

## Hydrogen Peroxide에 의한 실험적 각막내피세포손상에 대한 Hyaluronic Acid의 효과

김기산 · 이우석 · 오준섭

### = 요약 =

과산화수소에 의한 각막내피세포손상을 유발하고 hyaluronic acid가 이러한 손상을 억제하는 효과가 있는지를 알아 보고자 하였다. 관류장치에 각막을 고정하여 인공전방을 형성하고 glutathione-bicarbonate-ringer(GBR) 용액으로 약 첫 1시간 동안 각막내피세포를 관류한 다음 실험약제를 약 2시간 가량 관류하고 관류동안 매 15분마다 각막두께를 측정하여 각막부종율을 계산하였고 실험약제로는 과산화수소(0.25mM, 0.5mM), catalase, Healon, Viscoat, hyaluronic acid 0.01% 및 chondroitin sulfate 0.04%를 사용하였고 관류실험후 각막을 glutaraldehyde에 고정하여 투과전자현미경으로 각막내피세포를 관찰하였다. 과산화수소 0.5 mM은 뚜렷한 각막부종을 유발한 반면 0.25mM은 각막부종이 유발되지 않았다. Healon은 과산화수소에 의한 각막부종을 억제하였고 Viscoat는 오히려 각막두께의 감소를 보였다. 두 점탄물질의 경우 각막내피세포의 미세구조는 잘 유지되었다. Hyaluronic acid 0.01%, catalase 15000U는 각막부종을 억제하였으며 역시 미세구조는 정상이었다. 그러나 chondroitin sulfate는 각막부종을 억제하지 못하였고 세포질내 많은 공포가 관찰되었다. 이상의 결과로 Healon과 Viscoat는 각막내피세포를 과산화수소로부터 보호하며 이는 기계적으로뿐 아니라 hyaluronic acid 자체의 작용으로도 손상이 억제됨을 알 수 있었다(한안지 39:2514~2526, 1998).

### = Abstract =

## Effect of Hyaluronic Acid on the Experimental Corneal Endothelial Damage by Hydrogen Peroxide

Ki-San Kim, M.D., Ph.D., Woo-Suk Lee, M.D., Joon-Sup Oh, M.D., Ph.D.

<접수일 : 1998년 3월 16일, 심사통과일 : 1998년 4월 30일>

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Keimyung University, Dongsan Medical Center  
#194 Dongsan-dong, Chung-gu, Taegu, 700-310, Korea  
Tel : 82-053-250-7708, Fax : 82-053-250-7705

\* 본 논문의 일부는 1997년 5월 11일-16일에 미국 Ft. Lauderdale에서 개최된 ARVO학회에서 발표되었음.

\* 본 논문의 일부는 동산의료원 의과학연구소의 후원으로 이루어졌음.

To investigate the protective effect of hyaluronic acid on the corneal endothelial damage induced by perfusion with hydrogen peroxide, rabbit corneas were mounted in the in vitro dual-chambered specular microscope and perfused with glutathione-bicarbonate-ringer(GBR) solution for one hour, and test agents for additional two hours. Test agents were hydrogen peroxide(0.25, 0.5mM), catalase, viscoelastics(Healon, Viscoat), hyaluronic acid(0.01%), and chondroitin sulfate(0.04%). Corneal thickness was measured every 15 minutes during the perfusion and a corneal swelling rate was calculated by linear regression analysis. At the end of perfusion, corneas were fixed for transmission electron microscopy(TEM). Hydrogen peroxide(0.5mM) caused marked corneal swelling while 0.25mM did not( $65.95 \pm 8.03$  vs.  $6.69 \pm 2.58 \mu\text{m}/\text{hr}$ ). Healon prevented the  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced corneal swelling( $15.85 \pm 2.99 \mu\text{m}/\text{hr}$ ) and maintained the endothelial ultrastructures. Viscoat enabled the corneas to deswell( $-35.90 \pm 18.04 \mu\text{m}/\text{hr}$ ). Hyaluronic acid(0.01%) and catalase(15000U) also prevented corneal swelling induced by hydrogen peroxide( $9.52 \pm 3.61$ ,  $4.61 \pm 0.99 \mu\text{m}/\text{hr}$  respectively), and maintained the endothelial ultrastructure, however 0.04% chondroitin sulfate showed marked corneal swelling( $71.73 \pm 2.12 \mu\text{m}/\text{hr}$ ). The results of this study showed that Healon and Viscoat containing hyaluronic acid could protect corneal endothelial cells from hydrogen peroxide(J Korean Ophthalmol Soc 39:2514~2526, 1998).

**Key Words :** Catalase, Corneal endothelium, Hyaluronic acid, Hydrogen peroxide, Viscoelastics

지난 수십 년간 free radicals, peroxides, auto-oxidation 등이 안질환이나 노화현상에 어떤 역할을 하리라는 것에 대해 많은 논문이 보고되어왔다<sup>1~7)</sup>. 특히 free radical 기전은 백내장, 안내염증, 약물에 의한 망막증, retrorenal fibroplasia, photic retinopathy, ocular siderosis 등에 관여한다고 생각되어왔다<sup>1~6)</sup>. 비록 관여하는 free radical의 종류는 다를지 몰라도 세포의 파괴나 죽음은 지질 또는 단백질산화에 공통된 경로를 거치게 된다<sup>7)</sup>.

Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )는 전방수내에 정상적으로 극히 낮은 농도로 존재하는 non free radical의 일종으로써 그 자체로도 각막내피세포의 Na/K ATPase를 차단하거나 permeability를 증가시켜 각막부종을 일으키고 내피세포질 및 소기관 등의 파괴를 유발한다<sup>8,9)</sup>. 또한 Fenton, Harber-Weiss반응을 통해 hydroxyl free radical이 생성되어 강력한 산화작용을 일으키며 catalase나 peroxidase에 의해 그 농도가 조절된

다<sup>10~13)</sup>. 정상 사람의 전방수내의 농도는  $1.4 \sim 3.1 \times 10^{-5}\text{M}$ (약  $24\mu\text{M}$ )로 사람의 혈장내의 농도보다는 높다<sup>14)</sup>. 또한 백내장 환자의 전방 및 amino-triazole로 처리한 실험적 백내장의 전방수내의 농도는 정상보다 높은 농도를 나타내었다고 보고하고 있다<sup>15)</sup>. Hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )의 생성은 정상적인 세포대사과정<sup>16,17)</sup>에서나 ascorbic acid의 산화<sup>18,19)</sup>, 안내염증<sup>20,21)</sup>, 그리고 초음파유화흡입술같은 안내수술 등으로 생성되고<sup>22~24)</sup> 최근에는 엑시머레이저 수술 후에도 생성된다는 보고<sup>25)</sup>도 있다.

사람의 각막내피세포는 출생시 약 3500-4000 개/ $\text{mm}^2$ 를 가지고 태어나나 수술이나 외상 또는 안질환등에 의해 손상을 받으면 손상주위의 세포가 sliding or migration에 의해 치유가 일어나고 세포분열은 거의 일어나지 않는다. 만약 세포손상의 범위가 크면 내피세포기능의 저하로 각막부종이 일어나 시력저하의 원인이 된다. 따라서 각막내피세포의 손상을 될 수 있는대로 감소시켜야 할

필요가 있다. 이러한 각막내피세포의 손상은 백내장, 녹내장, 초자체절제술 등 안내수술이나 또는 수술시 사용하는 관류액<sup>26)</sup>, 안내염증, 외상 등에 의하여 직접적으로도 일어나지만 이차적으로 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서도 일어난다. 특히 백내장수술은 안과영역에서 가장 흔히 시행되는 수술로써 초음파의 power가 클수록, 작동시간이 길수록 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성이 많아지고 각막내피세포손상은 커지게 된다<sup>27)</sup>. 이러한 각막내피세포 손상을 줄이기 위한 여러 가지 노력이 있었는 바 Holst 등<sup>24)</sup>에 의하면 백내장초음파유화술동안 free radical이 생성되어 발생한 각막내피세포손상은 Healon과 superoxide dismutase에 의해 감소된다고 보고하였다. Hull 등<sup>28)</sup>은 superoxide anion을 발생시킨 후 각막내피세포에 노출했을 때 발생한 각막내피세포손상에 대해 superoxide dismutase는 손상방지효과가 없었고 catalase는 효과가 있었다고 보고하였다. 이는 superoxide anion을 발생시키더라도 dismutation에 의해 hydrogen peroxide가 생성되어 이에 의한 각막내피세포손상이 상당한 부분을 차지한다는 것을 보여주는 것이다.

본 실험의 목적은 과산화수소에 의한 각막내피세포손상을 유발하고 안과수술영역에서 흔히 사용하는 점탄물질인 Healon과 Viscoat가 이러한 손상을 억제하는 효과가 있는지, 효과가 있다면 그 효과가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 각막내피세포에 접촉하는 것을 기계적으로 차단하는 것에 의한 것인지 아니면 그 구성성분인 hyaluronic acid 또는 chondroitin sulfate의 효과인지를 알아보고 향후 안내수술시 사용하는 관류액의 개발 및 산소유리기에 의해 발생할 수 있는 각막내피세포손상방지를 위한 약제 개발에 도움이 되고자 이 실험을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. In vitro specular microscope perfusion 실험

2-3kg의 백색토끼 45마리 90안을 대상으로 하여 한 눈은 실험군으로, 반대편 눈은 대조군으로 하였다. 과량의 pentothal sodium을 정맥주사하여 토

끼를 회생시킨 후 양안을 적출하고 약 2-3mm의 공막연이 있게 각막을 잘라낸 후 Dikstein과 Maurice<sup>29)</sup>가 고안한 dual-chamber specular microscope을 변형시킨 관류장치에 공막연을 포함한 각막을 고정하여 인공전방을 형성하였다. 각막상피세포가 건조됨을 방지하고 또한 현미경의 대물렌즈가 접촉될 때 깨끗한 상을 얻기 위해 각막상피세포표면위를 실리콘유(Dow corning 200 Fluid, 한국다우코닝주식회사, 한국)로 도포하였다. 실험군, 대조군 모두 glutathione-bicarbonate-ringer(이하 GBR이라 칭함) 용액으로 약 1시간 동안 각막내피세포를 관류하였다. GBR용액은 NaCl 111.56mM, KCl 4.82mM, NaHCO<sub>3</sub> 29.20 mM, glucose 5.01mM(이상 동양화학공업주식회사, 한국), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.04mM(Junsei Chemical Co., Ltd, Japan), MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.78mM(덕산제약주식회사, 한국), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.86mM(Hayashi Pure Chemical Ind. Ltd, Japan), glutathione 0.30mM(Sigma Chemical Co., USA)를 용해하여 pH 7.4로 조정하고 삼투압은 약 285mOsm이 되게 하여 사용하였다. 이때 관류액의 온도는 37°C로 유지하고 관류속도는 Harvard pump로 0.1ml/min으로 일정하게 관류하고 인공전방내의 압력은 약 15-20mmHg가 되도록 하였다. 관류를 하는 동안 매 15분마다 각막두께를 측정하여 각막두께가 안정이 되면 실험약제를 GBR과 혼합하여 원하는 농도로 만들어서 또는 관류장치를 해체하고 각막내피세포위에 직접 투여한 뒤 다시 관류장치를 고정하고 난 다음 약 2시간 가량 관류하였다. 관류동안 역시 매 15분마다 각막두께를 측정하였다.

## 2. 실험약제

### 1) 과산화수소용액에 의한 각막내피세포손상

과산화수소용액은 30% 용액(삼전순약동업주식회사, 한국)을 사용하여 실험 때마다 일정한 농도가 유지되게 Eppendorf 퓨브에 소량씩 분주하여 사용하였다. In vitro specular microscope 관류장치에 각막을 고정하고 GBR용액으로 각막내피세포를 약 1시간 관류하여 안정된 각막두께를 유지한 후 한쪽 눈에는 과산화수소용액(0.25

mM, 또는 0.5mM)을, 반대편에는 GBR용액으로 다시 관류하고 역시 관류동안 각막두께를 매 15분간격으로 측정하였다.

### 2) 점탄물질의 투여 및 catalase의 투여

약 1시간 동안 GBR용액으로 관류한 후 한쪽에는 각막부종을 일으켰던 가장 낮은 농도인 0.5 mM의 과산화수소용액으로 바꾸어 관류하고 반대 쪽에는 관류장치를 해체하고 각막내피세포가 위로 오게 한 후 hyaluronic acid가 10mg/ml 들어 있는 Healon(Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) 또는 hyaluronic acid가 29.2mg/ml, chondroitin sulfate가 37mg/ml 들어 있는 Viscoat(Alcon Surgical Inc., Fort Worth, TX, USA)를 0.2ml를 각막내피세포 위에 도포한 뒤 다시 관류장치를 조립하고 난 후 같은 농도의 hydrogen peroxide로 관류하면서 각막두께를 15분 간격으로 측정하였다. 또는 catalase (Sigma Chemical Co., USA) 15,000U를 0.5mM의 과산화수소용액과 혼합한 뒤 관류하였다.

### 3) Hyaluronic acid 및 chondroitin sulfate의 투여

Hyaluronic acid 자체의 효과를 보기 위해 hyaluronic acid(Sigma Chemical Co., USA)를 0.5mM의 과산화수소 용액과 혼합하여 0.01% 용액으로 만들어 관류하였다. 또한 chondroitin sulfate(Sigma Chemical Co., USA)의 효과를 보기 위하여 역시 0.5mM의 과산화수소용액과 혼합하여 0.04% 용액으로 만들어 관류하였다. 대조군은 0.5mM의 과산화수소 용액으로 관류하였다.

### 3. 투과전자현미경적 관찰

각 실험에서 관류가 끝난 다음 관류장치를 해체하고 조직에 손상이 가지 않도록 조심해서 각막을 들어내어 2.5% glutaraldehyde용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)에 넣고 1-4°C에서 2시간 전고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척하여 계열에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간,

60°C에 48시간 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1μm 두께로 박절하여 toluidine blue 염색을 하여 관찰부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40-60nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson 및 Reynolds방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

### 4. 자료처리

Linear regression analysis를 이용하여 각 실험군마다 각막의 부종률(swelling rate)을 구하고 각군의 부종률을 two-tailed t-test로 비교하였다.

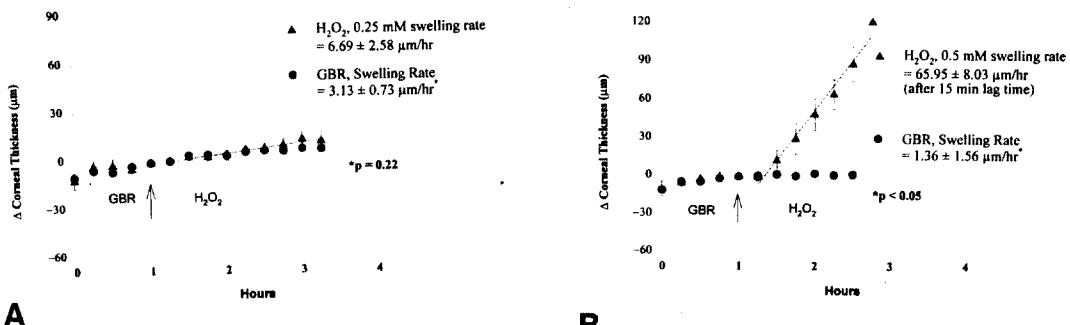
## 결 과

### 1. Hydrogen peroxide에 의한 각막부종유발

과산화수소용액 0.25mM( $6.69 \pm 2.58 \mu\text{m}/\text{hr}$ )은 GBR용액으로 관류한 대조군( $3.13 \pm 0.73 \mu\text{m}/\text{hr}$ )과 비교하여 부종이 관찰되지 않은 반면( $p > 0.1$ ) 0.5mM 용액은 심한 각막부종을 일으켰다 ( $0.5\text{mM H}_2\text{O}_2: 65.95 \pm 8.03 \mu\text{m}/\text{hr}$ , GBR:  $1.36 \pm 1.56 \mu\text{m}/\text{hr}$ ) ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1). 투과전자현미경소견상 0.25mM의 과산화수소용액은 정상 각막내피세포와 유사한 소견을 보인 반면 0.5mM 과산화수소용액은 세포막이 불규칙하고 전반적인 내형질세망의 확장 및 세포질내 공포형성을 보여 세포손상을 초래함을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

### 2. Catalase 및 점탄물질의 효과

과산화수소용액 0.5mM과 catalase 15000U를 혼합하여 관류한 결과 catalase 15,000U는  $4.61 \pm 0.99 \mu\text{m}/\text{hr}$ 의 부종률로써 과산화수소 0.5mM군의  $79.2 \pm 4.46 \mu\text{m}/\text{hr}$ 에 비해 거의 각막부종을 보이지 않았으며 전자현미경상 내피세포의 접합부도 정상적으로 유지되었고 세포소기관등이 잘 유지되었다(Fig. 3). 점탄물질인 Healon을

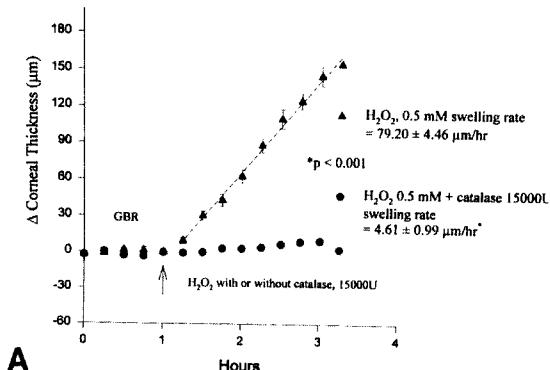


**Fig. 1.** (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with GBR and hydrogen peroxide 0.25mM. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$ SEM) swelling rates were  $3.13 \pm 0.73 \mu\text{m}/\text{hr}$  for GBR and  $6.69 \pm 2.58 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.25mM. (B) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with GBR and hydrogen peroxide 0.5mM. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$ SEM) swelling rates were  $1.36 \pm 1.56 \mu\text{m}/\text{hr}$  and  $65.95 \pm 8.03 \mu\text{m}/\text{hr}$  for GBR and hydrogen peroxide 0.5mM, respectively.

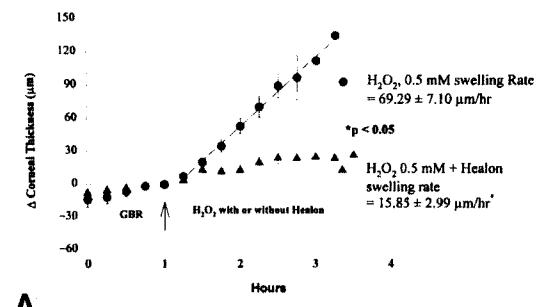
**Fig. 2.** Transmission electron micrograph of a normal rabbit corneal endothelium perfused with (A) GBR( $\times 4,000$ ), (B) hydrogen peroxide 0.25mM demonstrating a normal-appearing monolayer with intact junctional morphology( $\times 6,000$ ), and (C) hydrogen peroxide 0.5mM. The outer plasma membrane is irregular due to extensive dilatation of the endoplasmic reticulum and cytoplasmic vacuolization( $\times 6,000$ ).

각막내피세포에 도포하고 과산화수소용액 0.5 mM로 관류한 경우 각막부종률은  $15.85 \pm 2.99 \mu\text{m}/\text{hr}$ 로 과산화수소용액 0.5mM군의  $69.29 \pm$

$7.10 \mu\text{m}/\text{hr}$ 에 비해 통계학적으로 의의있는 각막부종의 억제를 보였고( $p < 0.05$ ) 전자현미경상 세포내에 작은 공포가 관찰되는 것 이외에는 정상세포



**Fig. 3.** (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and catalase 15000U. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$  SEM) swelling rates were  $79.20 \pm 4.46 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.5mM, and  $4.61 \pm 0.99 \mu\text{m}/\text{hr}^*$  for catalase 15000U and hydrogen peroxide 0.5mM in GBR. (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and catalase 15000U. Intercellular junction is intact and cellular organelles are well preserved( $\times 12,000$ ).

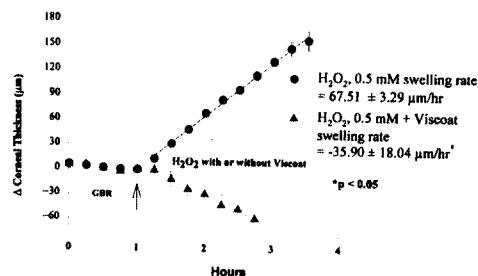


**Fig. 4.** (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and Healon. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$  SEM) swelling rates were  $69.29 \pm 7.10 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.5mM, and  $15.85 \pm 2.99 \mu\text{m}/\text{hr}^*$  for Healon. (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and Healon. Normal endothelial ultrastructure is maintained( $\times 12,000$ ).

소견을 유지하였다(Fig. 4). Viscoat를 투여한 경우의 부종률은  $-35.90 \pm 18.04 \mu\text{m}/\text{hr}$ 로써 오히려 각막두께가 감소하였다. 이는 Viscoat의 삼투압이 325-360mOsm로 높기 때문으로 생각되어지며 이때 과산화수소용액 0.5mM군은  $67.51 \pm 3.29 \mu\text{m}/\text{hr}$ 의 부종률을 보였다( $p < 0.01$ ). 역시 세포질내의 몇 개의 작은 공포와 내형질세망의 확장 이외에 내피세포의 세포막, 세포소기관 등이 정상적으로 잘 유지되었다(Fig. 5).

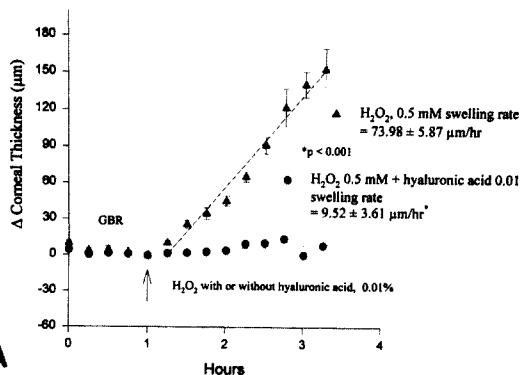
### 3. Hyaluronic acid 및 chondroitin sulfate의 효과

과산화수소 0.5mM 용액에 hyaluronic acid를 0.01%가 되게 혼합한 용액은  $9.52 \pm 3.61 \mu\text{m}/\text{hr}$ 의 부종률을 보여 과산화수소 0.5mM 용액에 의한 각막부종( $73.98 \pm 5.87 \mu\text{m}/\text{hr}$ )을 억제하였고 ( $p < 0.01$ ) 내피세포의 전자현미경소견도 정상으로



A

Fig. 5. (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and Viscoat. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$ SEM) swelling rates were  $67.51 \pm 3.29 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.5mM, and  $-35.90 \pm 18.04 \mu\text{m}/\text{hr}$  for Viscoat. (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and Viscoat shows normal endothelial ultrastructure except mild dilatation of the endoplasmic reticulum and a few small vacuoles in the cytoplasm ( $\times 6,000$ ).

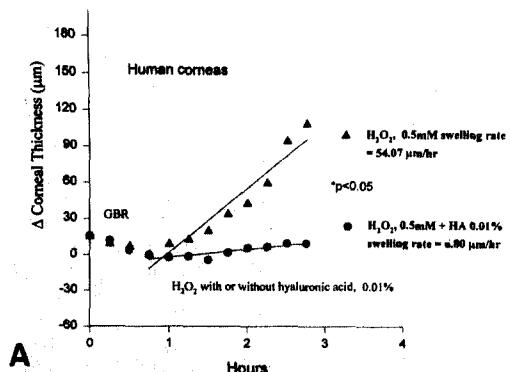


A

Fig. 6. (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and hyaluronic acid 0.01%. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$ SEM) swelling rates were  $73.98 \pm 5.87 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.5mM, and  $9.52 \pm 3.61 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hyaluronic acid 0.01% and hydrogen peroxide 0.5mM in GBR. (B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and hyaluronic acid 0.01% shows well preserved endothelial ultrastructure ( $\times 10,000$ ).

잘 유지되었다(Fig. 6). 각막이식술에 적합치 못한 사람의 각막을 이용해 역시 hyaluronic acid 0.01% 용액을 관류하여 본 결과 과산화수소에 의해서는  $54.07 \mu\text{m}/\text{hr}$ 의 부종률을 보였고 세포질 및 미토콘드리아의 부종등이 유발되었으며, hyaluronic acid 0.01% 용액의 경우  $6.80 \mu\text{m}/\text{hr}$ 의 부종율로 GBR과 차이가 없었으며 전자현미경상 세포막이 불규칙하고 많은 세포질의 공포 등 심한 각막내피세포의 부종을 보였다(Fig. 8).

이외에는 세포간 접합부나 세포소기관등은 정상의 소견을 보였다(Fig. 7). 반면에 과산화수소 0.5mM 용액에 chondroitin sulfate를 0.04% 가 되게 혼합한 용액은  $71.73 \pm 2.12 \mu\text{m}/\text{hr}$ 로써 과산화수소 0.5mM 용액에 의한 각막부종률( $80.41 \pm 2.49 \mu\text{m}/\text{hr}$ )과 차이가 없었으며( $p>0.1$ ) 전자현미경상 세포막이 불규칙하고 많은 세포질의 공포 등 심한 각막내피세포의 부종을 보였다(Fig. 8).



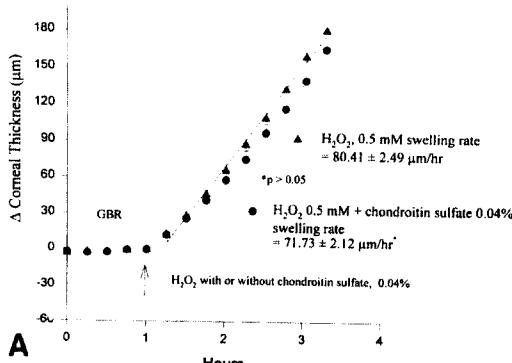
**Fig. 7.** (A) Changes in corneal thickness of human corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and hyaluronic acid 0.01%. Shown are the statistically fit regression lines for the one perfusion. Transmission electron micrograph of (B) a human corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM shows edematous cytoplasm, marked swelling of the mitochondria with loss of cristae, and disruption of plasma membrane( $\times 8,000$ ), (C) a human corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and hyaluronic acid 0.01%. Mild swelling is noted in the base of the cells but intercellular junction and cellular organelles are maintained( $\times 8,000$ ).

## 고 찰

Fenton and Haber-Weiss 반응을 통해 생성되는 Hydroxyl free radical의 가장 중요한 원천중의 하나인  $H_2O_2$ 는 전방수내에 정상적으로 존재한다. 사람의 혈장에는  $H_2O_2$ 가 54μM 또는 0.254μM 이하로 보고자에 따라 다르나 아주 극소량 있으며<sup>30,31</sup> 전방에서는 1965년 Pirie에 의해 소와 토끼의 전방수에서 처음 검출되었다. 정상 사람의 전방수에는 25-30μM 정도로 존재하고 노인성백내장 환자의 전방에서는 82μM로 증가되어 있고 사람을 제외한 영장류에서는 27μM<sup>34</sup>, 토끼에서는 33-43μM<sup>32</sup>로 존재한다고 보고되어 있다.

이 peroxide는 여러 경로에 의해 생성된다. 정

상적인 세포대사과정중에서 생성될 수 있는데<sup>16</sup> 이는 세포에 손상을 주어 노화나 조직의 변성, 또는 백내장형성 등을 일으킬 수도 있다<sup>11,15,33-35</sup>. 안내염증이 있을시에는 arachidonic acid cascade의 활성화에 의해서<sup>21</sup> 그리고 활성화된 텁식세포에서 superoxide anion, 과산화수소, hydroxyl radical, singlet oxygen, hypohalite ions과 그의 다른 산화물등이 만들어져 조직성분을 산화시키고 비가역적인 손상을 일으킨다<sup>36,37</sup>. 안내염증이 각막내피세포의 기능을 변화시키고 내피세포수의 감소를 일으킬 수도 있다는 것은 잘 알려져 있다<sup>38-40</sup>. 또 백내장초음파유화술같은 안내수술시에도 발생할 수 있다<sup>23</sup>. 초음파를 액체내에서 작동하게 되면 물이 sonolysis되어 hydroxyl radicals(OH)과 수소원자(H)가 생성되고 이차



**Fig. 8.** (A) Changes in corneal thickness of rabbit corneas perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and chondroitin sulfate 0.04%. Shown are the statistically fit regression lines for the five perfusions. Mean( $\pm$ SEM) swelling rates were  $80.41 \pm 2.49 \mu\text{m}/\text{hr}$  for hydrogen peroxide 0.5mM, and  $71.73 \pm 2.12 \mu\text{m}/\text{hr}$  for chondroitin sulfate 0.04% and hydrogen peroxide 0.5mM in GBR.  
(B) Transmission electron micrograph of a rabbit corneal endothelium perfused with hydrogen peroxide 0.5mM and chondroitin sulfate 0.04% shows irregular plasma membrane and numerous variable-sized cytoplasmic vacuoles ( $\times 6,000$ ).

적으로 산소분자와 반응하여 superoxide radical과 과산화수소를 생성한다<sup>41-43</sup>. 이때 생성되는 유리기의 양은 초음파의 세기와 주파수, 그리고 매질에 함유된 공기량과 비례한다<sup>24,44</sup>. 또 다른 원천은 ascorbic acid의 산화에 의한다. Ascorbic acid는 정상적으로 사람의 전방내에 약 1.0 mM 정도 존재하며<sup>45</sup> 이는 혈장에서의 농도보다 훨씬 높다. Ascorbic acid의 산화는 빛과 riboflavin에 의해 훨씬 가속화된다<sup>32</sup>. 1996년 Costagliola 등<sup>25</sup>은 엑시머 레이저 조사후에 전방내의 과산화수소의 증가와 ascorbic acid의 감소와 환원형 glutathione(GSH)의 감소, 산화형 glutathione(GSSG)의 증가가 일어났고 20분 후에는 정상으로 회복되었다고 보고하여 엑시머 레이저 조사 후에 각막내피세포나 수정체에 영향을 주리라는 것을 시사하였다.

과산화수소의 농도가 0.3-0.5mM 사이면 각막내피세포에 빠른 독성을 나타내어 각막부종을 일으키고 세포질이나 세포소기관의 파괴등이 오게 된다<sup>46,47</sup>. 수정체의 Na/K ATPase의 억제 및 투과성의 증가가 초래되는 것으로 봐서 각막내피세포에도 같은 기전으로 각막부종이 온다고 생각할 수 있다<sup>9</sup>.

1988년 Nguyen 등<sup>48</sup>에 의하면 전방수내의 정

상적인 농도의 과산화수소는 전방유출경로를 통해 완전히 제거된다고 하였다. 또한 정상적인 세포의 기능을 통해서도 해독이 된다. 즉, 각막내피세포를 포함해서 눈조직에는 catalase, peroxidase등이 존재하기 때문에 이들 효소에 의해 과산화수소는 물로 변환되어 제거된다<sup>11,34</sup>. 또한 glutathione 대사와 Hexose Monophosphate shunt를 통해서도 해독된다<sup>49</sup>. 1978년 Edelhauser 등<sup>50</sup>은 관류액에 glutathione, glucose 등을 첨가하여 각막내피세포의 유지에 좋은 효과를 나타낸다고 보고하였다. 그러나 각막내피세포가 과산화수소나 다른 산화물질에 지나치게 또는 오래동안 노출시는 해독능력 이상일 수도 있다. 게다가 나이가 들면서 점점 산화를 방지하는 능력이 감소되고 glutathione도 나이에 따라 감소하게 된다<sup>51</sup>. Ascorbic acid는 산화되어 과산화수소를 생성하기도 하지만 항산화제로써도 잘 알려져 있다<sup>52-54</sup>. 이것은 ascorbic acid가 전방내에 높은 농도로 존재하는 것에 비해 전방내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도는 낮아서 각막내피세포에 독성을 나타내지 않기 때문에 ascorbic acid의 역할이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성뿐 아니라 제거제로도 작용할 것이라고 생각된다. 이렇게 정상적인 과정으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 제거가 되지만 비정상적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 많이 생성되는 경우

특히 초음파를 사용하여 안내수술을 할 경우에는  $H_2O_2$ 의 독성을 억제할 필요가 생긴다. 오늘날 일 반적으로 안과영역수술시 각막내피세포를 보호하기 위해서 또 전방을 일정하게 형성하고 유지하기 위해 점탄물질을 광범위하게 사용하고 있는데 점 탄물질의 가장 큰 장점 중 하나는 각막내피세포에 대해 기계적으로 보호작용을 하는 것이다<sup>55-58)</sup>. 이 러한 점탄물질이  $H_2O_2$ 에 의한 산화독성으로부터 각막내피세포를 보호한다는 보고가 있다<sup>59)</sup>. 이 보 고에 의하면 저농도의  $H_2O_2$ 에서는 Healon이나 hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)의 점성이 각막내피세포를 보호하고, 고농도의  $H_2O_2$  에서는 Healon의 화학적인 구조가 HPMC보다 분자구조를 더 잘 유지하면서 HPMC보다 산소유 리기로부터 더 잘 보호해 준다. 이 두 점탄물질은 산소유리기의 작용을 위해 단백질기질 또는 탄수 화물기질을 제공하여 전방수를 이런 산소유리기 로부터 보호하고 또한 이들이 각막내피세포를 감싸 덮기 때문에 산소분자의 작용을 방해한다고 생각된다. 그러나 이 보고는 전방내에 점탄물질을 먼저 주입한 후  $H_2O_2$ 를 나중에 주입하고 1분 뒤에 점탄물질을 다시 씻어내는 방법을 사용하고 있 어 지속적인 효과를 보기에는 부적절한 면이 있다. 본 실험에서는 실제 임상에서와 비슷하게 점 탄물질을 각막내피세포면에 도포한 후 약 2시간 동안 지속적으로  $H_2O_2$ 를 관류하면서 그 효과를 관찰하였다. 그 결과 Healon이나 Viscoat 모두 에서 각막부종을 억제함이 관찰되었고 Viscoat의 경우는 오히려 각막두께의 감소를 보였다. 이는 Viscoat의 고삼투압 때문인 것으로 생각된다. 그러나 이러한 점탄물질의 보호작용이 기계적 내지 물리적인지, 아니면 화학적인 장벽효과에 의한 것 인지는 정확히 밝혀져 있지 않다. Sodium hyaluronate(NaHA)는 세포막에서 N-acetyl D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 연속 적으로 연결되어 긴 분자를 형성하여 합성되며<sup>60)</sup> 결체조직에 광범위하게 분포되어 있다<sup>61)</sup>. 거의 인 체 모든 세포와 관계가 있으며 제대(4100mg/l), 사람의 초자체(1200mg/l), 사람의 전방(1.4mg/l)에 높은 농도로 존재한다<sup>62,63)</sup>. Hyaluronic acid는 세포보호, 세포이동의 조절, 세포성장조절, 세

포분화, 조직의 형태발생 등의 기능이 있고 또한 세포외기질의 중요한 성분이기도 하다<sup>64)</sup>. Harf-strand 등<sup>65)</sup>에 의하면 HABR(highly specific HA recognizing protein)을 사용하여, 사람의 각막내피세포에는 hyaluronic acid에 의해 덮혀 있는 특별한 층이 존재하며 각막내피세포가 hyaluronic acid 결합장소를 가지고 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 두 점탄물질의 구성성분인 hyaluronic acid와 chondroitin sulfate를 각각 관류한 결과 hyaluronic acid만이 각막부 종억제효과가 있었다. 아마도 hyaluronic acid 가 hyaluronic acid 결합장소와 결합하여 손상이 억제되었다고 볼 수도 있다. 그러나 이 효과는 본 연구만으로는  $H_2O_2$ 가 내피세포로 확산되는것을 방지하기 때문인지 또는 산소유리기를 직접 제거하기 때문인지는 잘 모르기 때문에 이를 위해서는 좀더 연구가 필요하다 하겠다. 또 다른 보고에 의하면 superoxide같은 여러 산소유리기가 hyaluronic acid를 해중합(depolymerization)시켜 그 점성을 감소시킨다고 하여 염증성관절염시 관절액의 점성이 감소되는 이유로 설명하고 있고<sup>66)</sup> 또 방사선이나 산화제가 hyaluronic acid를 해중합시킨다고 하며<sup>67)</sup> 이것을 달리 생각해 보면 산소유리기가 hyalruonic acid에 의해 제거된다 고도 볼 수 있어 직접적인 제거효과가 있을 가능성을 보여준다. Catalase는  $H_2O_2$ 를  $H_2O$ 로의 이 가환원반응을 촉매하기 때문에  $H_2O_2$ 에 의한 각막 부종이 거의 완전히 억제되었다.

Ascorbate의 산화등으로부터 유래되는 전방내의  $H_2O_2$  농도는 수정체나 각막에 해가 되는 농도 보다 약간 낮은 농도가 되므로, 전방내 높은 농도로 존재하는 ascorbate의 주요기능은 단순히  $H_2O_2$  생성만은 아닌 것 같고 아마 다른 역할로써 산소유리기나,  $H_2O_2$ 의 해독역할을 할 것으로 생각되어 왔고 실제로 산소가 없는 상황에서는  $H_2O_2$ 를 생성하지 않을 뿐 아니라 기존의  $H_2O_2$ 와 반응하여 오히려  $H_2O_2$ 를 제거할 수 있다는 보고도 있기 때문에<sup>68)</sup> 전방내에는 이러한 ascorbate 와  $H_2O_2$  그리고  $O_2$  사이에 역동적인 평형상태가 이루어지고 있다고 생각되며 결과적으로 여러 산화물질이나 항산화물질의 각막내피세포 또는 수

정체상피세포의 기능에 대한 효과를 연구할 때는  
ascorbate나  $H_2O_2$ 의 관계를 고려해야 할 것으로  
생각된다.

## REFERENCES

- 1) Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S : *Retinal damage by light in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci* 1966;5(5):450-473.
- 2) Pirie A, Rees JR, Holmberg NJ : *Diquat cataract: formation of free radical and its reaction with constituents of the eye. Exp Eye Res* 1970;9(2):204-218.
- 3) Borkman RF, Lerman S : *Evidence for a free radical mechanism in aging and UV-irradiated ocular lenses. Exp Eye Res* 1977;25(3):303-309.
- 4) Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors KE : *Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol Scand* 1980;492(Suppl):43.
- 5) Hittner HM, Godio LB, Rudolph AJ, Adams JM, Garcia-Prats JA, Friedman Z, Kautz JA, Monaco WA : *Retrolental fibroplasia: Efficacy of vitamin E in a double-blind clinical study of preterm infants. N Eng J Med* 1981;305(23):1365-1371.
- 6) Sery TW, Petrillo R : *Superoxide anion radical as an indirect mediator in ocular inflammatory disease. Curr Eye Res* 1984;3(1):243-252.
- 7) Kellogg EW III, Fridovich I : *Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem* 1975;250(22):8812-8817.
- 8) Riley MV, Giblin FJ : *Toxic effects of hydrogen peroxide on corneal endothelium. Curr Eye Res* 1982/1983;2(7):451-458.
- 9) Delamere NA, Paterson CA, Cotton TR : *Lens cation transport and permeability changes following exposure to hydrogen peroxide. Exp Eye Res* 1983;37(1):45-53.
- 10) Pirie A : *Glutathione peroxidase in lens as a source of hydrogen peroxide in aqueous humor. Biochem J* 1965;96(3):244-253.
- 11) Bhuyan KC, Bhuyan DK : *Regulation of hydrogen peroxide in eye humors. Effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye. Biochem Biophys Acta* 1977; 497(3):641-651.
- 12) Chance B, Sies H, Boveris A : *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev* 1979;59(3):527-605.
- 13) Ramasarma T : *Generation of  $H_2O_2$  in biomembranes. Biochem Biophys Acta* 1982;694(1):69-93.
- 14) Spector A, Garner WH : *Hydrogen peroxide and human cataract. Exp Eye Res* 1981;33(6):673-681.
- 15) Bhuyan KC, Bhuyan DK : *Mechanism of cataractogenesis induced by 3-amino-1H-1,2,4-triazole I: Morphology and histopathology of cataract and the role of catalase in the regulation of  $H_2O_2$  in the eye. In Caughey WS(ed): Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen*, New York, Academic Press, 1978b, pp 785-796.
- 16) Aust SD, Roerig DL, Pederson TC : *Evidence for superoxide generation by NADPH-Cytochrome C reductase of rat liver microsomes. Biochem Biophys Res Comm* 1972; 47(5):1133-1137.
- 17) Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L : *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. FEBS Lett* 1974; 42(1):68-72.
- 18) Steinman HG, Dawson CR : *On the mechanism of the ascorbic acid-ascorbic acid oxidase reaction. The hydrogen peroxide question. J Amer Chem Soc* 1942;64:1212-1219.
- 19) Hanzlik RP : *Inorganic aspects of biological and organic chemistry*. New York, Academic Press, 1976, pp 172.
- 20) Goldstein IM, Roos D, Kaplan HB, Weissman G : *Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J Clin Invest* 1975;56(5):1155-1163.
- 21) Kuehl FA Jr, Humes JL, Ham EA, Egan RW, Dougherty HW : *Inflammation; the role of peroxidase-derived products. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* 1980;6:77-86.
- 22) Riesz P, Kondo T : *Free radical formation induced by ultrasound and its biological*

- implications. *Free Rad Biol Med* 1992;13(3) : 247-270.
- 23) Shimmura S, Tsubota K, Oguchi Y, Fukumura D, Suematsu M, Tsuchiya M : Oxiradical-dependent photoemission induced by a phacoemulsification probe. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(10):2904-2907.
- 24) Holst A, Rolfsen W, Svensson B, Ollinger K, Lundgren B : Formation of free radicals during phacoemulsification. *Curr Eye Res* 1993; 12(4):359-365.
- 25) Costagliola C, Balestrieri P, Fioretti F, Frunzio S, Rinaldi M, Scibelli G : ArF 193nm nm excimer laser corneal surgery and photo-oxidative stress in aqueous humor and lens of rabbit: one-month follow-up. *Curr Eye Res* 1996;15(4):355-361.
- 26) McCarey BE, Edelhauser HF, Van Horn DL : Functional and structural changes in the corneal endothelium during in vitro perfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973;12(6) : 410-417.
- 27) Beesley RD, Olson RJ, and Brady SE : The effects of prolonged phacoemulsification time on the corneal endothelium. *Ann Ophthalmol* 1986;18(6):216-219.
- 28) Hull DS, Green K, Thomas L, Alderman N : Hydrogen peroxide-mediated corneal endothelial damage: Induction by oxygen free radical. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(11):1246-1253.
- 29) Dikstein S, Maurice DM : The metabolic bases to the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 1972;221(1):29-41.
- 30) Yamamoto Y, Ames BN : Detection of lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide at picomole levels by an HPLC and isoluminol chemiluminescence assay. *Free Radical Biol Med* 1987;3(5):359-361.
- 31) Frei B, Yamamoto Y, Niclas D, Ames BN : Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydroperoxides in human blood plasma. *Anal Biochem* 1988;175(1):120-130.
- 32) Giblin FJ, McReady J, Kodama T, Reddy VN : A direct correlation between the levels of ascorbic acid and  $H_2O_2$  in aqueous humor. *Exp Eye Res* 1984;38(1):87-93.
- 33) Pryor WA : The formation of free radicals and the consequences of their reactions in-vivo. *Photochem and Photobiol* 1978;28(4-5) : 787-801.
- 34) Bhuyan KC, Bhuyan DK : Superoxide dismutase of the eye. Relative functions of superoxide dismutase and catalase in protecting the ocular lens from oxidative damage. *Biochem Biophys Acta* 1978;542(1):28-38.
- 35) Bhuyan KC, Bhuyan DK, Podos SM : Evidence of increased lipid peroxidation in cataracts. *IRCS Med Sci* 1981;9:126-127.
- 36) Salin ML and McCord JM : Free radicals and inflammation: Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1975;56(5):1319-1323.
- 37) Rossi F, Bellavite P, Berton G, Grzeskowiak M, Papini E : Mechanisms of production of toxic oxygen radicals by granulocytes and macrophages and their function in the inflammatory process. *Pathol Res Pract* 1985; 180(2):136-142.
- 38) Setala K : Corneal endothelial cell density in iridocyclitis. *Acta Ophthalmol* 1979;57(2):277-286.
- 39) Inomata H, Smelser GK, Polack FM : The fine structural changes in the corneal endothelium during graft rejection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1970;9(4):263-271.
- 40) Inomata H, Smelser GK : Fine structural alterations of corneal endothelium during experimental uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1970;9(4):272-285.
- 41) Makino K, Mossoba MM, Riesz P : Chemical effects of ultrasound on aqueous solutions: Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *J Phys Chem* 1983;87(12):1369-1377.
- 42) Henglein A, Kormann C : Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *Int J Radiat Biol* 1985;48(2):251-258.
- 43) Suslick KS : The chemical effects of ultrasound. *Sci Amer* 1989;260:62-69.
- 44) Armour EP, Corry PM : Cytotoxic effects of ultrasound in vitro dependence on gas content, frequency, radical scavengers and attachment. *Radiat Res* 1982;89(2):369-380.
- 45) Riley MV : Chemistry of the aqueous humor, in "Biochemistry of the Eye" Ed. Anderson RE, American Academy of Ophthalmology, San Francisco, 1983 pp. 70-95.

- 46) Hull DS, Csukas S, Green K, Livingston V : *Hydrogen peroxide and corneal endothelium.* Acta Ophthalmol 1981;59(3):409-421.
- 47) Csukas SC, Green K : *Effects of intracameral hydrogen peroxide in the rabbit anterior chamber.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29(2):335-339.
- 48) Nguyen KP, Chung ML, Anderson PJ, Johnson M, Epstein DL : *Hydrogen peroxide removal by the calf aqueous outflow pathway.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1988;29(6): 976-981.
- 49) Giblin FJ, McReady J, Reddy VN : *The role of glutathione metabolism in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rabbit lens.* Invest Ophthalmol Vis Sci 1982; 22(3):330-335.
- 50) Edelhauser HF, Gonnering R, Van Horn DL : *Intraocular irrigating solutions. A comparative study of BSS plus and lactated Ringer's solution.* Arch Ophthalmol 1978;96(3):516-520.
- 51) Reddy VN : *Metabolism of glutathione in the lens.* Exp Eye Res 1971;11(3):310-328.
- 52) Halliwell B, Wasil M, Grootveld M : *Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid: Implication for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint.* FEBS Lett 1987;213(1):15-17.
- 53) Sies H, Stahl W, Sundquist AR : *Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids.* Ann NY Acad Sci 1992;669:7-20.
- 54) Buettner GR : *The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate.* Arch Biochem Biophys 1993;300(2):535-543.
- 55) Balazs EA : *Sodium hyaluronate and visco-surgery.* In: Miller D, Stegmann R, eds. Healon, a guide to its use in ophthalmic surgery. New York, Wiley Medical Publishers, 1983, pp 5-28.
- 56) Arshinoff SA : *Comparative physical properties of ophthalmic viscoelastic materials.* Curr Can Ophthalm Pract 1989;107:1511-1515.
- 57) Craig MT, Olson RJ, Mamalis N : *Air bubble endothelial damage during phacoemulsification in human eye bank eyes: The protective effects of Healon and Viscoat.* J Cataract Refract Surg 1990;16(5):597-602.
- 58) Liesegang TJ : *Viscoelastic substances in ophthalmology.* Surv Ophthalmol 1990;34(4):268-293.
- 59) Artola A, Alio JL, Bellot JL, Ruiz JM : *Protective properties of viscoelastic substances(sodium hyaluronate and 2% hydroxymethylcellulose) against experimental free radical damage to the corneal endothelium.* Cornea 1993;12(2):109-114.
- 60) Prehm P : *Identification and regulation of the eukaryotic hyaluronate synthase.* Ciba Found Symp 1989;143:21-30.
- 61) Laurent TC : *Structure, function and turnover of the extracellular matrix.* Adv Microcirc 1987;13(1):15-34.
- 62) Meyer FA, Laver-Rudich Z, Tanenbaum R : *Evidence for a mechanical coupling of glycoprotein microfibrils with collagen fibrils in Wharton's jelly.* Biochem Biophys Acta 1983; 755(3):376-387.
- 63) Laurent UBC, Laurent TC : *On the origin of hyaluronate in blood.* Biochem Int 1981;2: 195-199.
- 64) Toole BP, Munaim SI, Welles S, Knudson CB : *Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development.* Ciba Found Symp 1989;143:138-149.
- 65) Harstrand A, Molander N, Stenevi U, Apple D, Schenholm M, Madsen K : *Evidence of hyaluronic acid and hyaluronic acid binding sites on human corneal endothelium.* J Cataract Refract Surg 1992;18(3):265-269.
- 66) Greenwald RA, Moy WW : *Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid.* Arth Rheumat 1980;23(4):455-463.
- 67) Matsumura G, Herp A, Pigman W : *Depolymerization of hyaluronic acid by autoxidants and radiations.* Radiation Res 1966;28(4): 735-752.
- 68) Riley MV, Schwartz CA, Peters MI : *Interactions of ascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: implications for in vitro studies of lens and cornea.* Curr Eye Res 1986;5(3):207-216.