등이 보인다고 한다^{12,13}.

본 연구에서 다른 농도의 BAC로 관류 후 투과전자현미경 소견으로 0.0001% BAC에서는 세포질내의 몇 개의 작은 공포와 내형질세망의 확장을 제외하고는 전반적으로 정상 소견을 나타냈지만 0.0002%, 0.001% BAC는 전반적인 내형질세망과 사립체의 확장 및 세포질내의 공포형성이 있는 가역적인 세포 손상이 보였고 0.01% BAC는 비가역적 세포 손상을 보였다. Hull¹⁴은 0.00065% BAC로 관류할 때 토끼 각막내피세포의 세포소기관들이 심하게 팽창하였다고 하였다. Collin 등¹⁵은 정상적인 토끼각막 4안과 각막절제술을 한 토끼각막 6안을 대상으로 0.02% BAC를 한시간

당 9번 점안한 후 주사전자현미경으로 검사할 때 정상각막에서는 1안이 소수의 사립체(mitochondria)에서 cristae의 변형이 있는 반면 각막절제술을 한 토끼각막 전체에서는 중심부의 각막내피세포의 사립체의 대부분이 팽창되거나 파괴되었으며 이러한 사립체의 변화는 세포내의 에너지 생성, 이온 수송, 물의 이동 등을 억제시키며 각막내피의 장벽기능을 변화시킨다고 하였고, 각막상피의 장벽기능이 없는 각막궤양 환자에서는 BAC가 포함된 안약의 점안으로도 각막내피세포의 손상을 일으킬 수 있다고 하였다.

본 연구의 결과는 Green 등⁹이 발표했던 결과와 유사하지만, 방수의 회전율 때문에 전방 방수내의 보존제의 농도가 일정하게 유지되지 못하므로 실제로 임상에서 점안제를 투여한 경우와 차이가 날 것으로 사료된다. 그러나, 백색가토의 정상각막에 0.01% BAC 용액을 3분 간격으로 40회 점안 후 각막내피세포의 비정상적인 전자현미경적 소견이 일어난다는 보고¹¹가 있고 토끼의 각막내피는 재생능력이 매우 강하지만 사람의 경우에는 재생능력이 거의 없기 때문에 BAC의 각막내피에 대한 손상은 더 심각할 것으로 생각된다. 따라서 각막상피가 없거나 각막상피의 기능이 저하되어 있는 경우 예를 들면, 심한 건성안이거나 각막궤양인 경우 점안제를 선택하는데 있어서 보존제의 함량이나 종류에 특별한주의가 필요하며 불필요한 점안제의 남용은 피하고 보존제가 포함되지 않은 점안제의 투여가 바람직하다고 생각된다.

REFERENCES

- Pfister RR, Burstein N : *The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium. A scanning electron microscope study.* Invest Ophthalmol Vis Sci 15:246-259, 1976.
- Gassett AR, Ishii Y, Kaufman HE, Miller T : *Cytotoxicity of ophthalmic preservatives.* Am J Ophthalmol 78:98-105, 1974.
- Burstein NL, Klyce SD : *Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium.* Invest

- Ophthalmol Vis Sci* 16:899-911, 1977.
- 4) Imperia PS, Lazarus HM, Botti RE Jr, Lass JH : An *in vitro* method for measuring ophthalmic preservative cytotoxicity. *J Toxicol Cut Ocular Toxicol* 5:309-317, 1986.
 - 5) 이종화, 김기산 : Benzalkonium Chloride 및 점안제에 의한 각막상피세포의 장벽기능 변화. *한안지* 36 :1655-1661, 1995.
 - 6) Lemp MA, Zimmerman LE : Toxic endothelial degeneration in ocular surface disease treated with topical medications containing benzalkonium chloride. *Am J Ophthalmol* 105:670-673, 1988.
 - 7) Dikstein S, Maurice DM : The metabolic bases to the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 221:29-41, 1972.
 - 8) Bernal DL, Ubels JU : Quantitative evaluation of corneal epithelial barrier: effect of artificial tears and preservatives. *Curr Eye Res* 10:645-656, 1991.
 - 9) Green K, Hull DS, Vaughn ED, Malizia AA, Bowman K : Rabbit endothelial response to ophthalmic preservatives. *Arch Ophthalmol* 95:2218-2221, 1977.
 - 10) Sasamoto K, Akagi Y, Kodama Y, Itoi : Corneal endothelial changes caused by ophthalmic drugs. *Cornea* 3:37-41, 1984.
 - 11) 박세평, 한영호, 허방 : 각막내피세포에 대한 Benzalkonium Chloride의 독성. *한안지* 36:1155-1161, 1995.
 - 12) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL : *Robbins Pathologic Basis of Diseases*, 5th ed, Philadelphia, W. B. Sanders company, 1994, pp. 1-34.
 - 13) Maximilian Buja L, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH : Apoptosis and necrosis, basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 117:1208-1214, 1993.
 - 14) Hull DS : Effect of epinephrine, benzalkonium chloride, and intraocular miotics on corneal endothelium. *South Med J* 72:1380-1381, 1979.
 - 15) Collin HB, Carroll N : Ultrastructural changes to the corneal endothelium due to benzalkonium chloride. *Acta Ophthalmologica* 64:226-231, 1986.