대한안과학회지 : 제 40 권 제 11 호 1999
J Korean Ophthalmol Soc Vol. 40, No. 11

아스코르빈산이 사람과 가토의 테논낭 섬유아세포 증식에 미치는 영향

이선영 · 안재홍 · 유호민

= 요 약 =

아스코르빈산은 상처조직형성에 중요한 역할을 하는 procollagen의 hydroxylation에 작용하는 조효소로 알려져 있으나 고농도에서는 결막하 섬유아세포에 독성을 나타낸다고 보고되어 있다. 이에 본 저자는 아스코르빈산이 사람과 가토의 테논낭 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고자 시간과 용량에 따른 효과를 비교하였다.

사람과 가토의 테논낭 섬유아세포를 각각 배양하였고 아스코르빈산을 0.75mM, 1.00mM, 1.25mM, 1.50mM, 2.00mM로 각각 농도를 달리하여 24시간 노출시킨 후 1일, 2일, 5일째에 hemacytometer를 이용하여 섬유아세포 수를 측정하여 억제정도를 평가하였다.

아스코르빈산이 테논낭 섬유아세포의 증식을 억제하는 농도는(ID_{50}) 사람에서는 1일째, 2일째, 5일째 각각 1.14mM, 1.53mM, 1.72mM이었고, 가토에서는 각각 1.59mM, 1.16mM, 1.54mM로 나타났고 사람에서는 1일째, 가토에서는 2일째 농도가 각각 사람과 토끼의 방수속에 함유되어 있는 아스코르빈산의 농도와 유사하였다.

본 연구에서는, 아스코르빈산이 사람에서는 1.14mM 이상에서, 가토에서는 1.16mM 이상에서 섬유아세포의 증식을 효과적으로 억제하였고, 앞으로 녹내장 여과수술에서의 사용가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다(한안지 40:3017~3024, 1999).

= **Abstract** =

The Effects of Ascorbic Acids on the Proliferation of the Human & Rabbit Tenon's Fibroblasts

Sun Young Lee, M.D., Jae Hong Ahn, M.D., Ho Min Lew, M.D.

<접수일 : 1999년 5월 19일, 심사통과일 : 1999년 9월 17일>

아주대학교 의과대학 안과학교실
Address reprint requests to Ho Min Lew, M.D.
Department of Ophthalmology, Ajou University School of Medicine
San 5 Wonchon-dong, Paldal-ku, Suwon, 442-749, Korea
Tel : 82-331-219-5260, Fax : 82-331-219-5259

* 본 논문의 요지는 1999년 82회 대한안과학회 춘계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

Although ascorbic acids have been known to play a role in the hydroxylation of procollagen in collagen synthesis, it can also inhibit the proliferation of fibroblasts at high concentrations.

The time- and dose-related effects of ascorbic acids in proliferation of human and rabbit Tenon's fibroblasts were studied. Fibroblasts were incubated in different concentrations of ascorbic acid at 0.75mM, 1.00mM, 1.25mM, 1,50mM, and 2.00mM and evaluated on days 1, 2, and 5 after exposure to ascorbic acid for 24 hours. To evaluate the effects of different concentration of ascorbic acids on fibroblast proliferation, cell density was quantified by hemacytometer.

In conclusion, ascorbic acid was a potent inhibitor of fibroblast proliferation, the effective concentrations of ascorbic acid were(average ID_{50}) 1.14, 1.53, 1.72mM in human fibroblast, and 1.59, 1.16, 1.54mM in rabbit on days 1, 2, and 5. The effective concentration of ascorbic acid in humans was similar to the normal human concentration of ascorbic acid in aqueous humor on day 1, and the concentration of ascorbic acid in rabbits was similar to the normal rabbit aqueous humor on day 2.

This study shows that ascorbic acid inhibits cell proliferation in concentration of 1.14mM or more in humans and 1.16mM or more in rabbits, future clinical studies may show that these agents reduce bleb failure following glaucoma filtration surgery(J Korean Ophthalmol Soc 40:3017~3024, 1999).

Key Words : Ascorbic acids, Glaucoma filtration surgery, Proliferation, Tenon's fibroblast

녹내장 여과 수술 후 과다한 섬유화 조직의 증식으로 인한 반흔 형성이 수술 실패의 주요한 원인으로 지적되고 있으므로[1], 수술후 자연적으로 나타나는 창상치유의 과정을 억제할 필요가 있다.

창상치유가 일어나는 주 위치는 상공막이나, 테논낭 또는 결막하이며 각공막윤부의 깊은 조직의 역할은 미미하다고 알려져 있다[2]. 창상치유에서 섬유아세포는 자극을 받아 이동하고 분열한 후 세포외간질을 합성함으로써 반흔조직의 최종적인 강도를 유지하는데 중심적인 역할을 한다[2]. 창상부위의 반흔 형성을 억제하여 녹내장 여과술의 성공률을 높이기 위한 방법들이 연구되고 있다. 수술시 결막하 조직이나 상공막에 손상을 적게 주고, 술후 염증 반응을 억제함으로써 어느 정도 성공률을 높일 수 있으나, 실패의 위험이 높은 경우에서는 반흔 형성을 억제하는 약물을 쓰지 않으면 수술의 성공률이 매우 떨어지는 것으로 알려져 있다.

반흔 형성을 감소시키는 대표적인 약제로 5-fluouracil(5-FU)[2]나 mitomycin C(MMC)[3]가 있다. 이들은 현재 녹내장 여과수술의 보조요법으로 많이 이용되고 있으나, 대부분 항대사물질로서 유리체, 전방, 망막에 대한 안전성이 확립되지 않아서 독성이 우려되는 물질이며, 실제로도 부작용[3]이 빈번히 발생하고 있는 실정이다. 따라서, 안내에 독성작용이 적으면서 섬유아세포의 증식을 효과적으로 억제시킬 수 있는 약제가 필요할 것으로 생각된다.

Herschler 등의 보고와 여러 연구에 의하면[4-6] 세포배양 모델에서 방수가 결막하 섬유아세포의 증식을 억제하고, 이러한 증식을 억제하는 작용은 방수내에 섬유아세포의 증식을 억제하는 아스코르빈산 등의 억제인자(inhibitory factor)가 함유되어 있기 때문이라고 생각할 수 있게 되었다.

사람의 방수내 아스코르빈산 농도는 1.10mM로 혈장 내 농도보다 25배 이상 높고[7,8], 가토의 방수내 농도는 1.00mM이다. 녹내장 수술 후 이

러한 농도의 아스코르빈산이 방수에 지속적으로 유입이 된다면 반흔 형성이 억제되어야 하나, 실제로 고위험군에서는 반흔 형성 억제 약물을 쓰지 않으면 수술의 성공률이 떨어지는 것을 볼 수 있다. 그러므로 정상적으로 방수에 존재하는 농도의 아스코르빈산의 반흔 형성 억제 효과가 의문시 될 수 있다.

최근 McGahan은[9] 안내 염증을 유발한 가토에서 전방내 아스코르빈산 농도가 감소한다고 보고하였고 이는 혈액-방수 장벽의 파괴로 인한 것이라 추측하였다. 따라서, 녹내장 여과수술 후 실패원인이 전방 내 아스코르빈산의 농도의 감소에 의한 것일 가능성이 있으므로, 녹내장 여과 수술 후 아스코르빈산을 투여하여 적정 농도를 유지해 준다면, 큰 부작용 없이 반흔 형성을 억제할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구에서는 가토와 사람의 테논낭 섬유아세포를 배양한 후 아스코르빈산을 농도별로 투여하여 섬유아세포의 생존과 증식정도를 측정함으로써 효과적으로 섬유아세포의 증식을 억제하는 아스코르빈산의 적정 농도를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

연구재료로 사용한 사람의 테논낭 섬유아세포는 42세 남자에서 익상편 제거수술 도중 결막상피가 섞이지 않도록 주의하면서 정상부위의 결막하 테논낭 일부를 절제하여 채취하였다. 가토에서도 역시 결막상피가 섞이지 않도록 결막하 테논낭 조직을 절제하여 얻은 섬유아세포를 배양하였다.

채취한 테논낭 조직을 4시간 이내에 HBSS용액(Hanks' balanced salt solution, Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.)으로 씻은 후, 잘게 썰어서 35㎟ 조직배양접시(Falcon, Becton Dickinson & Co., Lincoln Park, NJ, U.S.A.)에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS: Flow Laboratories Inc., McLean, Va, U.S.A.)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Long Island, NY)을 이용하여 섬유아세포를 일차배양하였다. 이 실험에서 사용된 배양액은 모두 위의 성분과 동일하였으며 이후부터 DMEM10으로 명명하였다. 세포가 충만해지면 0.25% Trypsin(Gibco)으로 10분간 처리하여 부유시킨 후 100㎟ 조직배양접시에 부유한 양과 DMEM10을 1:3으로 혼합하여 희석한 후 계대배양하였다. 일차배양에 걸리는 기간은 사람세포의 경우 약 2주 정도였고 토끼의 경우는 5~7일이었다. 계대배양은 사람은 5일 간격으로, 토끼의 경우는 2-3일 간격으로 시행하였다. 실험에 사용한 섬유아세포는 5번째에서 7번째까지 계대배양된 세포를 사용하였다. 모든 세포배양은 5% CO_2를 공급하는 배양기내 37℃의 온도하에서 행하여졌다.

세포는 8×10^4cell/㎖의 밀도로 부유시켜 400㎕씩 24-well 배양접시(Corning Inc, Corning, NY)의 각 칸(well)에 놓고 48~72시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후 0.75mM, 1.00mM, 1.25mM, 1.50mM, 2.00mM 농도의 아스코르빈산(L-Ascorbic acid, A-1417, SIGMA, St Louis, U.S.A.)을 각각 100㎕씩 각 칸에 주입하고 대조군은 약제를 포함하지 않은 DMEM10 100㎕를 주입하여, 다시 24시간 배양후 각 칸에서 DMEM10의 배양액을 흡인하여 제거하고 각각의 칸을 HBSS용액 500㎕로 씻어 아스코르빈산을 제거하고 DMEM10 500㎕를 주입한 후 각각 1일, 2일, 5일간 배양하였고, 5일간 배양한 군에서는 배양액은 2일마다 바꾸어 주었다. 사람과 가토의 테논낭 섬유아세포에 대해 각각 1, 2, 5일에 해당하는 24-well 조직배양접시 3개를 배양하였다.

위상차 현미경으로 배양된 세포의 형태를 관찰하였으며, 아스코르빈산에 노출된 후 1일째 배양군에 0.25% Trypsin 100㎕으로 각 칸을 처리하여 부유시킨 후 DMEM10 200㎕으로 희석하고, 각 칸의 세포를 0.008% trypan blue로 염색하여 각 칸에서 20㎕를 흡입하여 hemacytometer에 놓고 trypan blue에 염색되지 않은 세포의 수를 측정하여 세포생존율을 알아보았다. 아스코르빈산에 노출된 후 2일째와 5일째 배양한 군에도 동일한 방법으로 세포의 수를 측정하였다. 대조군의 세포수를 기준으로 세포수의 50%를 감소시키는 아스코르빈산 농도의 평균값을 ID_{50}으로 하였다. 아스코르빈산의 농도에 따라 섬유아세포 증식

에 미치는 효과를 알아보기 위해서 투여후 1일, 2일, 5일째의 ID_{50} 구하였고, 각 농도별의 ID_{50}은 Finney(1978)[10]의 방법을 응용한 Probit analysis를 사용하였다. 모든 실험을 3번씩 반복하여 아스코르빈산 각 농도당 12번씩 실험하였다.

결 과

배양된 사람 테논낭 섬유아세포를 위상차 현미경을 통해 각 칸의 세포의 형태를 살펴본 결과 아스코르빈산을 투여하지 않은 대조군은 섬유아세포가 바닥에 잘 붙어 있는 소견이 관찰되었으나(Fig. 1A), 아스코르빈산을 투여한 군에서는 약제의 세포독성에 의해 죽은 세포들이 배양접시 바닥에서 떨어져 부유된 상태로 발견되었으며 원래의 세포모양과 달리 불규칙한 형태의 세포가 발견되었다(Fig. 1B). 아스코르빈산의 ID_{50}값은 투여후 1일째 1.14mM, 2일째 1.53mM, 5일째 1.74mM이었고, 약제의 농도가 증가할수록 세포의 생존률이 감소하는 결과를 보였고, 아스코르빈산에 노출된 후 1일째의 ID_{50}은 방수내의 아스코르빈산의 농도(1.10mM)와 유사하였다. 아스코르빈산 접촉후 1일까지는 1.25mM 이상이 효과적으로 억제하지만, 접촉후 2일이나 5일까지는 2.0mM에서만 억제효과가 있었다(Fig. 2).

한편, 배양된 가토 테논낭 섬유아세포의 경우에서도 사람에서와 마찬가지로 아스코르빈산을 투여하지 않은 대조군은 섬유아세포가 바닥에 잘 붙어 있었으나(Fig. 3A), 아스코르빈산을 투여한 군에서는 죽은 세포들이 배양접시 바닥에서 떨어져 부유된 상태로 발견되었으며 원래의 세포모양과 달리 불규칙한 형태의 세포가 발견되었다(Fig. 3B).

가토에서 ID_{50}은 1일째 1.59mM, 2일째 1.16mM, 5일째 1.54mM이었고, 약제의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존률이 감소하는 경향을 보였다. 가토에서는 2일째의 ID_{50}이 가토의 방수내 아스코르빈산의 농도(1.00mM)와 유사하였고, 아스코르빈산 접촉후 1일과 2일까지는 1.25mM

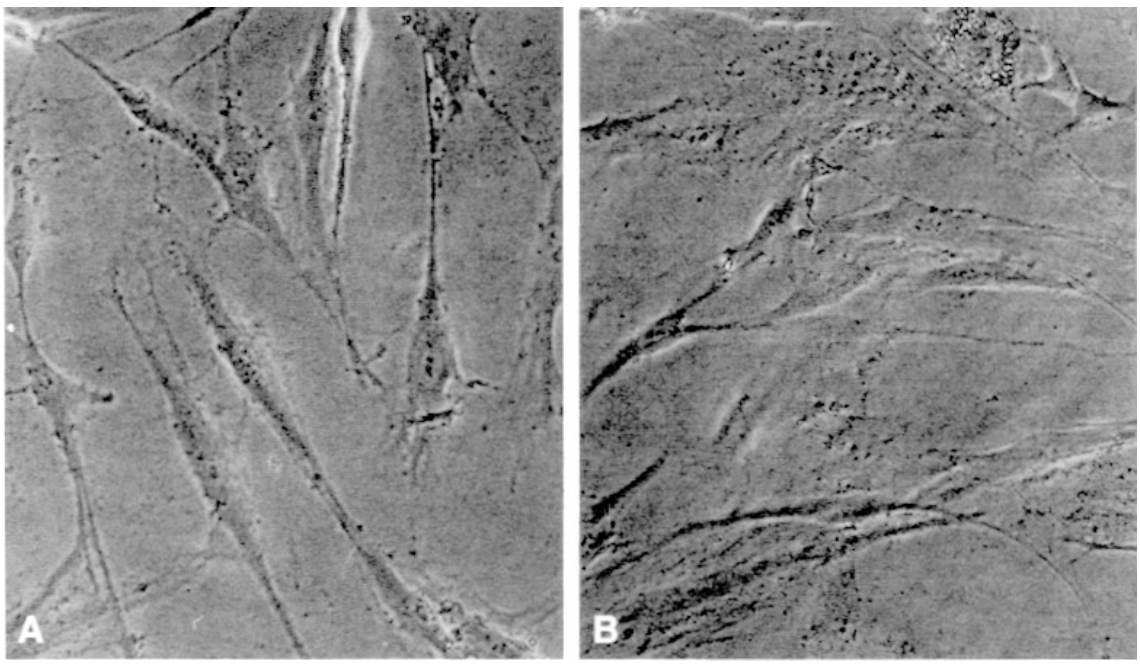

Figure 1. Cultured human Tenon's fibroblast by phase contrast inverted microscope
A. Control(2 day after exposure of DMEM10, ×200) normal fibroblasts
B. at 0.75mM(2 day after exposure of ascorbic acid, ×200) notice irregularity of shape & floating material of dead fibroblasts

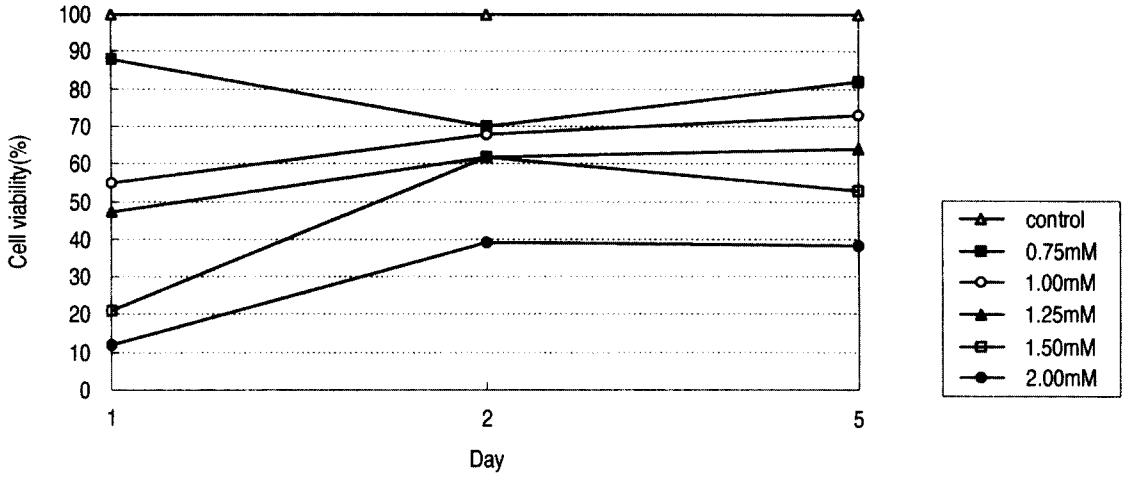

Figure 2. Effects of ascorbic acid on cultured human viable Tenon's fibroblasts proliferation according to time intervals. Cell viability was increased from day 1 to day 2 in the groups of ascorbic acid with the concentration of 1.00mM or more. But, there was no change from day 2 to day 5.

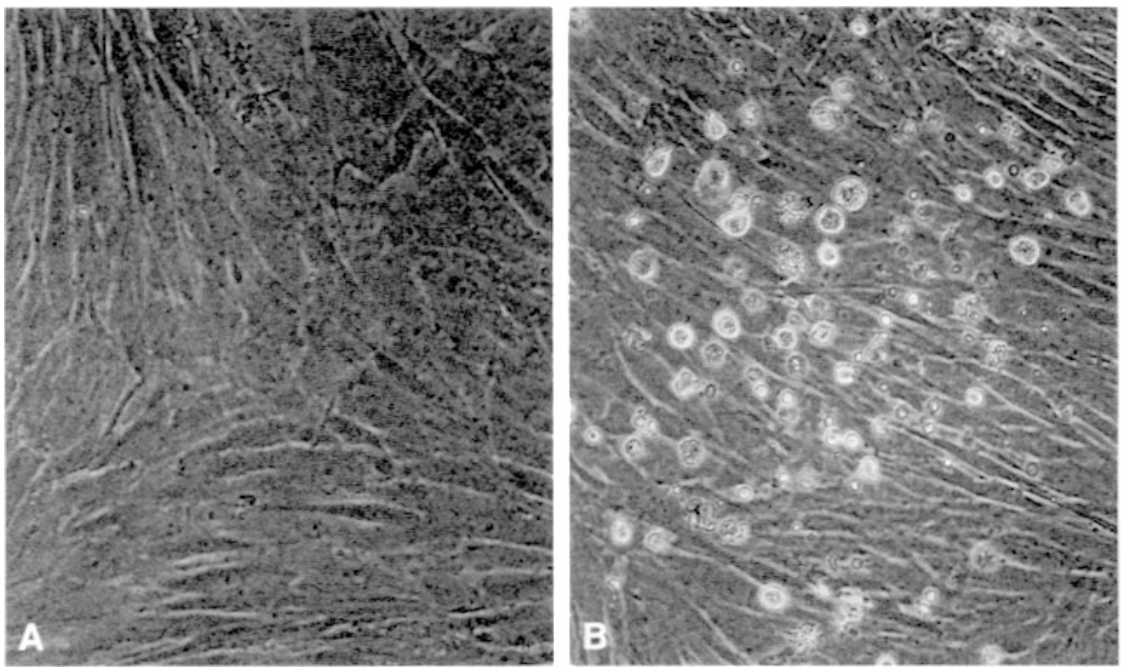

Figure 3. Cultured rabbit Tenon's fibroblast by phase contrast inverted microscope
A. Control(2 day after exposure of DMEM10, ×200) normal fibroblasts
B. at 2.00mM(2 day after exposure of ascorbic acid, ×200) notice round shape of dead fibroblsts

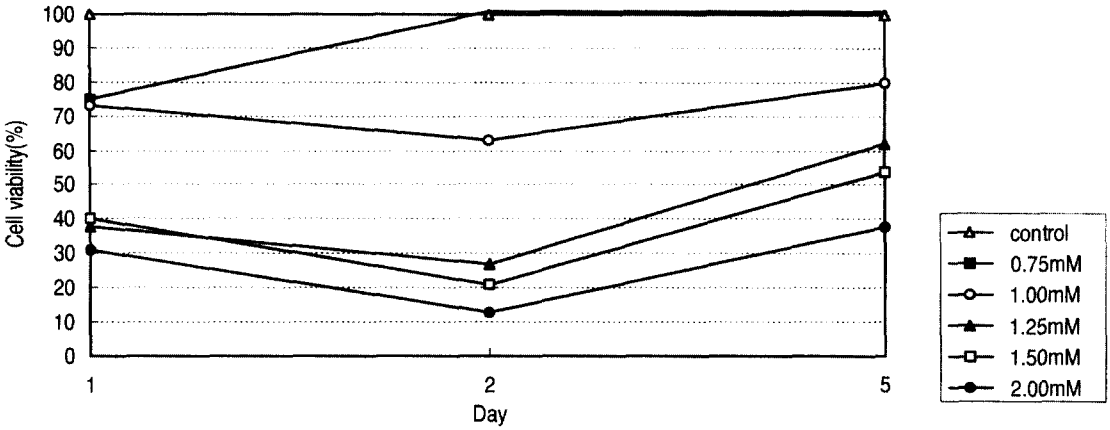

Figure 4. Effects of ascorbic acid on cultured rabbit viable Tenon's fibroblasts proliferation according to time intervals. Cell viability was decreased from day 1 to day 2 in the groups of ascorbic acid with the concentration of 1.00mM or more. But cell viability was increased from day 2 to day 5.

이상이 효과적으로 억제하지만, 접촉후 5일째에는 2.0mM에서만 억제효과가 있었다(Fig. 4).

고 찰

아스코르빈산의 현재까지 알려진 기전을 살펴보면, 저농도에서(~0.06mM) 사람 피부의 섬유아세포의 증식을 촉진하는 것으로 밝혀졌고[11] 상처조직 형성에 중요한 역할을 하는 procollagen의 hydroxylation에 작용하는 조효소로 알려져 있으나[12] 고농도에서는 결막하 섬유아세포에 독성을 나타낸다고 보고되어 있다. 그 기전으로 아스코르빈산이 작용하는 화학반응중 hydrogen peroxide가 형성되고 이 hydrogen peroxide가 세포에 독성을 나타내기 때문이라고 생각되고 있고[13], 또 17mM 정도의 매우 높은 농도에서는 Ehrlich ascites tumor cell에서 세포독성을 보인다고 보고된 바 있다[14]. 또한 0.05mM에서 0.25mM의 저농도에서도 MEM10에서 배양된 chick embryo, human embryonic skin과 muscle, 성인의 피부 섬유아세포에 독성작용을 나타낸 보고가 있다[15].

한편, Schmidt 등은[16] L929 fibroblast 세포 배양시 아스코르빈산의 농도를 0.5mM부터 11mM까지 다양하게 투여한 결과 2mM 이상의 농도에서 L929 fibroblast의 증식이 억제되고 아스코르빈산의 농도가 증가할수록 세포의 생존이 감소된다고 보고하였고, Jampel은[7] 사람 테논낭 섬유아세포를 배양하여 아스코르빈산을 투여한 결과 1.1mM에서 plating efficiency를 40% 감소시키고 3.5mM에서 plating efficiency를 80% 감소시킨다고 보고하였으며, Denk와 Knorr은[17] 소의 공막과 테논낭 섬유아세포를 배양하여 0.5mM에서 3.0mM까지의 아스코르빈산을 투여한 결과, 둘다 1.0mM에서 효과적으로 섬유아세포의 증식을 억제한다고 보고하였다.

이상에서 정상적으로 방수내에 함유되어 있는 아스코르빈산이 섬유아세포의 증식을 억제할 수 있을 것으로 생각되며, 녹내장 수술 후 이러한 농도의 아스코르빈산이 방수에 지속적으로 유입이 된다면 반흔 형성이 억제되어야 하나, 이에 대하여 Radius 등은[6] 여과수술 직후에 채취한 방수 즉 2차 방수를 검사한 결과 오히려 2차 방수가 섬유아세포의 증식을 촉진한다는 보고를 하였으며,

Joseph 등은[18] 녹내장 여과술이 실패한 눈으로부터 채취한 방수에서 섬유아세포에 대한 chemoattractant activity가 증가되어 있는 소견을 보고하였다. 또한, McGahan은[9] 안내 염증을 유발한 가토에서 전방내 아스코르빈산 농도가 감소한다고 보고하였고 이는 혈액-방수 장벽의 파괴로 인한 것이라 추측하였다.

기존의 연구결과를 볼 때 녹내장 여과수술 후 전방 내 아스코르빈산의 농도가 감소될 가능성이 높으므로 유사한 환경을 만들기 위해 본 연구에서는 아스코르빈산을 투여한 지 24시간 후에 아스코르빈산을 제거한 후 1, 2, 5일 후까지의 세포의 증식을 관찰하였다.

아스코르빈산에 한번 노출된 후 각각의 날짜까지 배양하여 50% 이상을 억제하는 농도인 ID_{50}의 평균농도는 사람에서 각각 1일째 1.14mM, 2일째 1.53mM, 5일째 1.74mM이었고, 가토에서는 각각 1일째 1.59mM, 2일째 1.16mM, 5일째 1.54mM이었다. 사람에서는 1일째 ID_{50}, 가토에서는 2일째의 ID_{50}이 방수내의 아스코르빈산의 농도와 유사하였다.

또한, 아스코르빈산이 사람 테논낭 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 시간의 변화에 따라 각 농도별로 살펴본 결과 아스코르빈산 접촉후 1일까지는 1.25mM 이상이 효과적으로 억제하지만, 접촉후 2일이나 5일까지는 2.0mM에서만 억제효과가 있었다(Fig. 2).

따라서, 사람의 테논낭 섬유아세포 증식을 5일 이상 억제하기 위해서는 최소한 1.25mM 농도의 아스코르빈산을 계속 투여하거나 고농도(여기에서는 2.0mM)를 1회 투여하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

한편, 가토에서도 시간의 변화에 따라 증식에 미치는 영향을 각 농도별로 살펴보았는데 아스코르빈산 접촉후 1일과 2일까지는 1.25mM 이상이 효과적으로 억제하지만, 접촉후 5일째에는 2.0mM에서만 억제효과가 있었다(Fig. 4). 즉, 가토의 섬유아세포 증식을 5일 이상 억제하기 위해서는 최소한 1.25mM 농도의 아스코르빈산을 계속 투여하거나 고농도(여기에서는 2.0mM)를 1회 투여하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

한편, 가토의 섬유아세포 증식이 시간경과에 따라 사람과 다른 경향을 보인 것은 절대적인 세포수의 차이에 기인한 것으로 추측된다. Jampe[17]은 사람의 테논낭 섬유아세포에 대한 아스코르빈산의 영향을 세포배양의 모델이나 세포의 밀도에 따라 두 군으로 나누어 살펴보았는데 세포수의 밀도에 차이를 두어 Low-cell density group과 충분히 충만해진 High-cell density group으로 분리한 후 아스코르빈산을 투여하여 세포독성 작용을 비교하였다. 사람의 테논낭 섬유아세포에 대한 아스코르빈산의 세포독성 작용은 Low-cell density group에서 더욱 효과적으로 나타났는데 이는 세포의 밀도에 따라 아스코르빈산의 효과가 달라질 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다. 따라서, 본 실험에서 가토와 사람의 세포배양시 두 군의 세포밀도에 차이가 있었기 때문에 서로 상이한 결과를 보였을 것이다.

이상의 결과에서, 아스코르빈산은 사람에서는 1.14mM 이상에서, 가토의 경우 1.16mM 이상에서 테논낭 섬유아세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었고 농도가 증가함에 따라 그러한 증식억제 효과가 더욱 커지는 것을 알 수 있었다. 아울러, 향후 아스코르빈산의 임상적 응용을 위한 가토의 실험에서 가토의 테논낭 섬유아세포의 증식 억제에 관한 농도는 1.16mM 이상의 아스코르빈산을 사용해야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Radar JE, Parrish RK : *Update on adjunctive antimetabolites in glaucoma surgery, Contemporary Issues in Glaucoma. Ophthalmology Clinics of North America* 4(4):861-888, 1991.
2) Dueker DK, Higginbotham EJ : *Pharmacologic modulation of filtration surgery wound healing, Management of Difficult Glaucoma, 1st ed, Boston, Blackwell scientific publication,* 1994, pp. 414-427.
3) Blumenkranz MS, Claflin A, Hajke AS : *Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease, cell culture evaluation.. Arch Opthalmol* l 102:598-604, 1984.
4) Konblueth W, Tenebaum E : *The inhibitory effect of aqueous humor on the growth of cells in tissue cultures. Am J. Ophthalmol* 42:70, 1956.
5) Herschler J, Claflin AJ, Fiorentino G : *The effect of aqueous humor on the growth of subconjunctival fibroblasts in tissue culture and its implications for glaucoma surgery. Am J. Ophthalmol* 89:245, 1980.

6) Radius RL, Herschler J, Claflin A, Fiorentino G : *Aqueous humor changes after experimental filtering surgery. Am J. Ophthalmol* 89:250, 1980.
7) Jampel HD : *Ascorbic acid is cytotoxic to dividing human Tenon's capsule fibroblast, a possible contributing factor in glaucoma filteration surgery success. Arch Ophthalmol* 108:1323-1324, 1990.
8) De Berardinis E. Tieri O, Polaella A, luglio N : *The chemical composition of the human acqueous humor in normal and pathological conditions, Exp Eye Res* 4:179-186, 1965.
9) McGahan MC : *Ascorbic acid levels in aqueous and vitreous humors of the rabbit: effects of inflammation and ceruloplasmin, Arch Ophthalmol* 41:291-298, 1985.
10) Finney DJ : *Quantal responses and the tolerance ditribution, In Statistical method in biological assay, ed. Finney DJ, London, Charles Griffin,* 1978, pp. 349-369.
11) FS Liotti, G Bruschelli, G Mariucci : *Stimulating effect of ascorbic acid on human skin fibroblast multiplication in vivo. IRCS med. Sci. (Pharmacol.)* 11(6):502-503, 1983.
12) B Lacroix, E Didier, JF Grenier : *Role of pantothenic and ascorbic acid in wound healing processes, in vitro study on fibroblasts. Internat. J. Vit. Nutr. Res* 58:407-413, 1988.
13) Smolen JE, Shohet SB : *Permeability changes induced by peroxidation in liposomes prepared from human erythrocyte lipids. J. Lipid Res* 15:273-280, 1974.
14) Bernade L, Howard T, Burk D : *Synergistic killing of Ehrlich ascites carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4-triazole. Oncology* 23:33-43, 1969.
15) Petekovsky B, Prather W : *Cytotoxicity of ascorbate and other reducing agents towards cultured fibroblasts as a results of hydrogen peroxide formation. J. Cell Physiol* 9:61-70, 1977.
16) Richard J Schmidt, Lip Yong Chung, Andrea M Andrews, Terence D Turner : *Toxicity of L-ascorbic acid to L929 fibroblast cultures: Relevance to biocompatibility testing of materials for use in wound management. J. Biomed. Res* 27:521-530. 1993.
17) Denk PO, Knorr M : *In vitro effect of ascorbic acid on the proliferation of bovine scleral and Tenon's capsule fibroblasts. Eur J. Ophthalmol* 8:37-41, 1998.
18) Joseph JP, Grierson I, Hitchings RA : *Chemotactic activity of of aqueous humor. A cause of failure of trabeculectomy?. Arch Ophthalmol* 107:69. 1989.