



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 2월

박사학위 논문

안과용 스펀지가 배양된 인체 결막상피세포에 미치는 안전성 평가

조선대학교 대학원

의 학 과

천 지 웅

안과용 스펀지가 배양된 인체 결막상피세포에 미치는 안전성 평가

Safety evaluation of ophthalmic sponges on cultured human
conjunctival epithelial cells

2023년 2월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

천 지 웅

안과용 스펀지가 배양된 인체 결막상피세포에 미치는 안전성 평가

지도교수 고재웅

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2022년 10월

조선대학교 대학원

의학과

천지웅

천지웅의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김대현 (인)

위원 조선대학교 교수 양성원 (인)

위원 전남대학교 교수 지영석 (인)

위원 조선대학교 교수 김성택 (인)

위원 조선대학교 교수 고재웅 (인)

2023년 1월

조선대학교 대학원

Table of Contents

I. Introduction · · · · ·	1
II. Materials and method · · · · ·	3
A. Ethics statement	
B. Cell Viability by MTT Assays	
C. Live-Dead Viability Assays	
D. Cytokine mRNA relative expression	
E. Statistical analysis	
III. Results · · · · ·	6
IV. Discussion · · · · ·	8
V. References · · · · ·	11

ABSTRACT

Safety evaluation of ophthalmic sponges on cultured human conjunctival epithelial cells

Purpose

Ophthalmic sponges are used to remove and check bleeding or fluid leakage that occurs during refractive surgery, corneal and anterior segment surgery. In order to confirm the safety of the ocular sponge Occucell[®] (OccuTech Inc, Seongnam, Korea), the biological safety was compared and analyzed with pre-existing products.

Materials and Method

To evaluate the biological safety of the ophthalmic sponge, extracts were conducted to evaluate cytotoxicity on four products, Occucell[®], a brand-new product, pre-existing products, Ultracell[®], Eyetec-1 and Eyetec-2. Human conjunctival epithelial cells cultured in 96 well plates with the elution from tertiary distilled water at concentration of 1%, 5%, and 10%, and ethanol and DMSO at 1%, 1.5%, and 2% concentrations, respectively. Cell viability was measured through 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) analysis. Live & dead cell staining was observed using a fluorescence microscope. To confirm the effect on IL-1 β and TNF- α expression, 0.5% DMSO eluate was treated with cultured human conjunctival epithelial cells to conduct real-time polymerase chain reaction and mRNA expression levels were compared.

Results

In the MTT analysis, there was no significant difference between Occucell[®], compared with pre-existing products. Human conjunctival epithelial cells showed more than 90% viability. In addition, there was no significant difference compared to the control group in live & dead cell staining and relative mRNA expression of IL-1 β and TNF- α .

Conclusion

Occucell[®], an ophthalmic sponge used during ophthalmic surgery in clinical practice, shows more than 90% viability of human conjunctival epithelial cells after treatment with the elution. It is thought to be safe to use as it does not show any significant difference from the pre-existing products.

Ji Woong Chun

Advisor : Prof. Jae Woong Koh, Ph.D

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Introduction

백내장 수술 및 굴절교정수술 같은 안과 수술 진행 시 출혈, 전방수, 유리체 등의 유출이 가능하다. 수술 과정에서 이를 적절히 제거하기 위해 다양한 방법이 이용되고 있다. 안과 수술의 특징상 국소 절개가 이루어지기 때문에 그 크기에 맞는 적절한 흡수성 제재가 필요하며, 현재 안과용 스펀지가 많이 사용되고 있다.

안과용 스펀지는 100가지 이상이 시중에 유통되고 있으며, 그 종류, 크기, 모양, 재질 등이 다양하다. [1] 일반적으로 안과용 스펀지는 4~5cm 길이의 폴리프로필렌(polypropylene)으로 이루어진 손잡이 끝에 polyvinyl alcohol(PVA)이나 셀룰로오스(cellulose) 재질로 이루어진 삼각형 모양의 스펀지가 부착되어 있다. 특히 PVA는 수분에 대한 흡착력이 강하고, 수분을 흡수하여 부풀어 오르면서도 다른 단백질에 대한 친화력이 적어 변형을 가져오지 않기 때문에 소프트렌즈 제작 시에도 사용되고, 다양한 코팅 및 장벽의 재료로 적합하다고 평가받고 있다. [2, 3] OccuTech 사의 안과용 스펀지(Occucell[®])는 PVA 재질의 스펀지로 고른 입자로 흡수량이 많으며, 손잡이에 탄성력이 있다 (Figure. 1).

안과용 스펀지는 수술 시 출혈이나 점액을 흡수할 뿐만 아니라 마취제를 흡수하여 수술에 사용하기도 한다. 또한, 연구를 위한 눈물 수집 등 다양한 용도로 이용이 가능하다. 현재 의료기기 시장에 들어와 있는 PVA 안과용 스펀지는 해외 수입에 의존도가 높다. 따라서 일반적으로 사용의 금기가 되는 경우는 거의 없는 거로 알려졌지만, 안구에 미칠 수 있는 위험성, 생물학적 안전성 연구가 중요하다. 본 연구를 통해 장기간 사용되어 안전성이 입증된 기존 제품과 새로운 제품인 Occucell[®]을 포함하여 총 4개의 안과용 스펀지 비교 분석을 통해 인

체 결막상피세포에 미치는 세포독성을 측정하여 안구에 미치는 영향에 관해 확인하고자 한다.

Materials and method

Ethics statement

본 연구는 조선대학교 병원 임상연구심의위원회 승인을 받았으며, (IRB 승인 번호: 2022-08-035), 헬싱키선언(Declaration of Helsinki)을 준수하였다. 비임상 연구로 인해 기관 검토 위원회로부터 사전 동의가 면제되었다. 또한, 의료기기 생물학적 안전성 시험을 위해 식품의약품안전처에서 제정한 의료기기 생물학적 안전성 시험에 대한 GLP 적용 시 고려사항 세포독성시험 가이드라인에 따라 실험을 진행하였다.

Cell Viability by MTT Assays

본 연구는 새로 출시된 안과용 스펀지 제품인 국내 제품 Occucell®(OccuTech Inc, Seongnam, Korea)과 기존에 사용되던 Ultracell®(Beaver Visitec International, Waltham, MA)과 Network medical products사의 PVA재질의 안과용 스펀지 두 제품을 임의로 1, 2로 표기를 한 Eyetec-1, Eyetec-2(Network medical products, North Yorkshire, UK)를 포함하여 총 4가지 제품을 대상으로 연구를 진행하였다.

Occucell®, Ultracell®, Eyetec-1, Eyetec-2 네 종류의 제품을 용매에 용출시키는 과정에서 정제수로 3차 증류수(Tertiary distilled water, 3DW)를, 극성용매로 에탄올(ethanol)을, 비극성 용매로 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 하여 각각의 용매에 넣은 후 55℃에서 72시간 동안 용출하였다. 각 제품의 용출물은 실린지 필터를 이용하여 불순물을 제거하여 보관하였다. 본 실험에 사용할 인체 결막상피세포

(Human Conjunctival Epithelium Cells, hCJECs)는 96 well plate에 1×10^4 만큼 분주하여 배양하였다.

다음날 배양 배지를 제거하고 용출물을 6시간 동안 배양된 인체 결막상피세포에 처리하였다. 3차 증류수에서 용출된 용출물은 1%, 5%, 10%로 희석하여 세포에 처리하였고, 에탄올 및 DMSO의 용출물은 1%, 1.5%, 2%로 희석하여 세포에 하였다. 용출물을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution 500 μ g/ml로 2시간 동안 처리하였다. MTT solution을 제거하고 PBS로 세척 후 DMSO 200 μ g를 처리하였다. 살아있는 인체 결막상피세포를 확인하기 위해 enzyme-linked immuno-adsorbent assay(ELISA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

Live-Dead Viability Assays

Live-Dead 세포 염색법은 세포막의 온전성을 통해 세포 생존과 사멸을 구별하는 방법으로 동일한 Occucell[®], Ultracell[®], Eyetec-1, Eyetec-2 네 종류의 제품에 대한 세포 염색 검사를 시행하였다. 인체 결막상피세포를 24 well plate에 4×10^4 만큼 분주하여 배양하였고, MTT assay와 같은 방법으로 얻은 용출물을 6시간 동안 처리하였다. 용출물을 제거하고 PBS로 세척 후 Live/Dead viability/cytotoxicity kit (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)를 사용하고 세포 염색을 위해 Calcein acetoxymethyl ester(AM) 0.5 μ l/ml, Ethidium homodimer-1 2 μ l/ml로 15분 동안 처리하였다. 이후 생존한 세포와 사멸된 세포를 관찰하기 위해 형광현미경으로 촬영하였다.

Cytokine mRNA relative expression

안과용 스펀지 세포 내 사이토카인에 대한 영향을 보기 위해, 세포 생존을 위한 전염증성 사이토카인으로 작용하는 IL-1 β , TNF- α 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 비교하였다. Occucell[®], Ultracell[®], Eyetec-1, Eyetec-2 네 종류의 제품을 각각 DMSO에 55 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 용출하였다. 용출물은 실린지 필터를 이용하여 불순물을 제거하여 보관하였다. 본 실험에 사용할 인체 결막상피세포를 96 well plate에 1x10⁴만큼 분주하여 배양하였고, 용출물을 0.5%로 희석하여 세포에 6시간, 24시간 처리하였다. 용출물을 제거하고 housekeeping gene인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 대조군으로 하고, 인체 결막상피세포의 IL-1 β , TNF α 의 mRNA 발현 수준을 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)로 분석하였고, 하나의 샘플에 대해 3회 반복하여 실행하였다.

Statistical analysis

통계적 분석은 IBM SPSS ver. 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 사용하였으며, p-값 ≤ 0.05 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Results

네 종류의 안과용 스펀지를 MTT assay를 통해 세포 생존율을 연구한 결과, 3차 증류수에 72시간 동안 용출시킨 용출물을 각각 1%, 5%, 10%로 희석시켜 배양한 인체 결막상피세포에 6시간 동안 처리하였을 때, 모든 제품에서 97% 이상의 높은 세포 생존율을 보였다(Figure 2A). 같은 조건에서 1%, 1.5%, 2%로 희석시킨 에탄올 용출물을 처리한 결과, 모든 제품에서 94% 이상의 세포 생존율을 보였다(Figure 2B). 마찬가지로 1%, 1.5%, 2%로 희석시킨 DMSO 용출물을 처리한 결과, 모든 제품에서 94% 이상의 세포 생존율을 보였다(Figure 2C).

Live-Dead cell staining에서 비형광의 calcein-AM은 살아있는 세포 내의 esterase에 의해 녹색 형광의 calcein으로 변하여 세포 대사가 나타나고 있음을 알 수 있으며, ethidium homodimer는 세포 안으로 들어가 핵산과 결합하여 붉은 형광을 나타내어 손상된 세포를 표지한다. [4, 5] Occucell[®]을 3차 증류수에 72시간 동안 용출시킨 용출물을 각각 1%, 5%, 10%로 희석시켜 배양한 인체 결막상피세포에 처리하였을 때 대조군과 각 실험군에서 모두 죽은 세포가 나타나지 않았음을 알 수 있다(Figure 3A). 마찬가지로 에탄올과 DMSO에 72시간 동안 용출시킨 용출물을 각각 1%, 1.5%, 2%로 희석시켜 배양한 인체 결막상피세포에 처리하였을 때 대조군과 각 실험군에서 모두 죽은 세포가 나타나지 않았음을 알 수 있다(Figure 3B, 3C). 동일한 방법으로 다른 세 종류의 안과용 스펀지인 Ultracell[®], Eyetec-1, Eyetec-2를 각각 3차 증류수, 에탄올, DMSO에 용출시킨 용출물을 처리하였을 때 죽은 세포는 나타나지 않았다 (Figure 4-6).

안과용 스펀지 용출물이 세포에서 IL-1 β , TNF- α 의 mRNA 발현 정도를

RT-PCR로 비교하였다. DMSO 용출물을 0.5%로 희석하여 6시간, 24시간 동안 인체 결막상피세포에 처리하였을 때, 6시간 처리한 경우 GAPDH mRNA 발현량을 기준으로 IL-1 β mRNA 발현량은, Occucell[®]에서는 1.33, Ultracell[®]은 1.14, Eyetec-1은 1.70, Eyetec-2는 1.16으로 측정되었다. 24시간 처리한 경우 IL-1 β mRNA 발현량은, Occucell[®]에서는 0.55, Ultracell[®]은 1.46, Eyetec-1은 0.93, Eyetec-2는 0.93으로 측정되었다(Figure 7A). 6시간 처리한 경우 TNF- α mRNA 발현량은, Occucell[®]에서는 0.78, Ultracell[®]은 0.94, Eyetec-1은 1.26, Eyetec-2는 0.96으로 측정되었고, 24시간 처리한 경우 Occucell[®]에서는 0.62, Ultracell[®]은 0.78, Eyetec-1은 0.77, Eyetec-2는 1.02로 측정되었다(Figure 7B).

Discussion

안과용 스펀지는 뛰어난 흡수력으로 수술 과정에서 출혈이나 미세한 파편과 입자들을 제거할 수 있으며, 각막 절개창에서 전방수 누출 여부를 판단할 수 있다. 또한, 레이저각막절삭성형 수술 후 각막 부착을 쉽게 하여 수술 후 초기 시력 회복에 도움이 되기도 한다. 이처럼 조직의 조작에 용이하여 각막 및 전안부 수술 시 자주 사용된다. [6] 최근 눈물 내 단백질 분석을 위한 연구에서 눈물을 수집하는 과정에서 쉬르머 종이(Schirmer paper), 모세관(capillary tube), 셀룰로스 막대(cellulose rod)와 안과용 스펀지를 이용하였고, 그중 스펀지를 이용하였을 때 눈물 단백질 조성의 변성이 적으며 불편감이 적었다. [1] 다른 방법들은 시간이 오래 걸리고 강한 자극감을 발생시킬 수 있어 예민하거나, 어린 대상으로 사용하기에 한계가 있었다. 안과용 스펀지의 경우 빠르고, 자극감이 적어 아이를 포함한 모든 연령에서 사용이 가능한 장점이 있다. [7] 또한 섬유주 절제술과 같은 녹내장 수술에서 스펀지 조각을 이용하여 5-fluorouracil과 같은 항증식성약물(anti-proliferative agents)을 흡수시켜 사용하거나, 띠모양각막병증 수술에서 ethylene-diamine-tetraacetic acid(EDTA)를 스펀지에 흡수시켜 사용하기도 한다. [8-11] 수술 시 국소마취를 위해 점안 마취를 대신하여, 마취제를 흡수시켜 마취에 사용하는 경우도 있다. [12]

본 연구에서는 네 종류의 안과용 스펀지를 대상으로 의료기기의 세포독성시험을 위해 의료기기의 용출물을 접촉시켜 세포를 배양하는 용출물 시험을 진행하였다. MTT assay를 통해 측정된 기존 제품들의 세포 생존율은 2%로 희석한 경우 94~95%를 보였고, 다른 농도에서는 100%에 가까운 세포 생존율을 보였다. Occucell[®] 용출물의 세포 생존율은 모든 용매에서 97% 이상으로 전반적으로 세

포 생존율이 높게 관찰되었다. 또한, Live-Dead cell staining에서는 네 종류의 제품에서 모두 사멸된 세포가 관찰되지 않아, 위 결과들을 통해 기존의 세 가지 제품들과 마찬가지로 Occucell®의 세포독성이 나타나지 않았음을 알 수 있었다.

IL-1 β 는 조직 손상과 관련된 사이토카인(cytokine) 중 하나이며, 염증, 세포자멸사 및 세포외 기질 축적을 촉진하여 각 결막에 손상이 생길 때 주요 매개체로 작용한다. IL-1 β 는 Statens Seruminstitut Rabbit Corneal Cells에서 p42/p44 MAPK- 및 JNK1/2 의존성 AP-1 및 NF-kB 활성화를 통해 matrix metalloproteinase-9(MMP-9) 발현 및 세포 이동을 상향 조절(up-regulation)하여 유도한다고 보고된다. [13, 14] 다른 전염증성 사이토카인으로 TNF- α 는 조직의 손상 알레르거나 감염 등의 상황에서 다양한 작용을 하는 주요 사이토카인 중 하나이다. [15-18] 0.5%로 희석한 DMSO를 인체 결막상피세포에 각각 6시간, 24시간 처리하였을 때, Occucell® 용출물에 의한 IL-1 β 와 TNF- α 의 mRNA expression의 발현량이 다른 제품들과 비슷한 양상을 보이며 큰 차이를 나타내지 않음을 볼 수 있다. 이를 통해 국내 제품 Occucell®이 용출물 실험과 세포 염색 실험상 높은 세포 생존율과 낮은 세포독성 그리고 세포 내 사이토카인의 발현량에 유의미한 차이를 보이지 않아 임상에서 자주 사용되는 제품들과 마찬가지로 안전성 있는 제품임을 알 수 있었다.

본 연구는 안과용 스펀지에 대해 그 기능이나 용도에 대해서 다루어진 연구가 거의 없어, 새롭게 생산된 Occucell® 과 기존에 사용되는 여러 안과용 스펀지의 안구에 미치는 안전성을 분석하기 위해 세포독성 실험을 하여 비교했다는 데에 의의가 있다. 결론적으로 신제품인 Occucell® 또한 추후 실제 임상에서 안전성

이 있으며, 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Lee CH, Yeo A, Kim TI, Seo KY, Kim EK, Lee HK. Comparison of the effectiveness between sampling methods for protein analysis of tear fluids. *J Korean Ophthalmol Soc.* 2015;56:1677-1683
2. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, et al. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5: 397-406
3. Alves MH, Jensen BE, Smith AA, Zelikin AN. Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromol Biosci* 2011;11:1293-313
4. Decherchi P, Cochard P, Gauthier P. Dual staining assessment of Schwann cell viability within whole peripheral nerves using calcein-AM and ethidium homodimer. *J Neurosci Methods.* 1997 Feb;71(2):205-13.
5. Chen CC, Chang JH, Lee JB, Javier J, Azar DT. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Aug;43(8):2593-602.
6. Young Mun Koh, Tae Jung Yoon, Kyoung Soo Na, Nam Cheol Chi, The Effect on Early Visual Outcome of Corneal Cap Attachment with Brushing after LASIK. *J Korean Ophthalmol Soc.* 2001;42(12):1679-1684
7. Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, Belij S, Schlacher S, Stein E, Bintner N, Merio M, Zlabinger GJ, Barisani-Asenbauer T. Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis.* 2012;18:2717-25.

8. Jong Gyoo Yang, Changwon Kee, Surgical Outcome of Intraoperative Episcleral Application of 5-Fluorouracil in Primary Trabeculectomy. *Journal of the Korean Ophthalmological Society* 1997;38(9):1641-1646
9. Poole TR, Gillespie IH, Knee G, Whitworth J. Microscopic fragmentation of ophthalmic surgical sponge spears used for delivery of antiproliferative agents in glaucoma filtering surgery. *Br J Ophthalmol.* 2002 Dec;86(12):1448-9.
10. Mietz H, Diestelhorst M, Rump A, F, E, Theisohn M, Klaus W, Krieglstein G, K: Ocular Concentrations of Mitomycin C Using Different Delivery Devices. *Ophthalmologica* 1998;212:37-42.
11. Jung Won Park, Sang Kyung Choi, The Efficacy of EDTA Chelation on Band Keratopathy, *Journal of the Korean Ophthalmological Society* 1997;38(10):1712-1719.
12. Scuderi G, Scuderi L, Calafiore S, Fencia V, Abdolrahimzadeh S. Deep topical anesthesia with ropivacaine-soaked sponge for phacoemulsification. *Int Ophthalmol.* 2019 Dec;39(12):2851-2856.
13. Tseng HC, Lee IT, Lin CC, Chi PL, Cheng SE, Shih RH, Hsiao LD, Yang CM. IL-1 β promotes corneal epithelial cell migration by increasing MMP-9 expression through NF- κ B- and AP-1-dependent pathways. *PLoS One.* 2013;8(3):e57955.
14. Wilson SE, Esposito A. Focus on molecules: interleukin-1: a master regulator of the corneal response to injury. *Exp Eye Res.* 2009 Aug;89(2):124-5.
15. Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF- α . *Cornea.* 2007 Oct;26(9 Suppl 1):S70-4.

16. Brenner MK. Tumour necrosis factor. *Br J Haematol.* 1988 Jun;69(2):149-52.
17. Maier AB, Reichhart N, Gonnermann J, Kociok N, Riechardt AI, Gundlach E, Strauß O, Jousen AM. Effects of TNF α receptor TNF-Rp55- or TNF-Rp75-deficiency on corneal neovascularization and lymphangiogenesis in the mouse. *PLoS One.* 2021 Apr 9;16(4):e0245143.
18. Yang S, Wang J, Brand DD, Zheng SG. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2018 Apr 19;9:784.

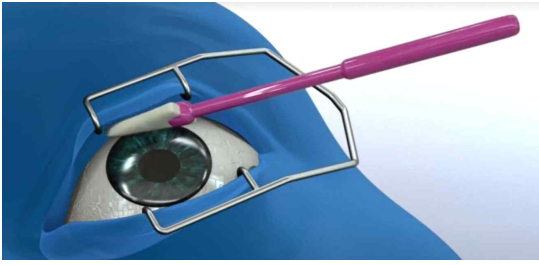
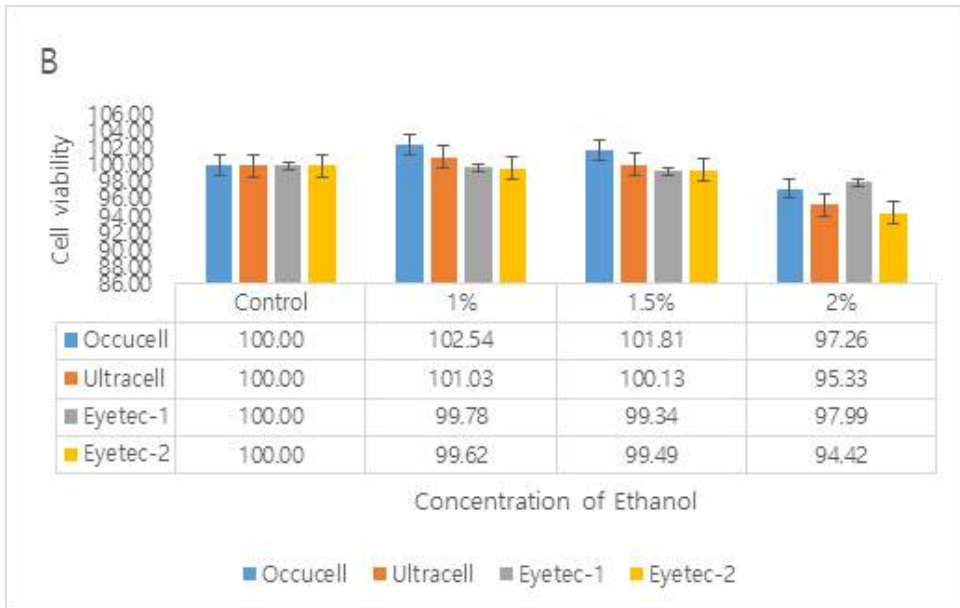
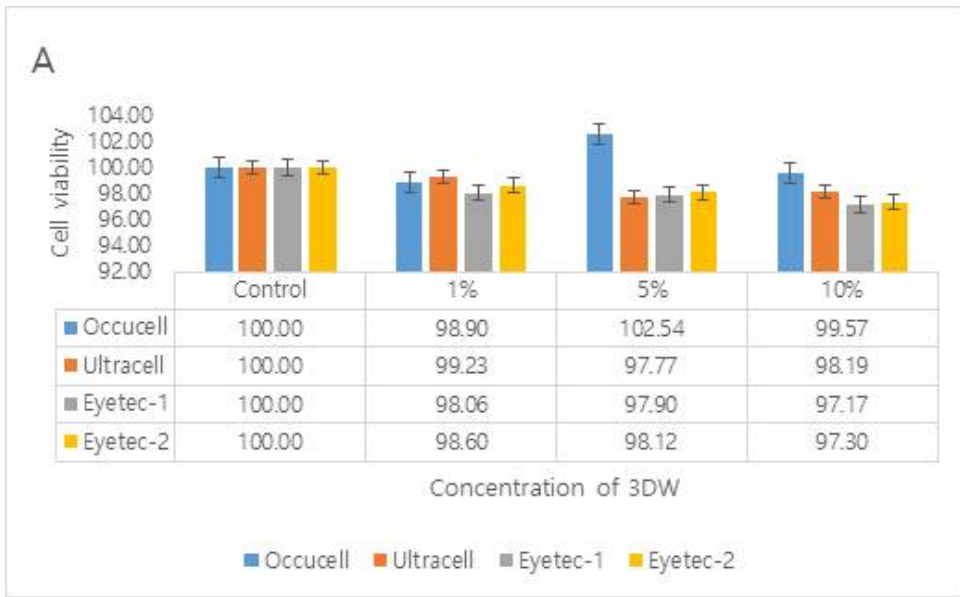


Figure 1. Occucell[®] ophthalmic sponge. The illustration shows the actual use of ophthalmic sponge.



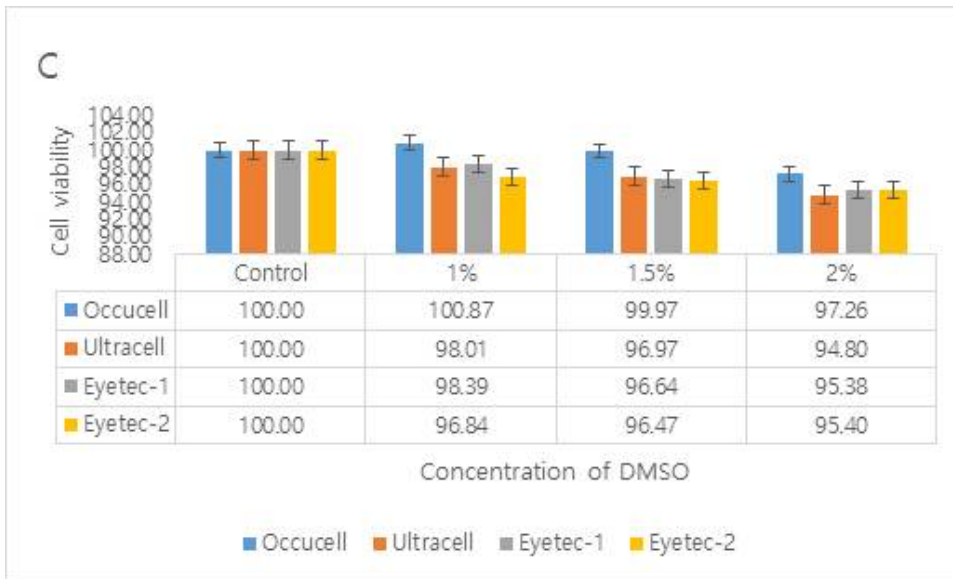
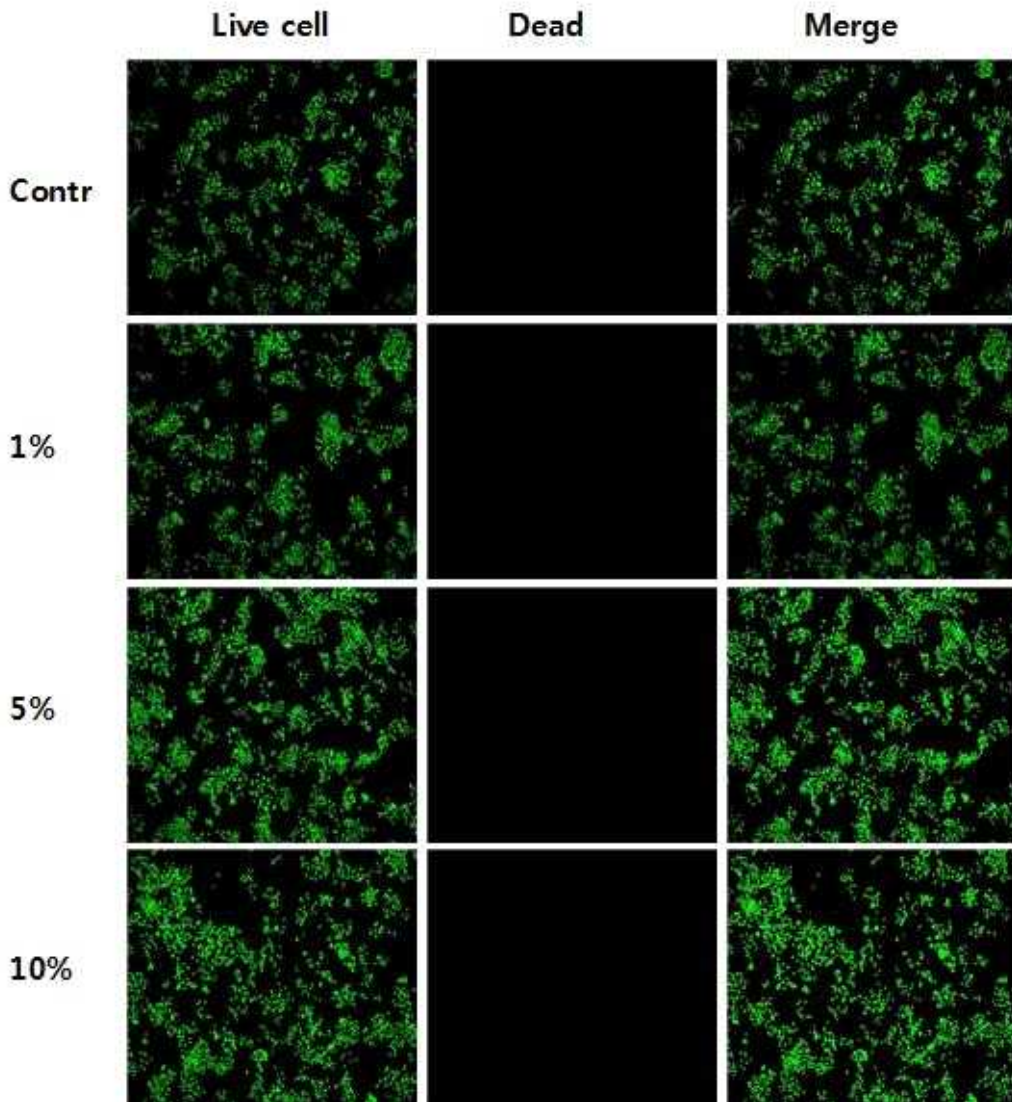


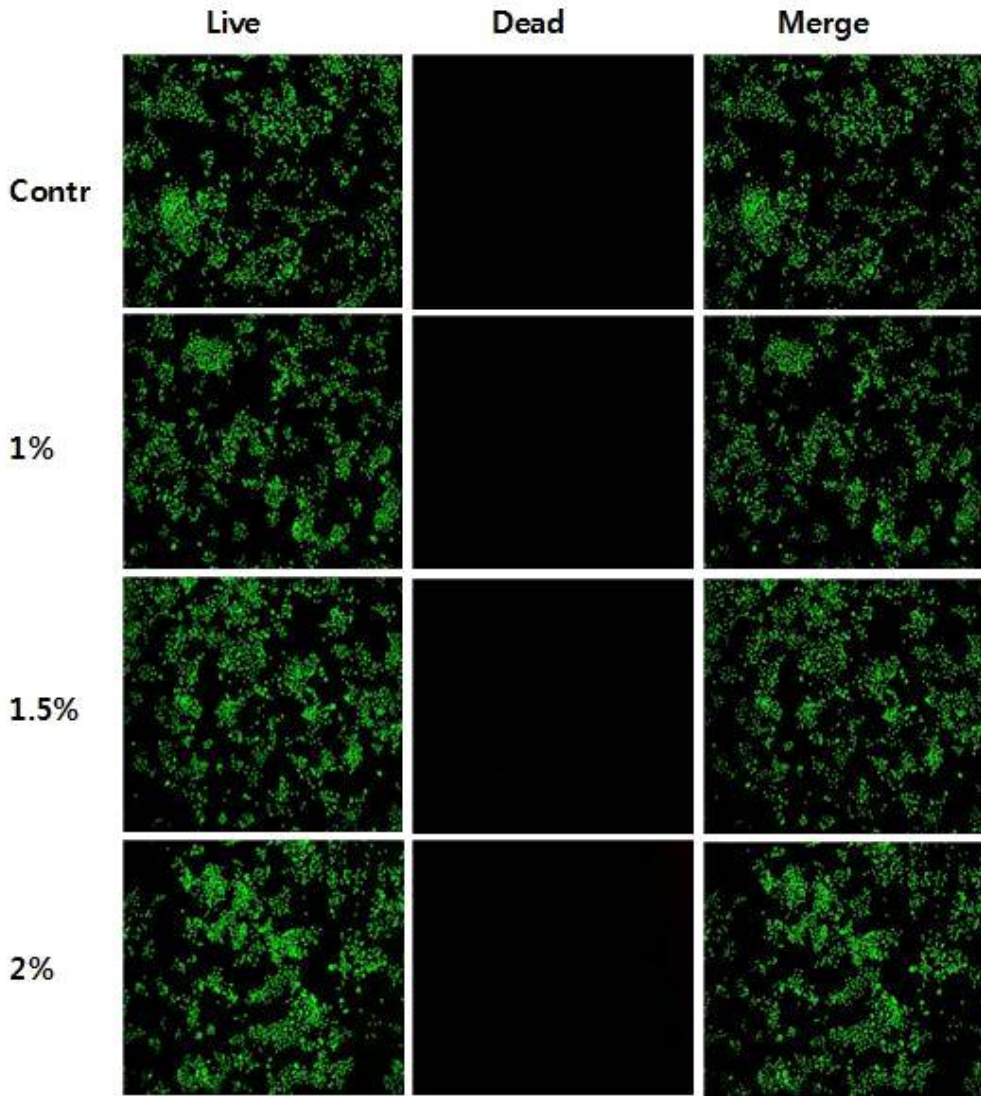
Figure 2. Results of cell viability by MTT assays with the concentration of each solution: tertiary distilled water (A), ethanol(B), DMSO (C).

MTT = 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

(A)



(B)



(C)

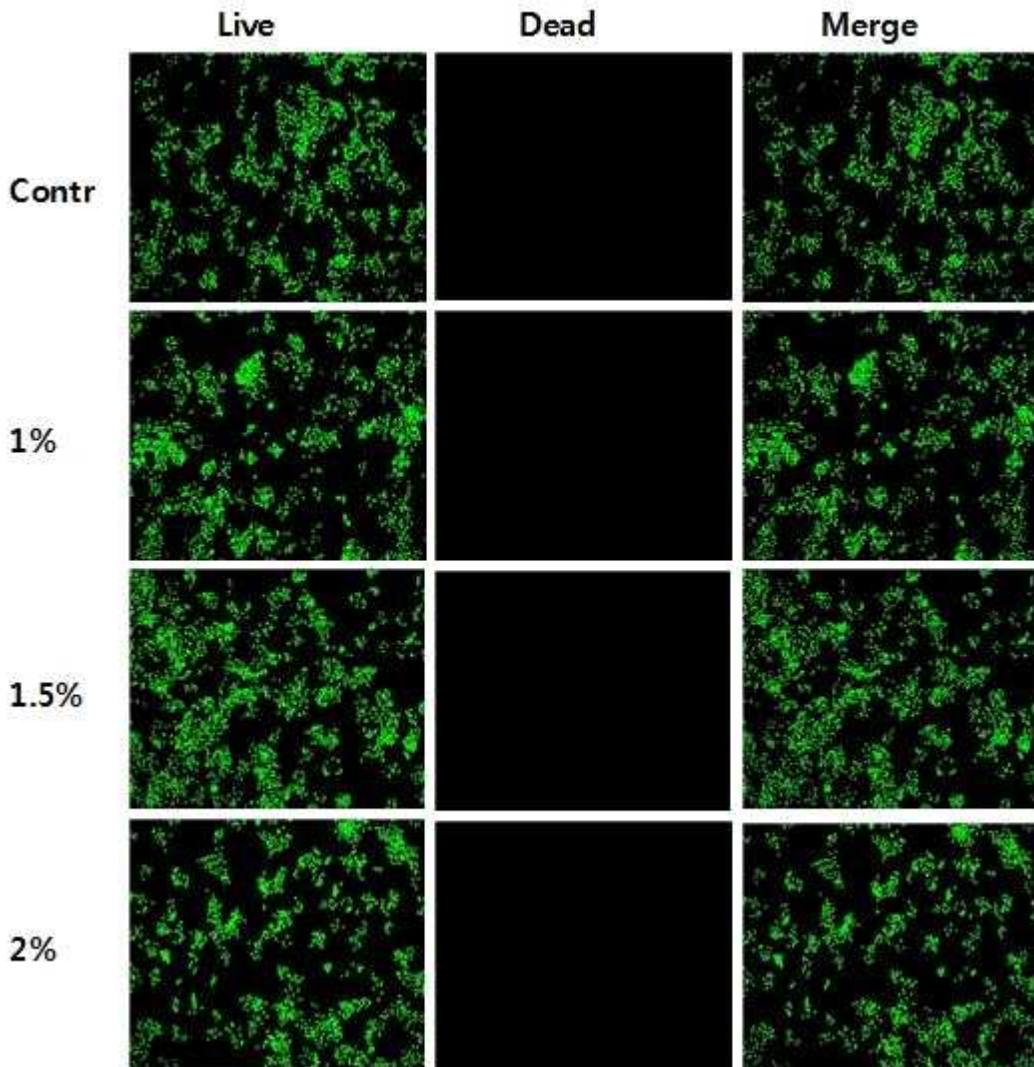
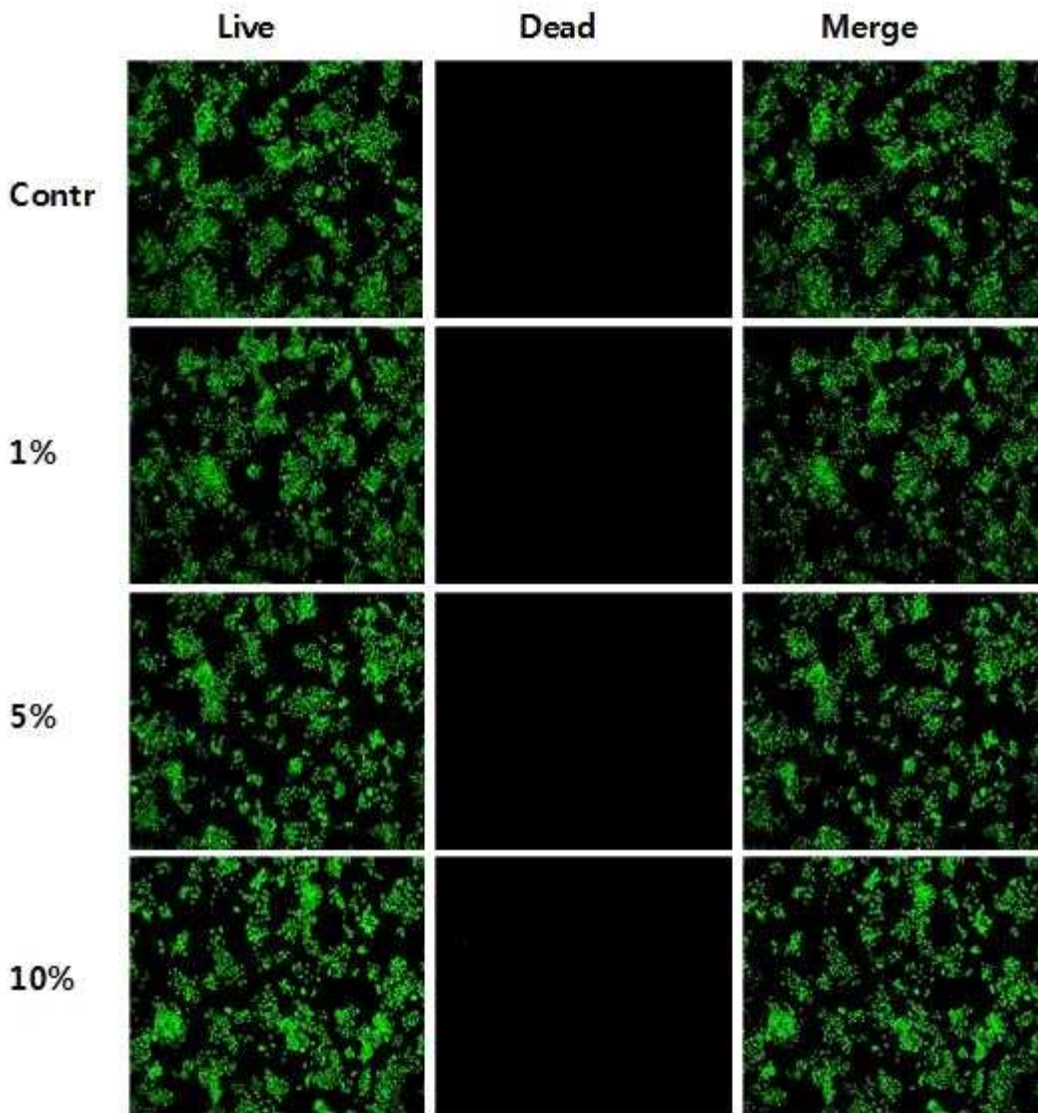
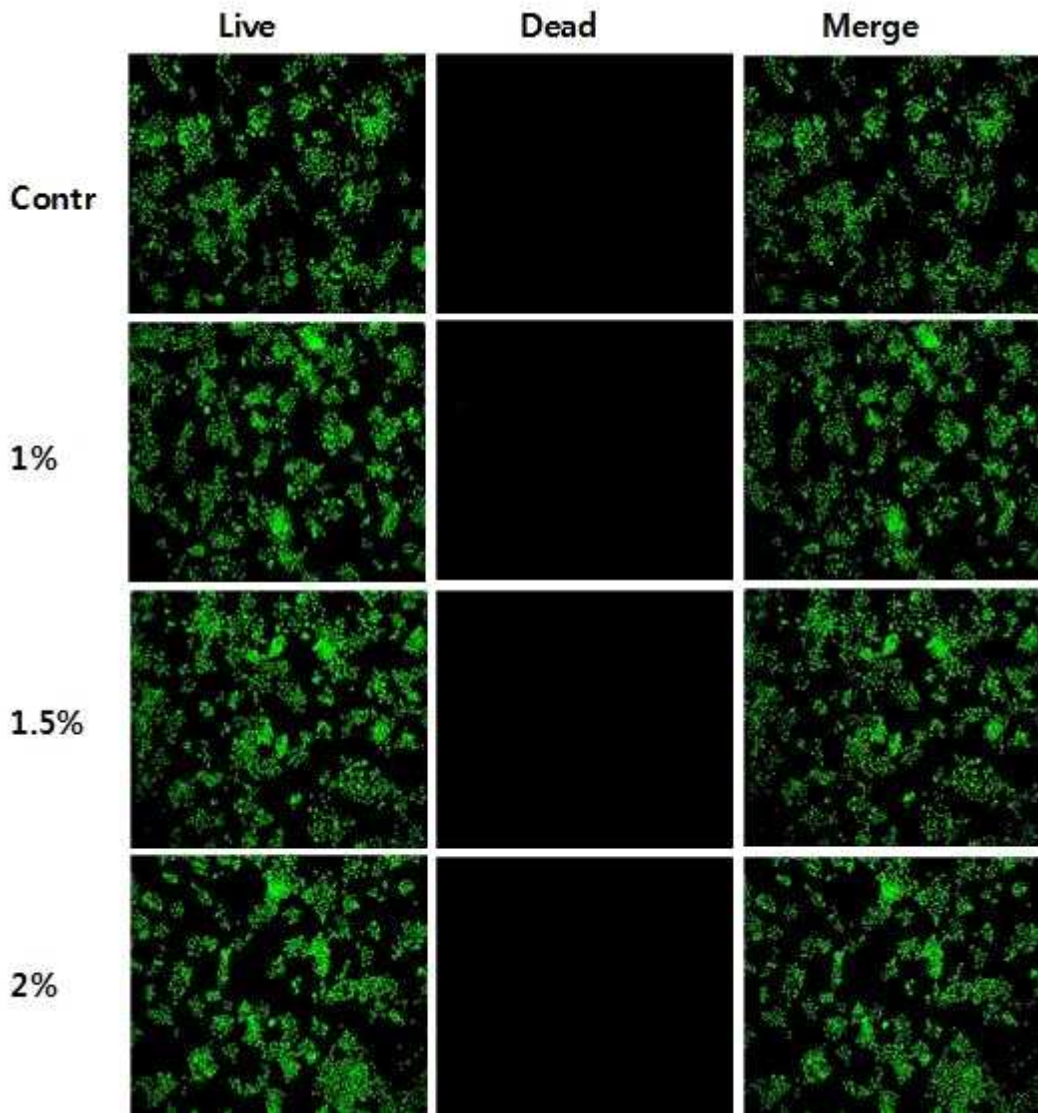


Figure 3. Comparison of fluorescence microscopic images of live and dead human conjunctival epithelial cells(hCJECs) incubated with each concentration of Occucell[®] eluates by tertiary distilled water (A), ethanol (B), DMSO (C). Metabolically active cells converted nonfluorescent polyanionic calcein-AM into green fluorescence. Damaged cell membranes allowed permeation of ethidium homodimer and its binding to nucleic acids, resulting in red fluorescence.

(A)



(B)



(C)

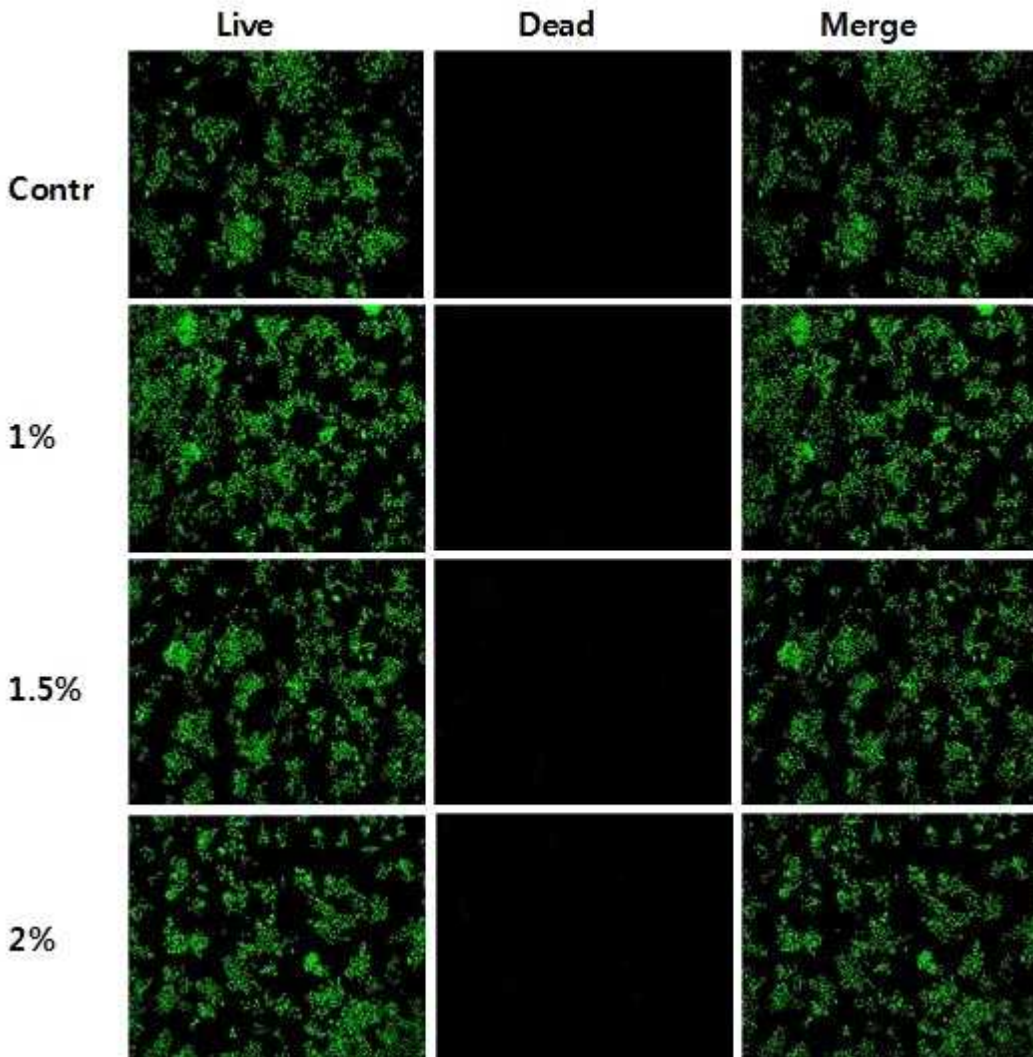
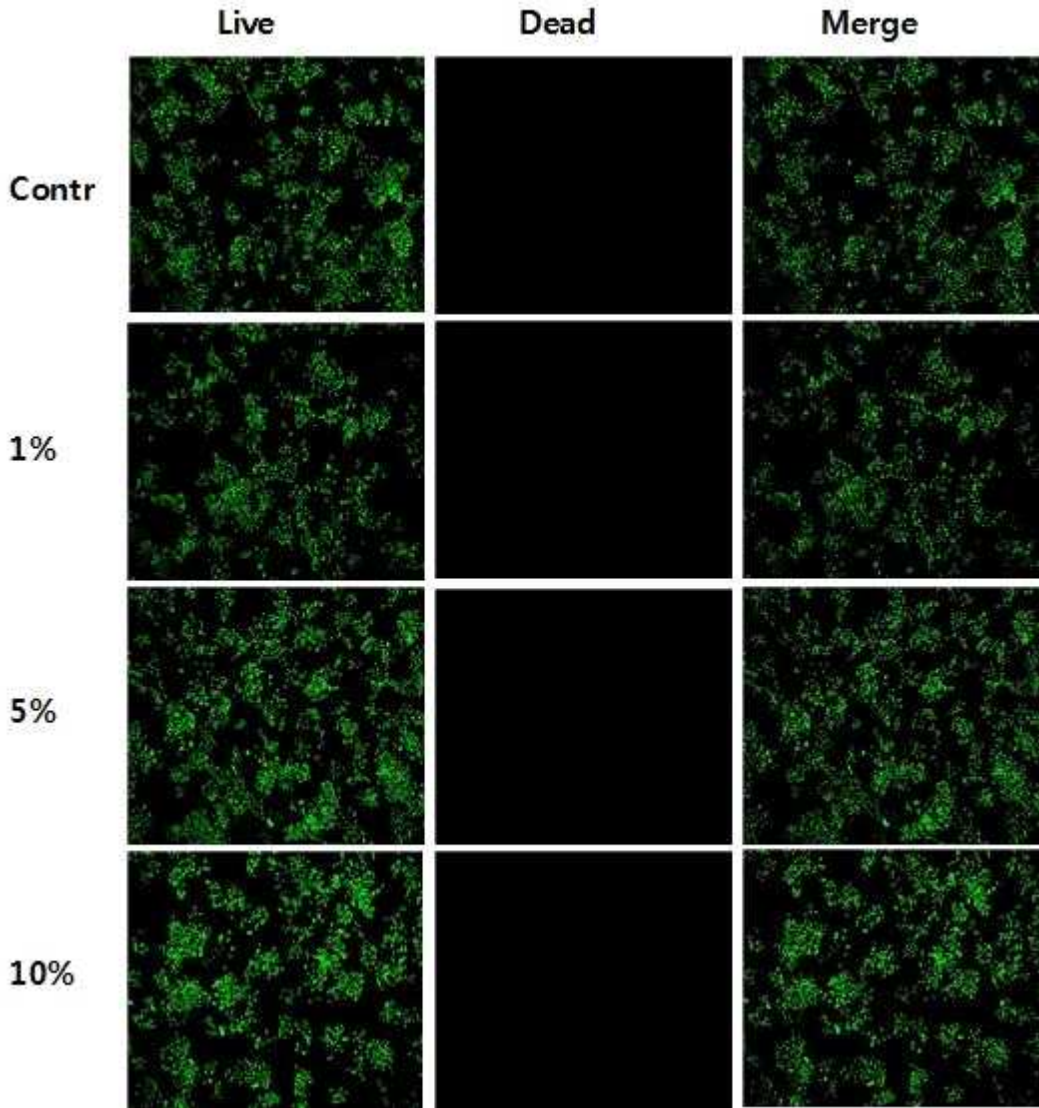
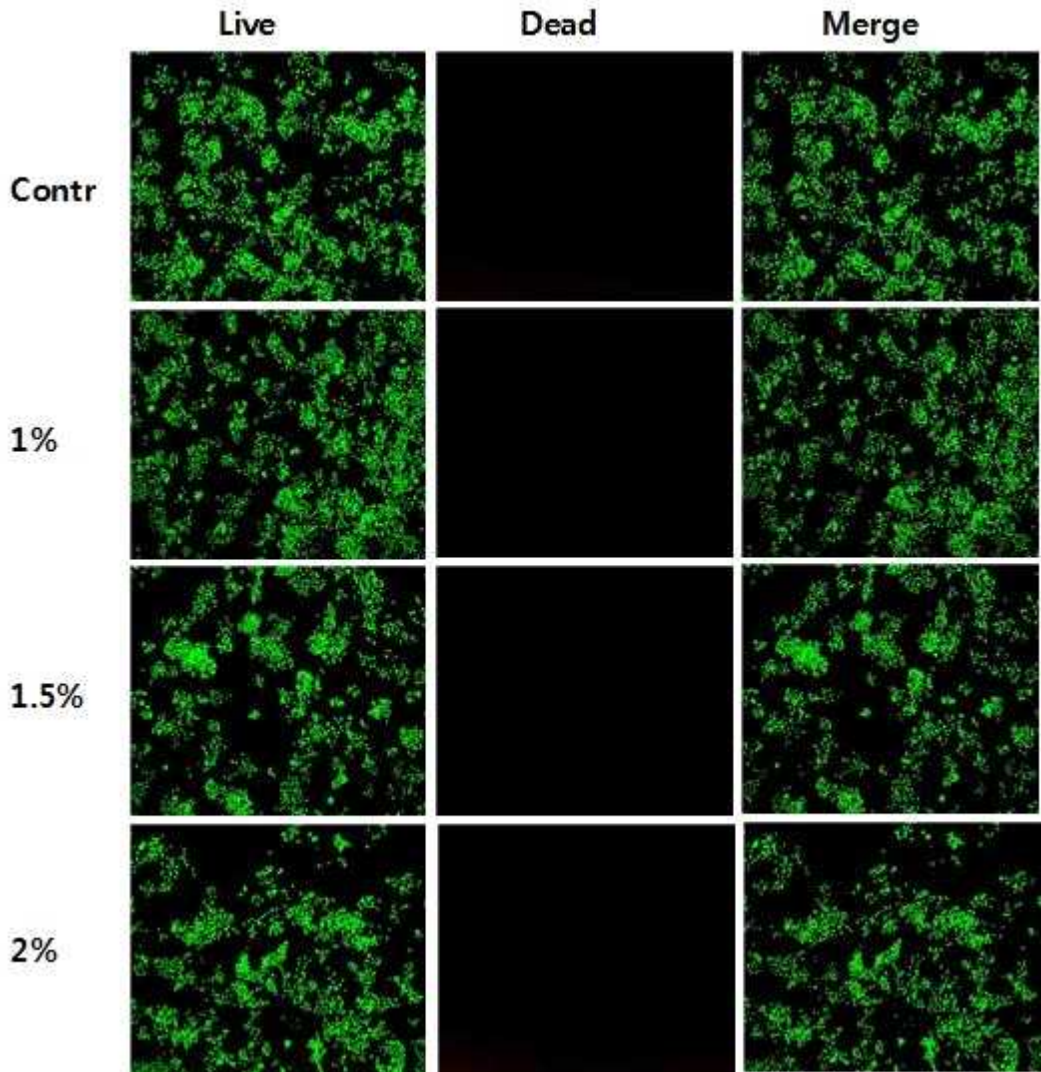


Figure 4. Comparison of fluorescence microscopic images of live and dead human conjunctival epithelial cells(hCJECs) incubated with each concentration of Ultracell[®] eluates by tertiary distilled water (A), ethanol (B), DMSO (C).

(A)



(B)



(C)

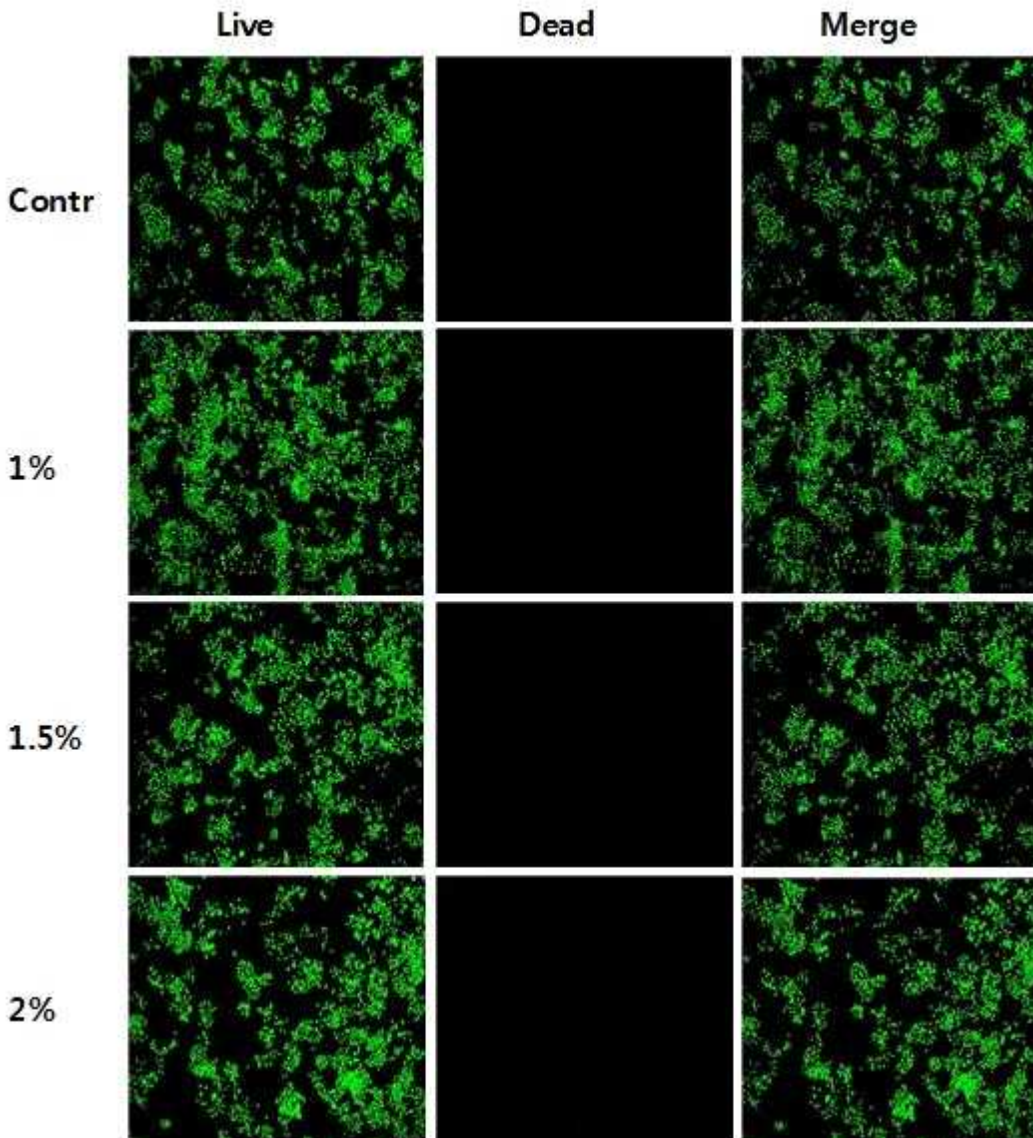
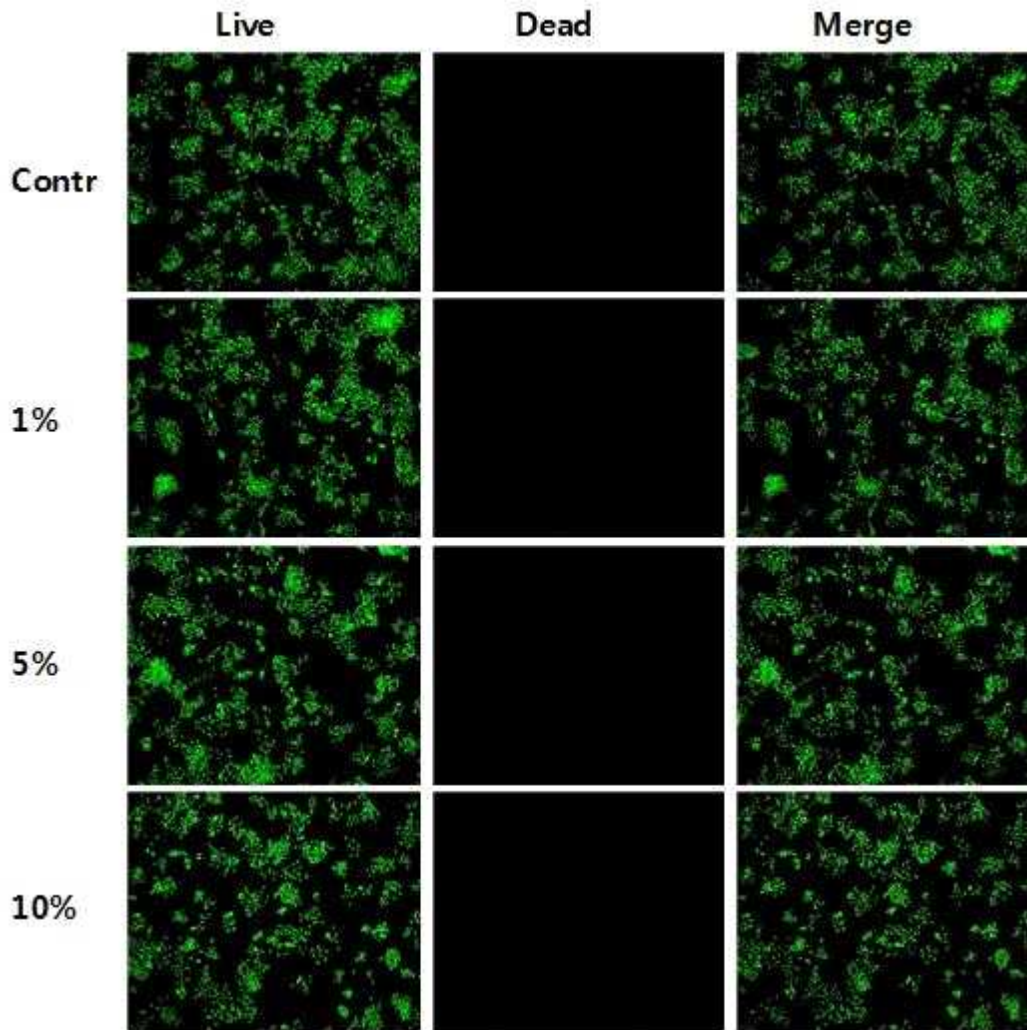
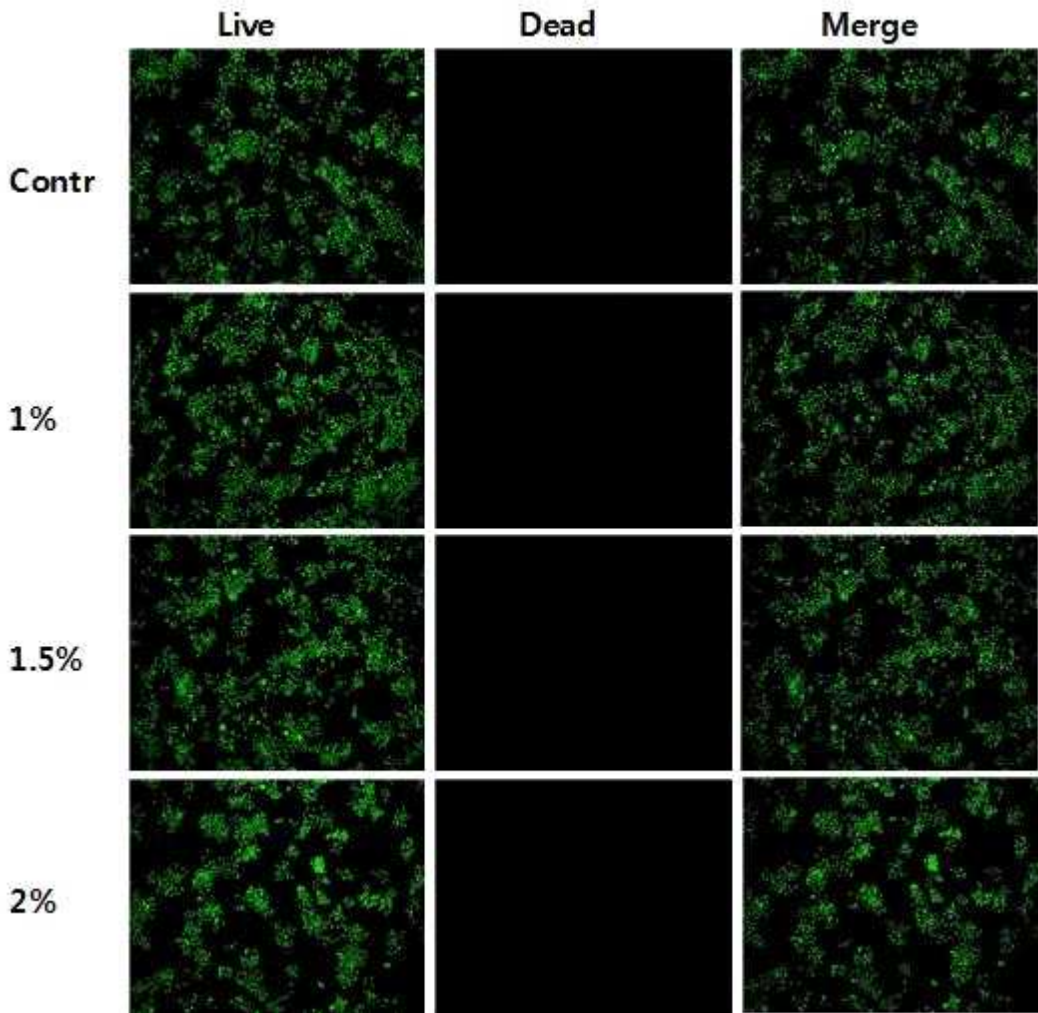


Figure 5. Comparison of fluorescence microscopic images of live and dead human conjunctival epithelial cells(hCJECs) incubated with each concentration of Eyetec-1 eluates by tertiary distilled water (A), ethanol (B), DMSO (C).

(A)



(B)



(C)

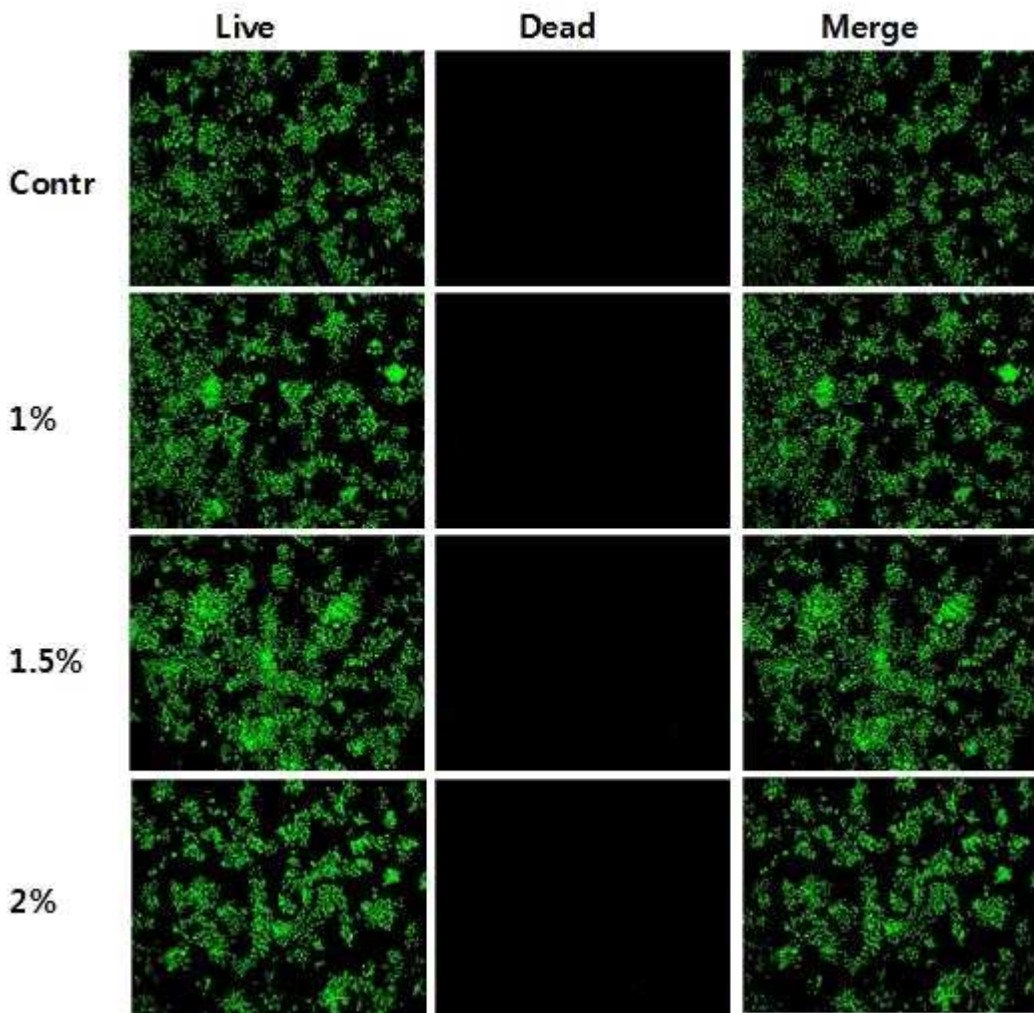


Figure 6. Comparison of fluorescence microscopic images of live and dead human conjunctival epithelial cells(hCJECs) incubated with each concentration of Eyetec-2 eluates by tertiary distilled water (A), ethanol (B), DMSO (C).

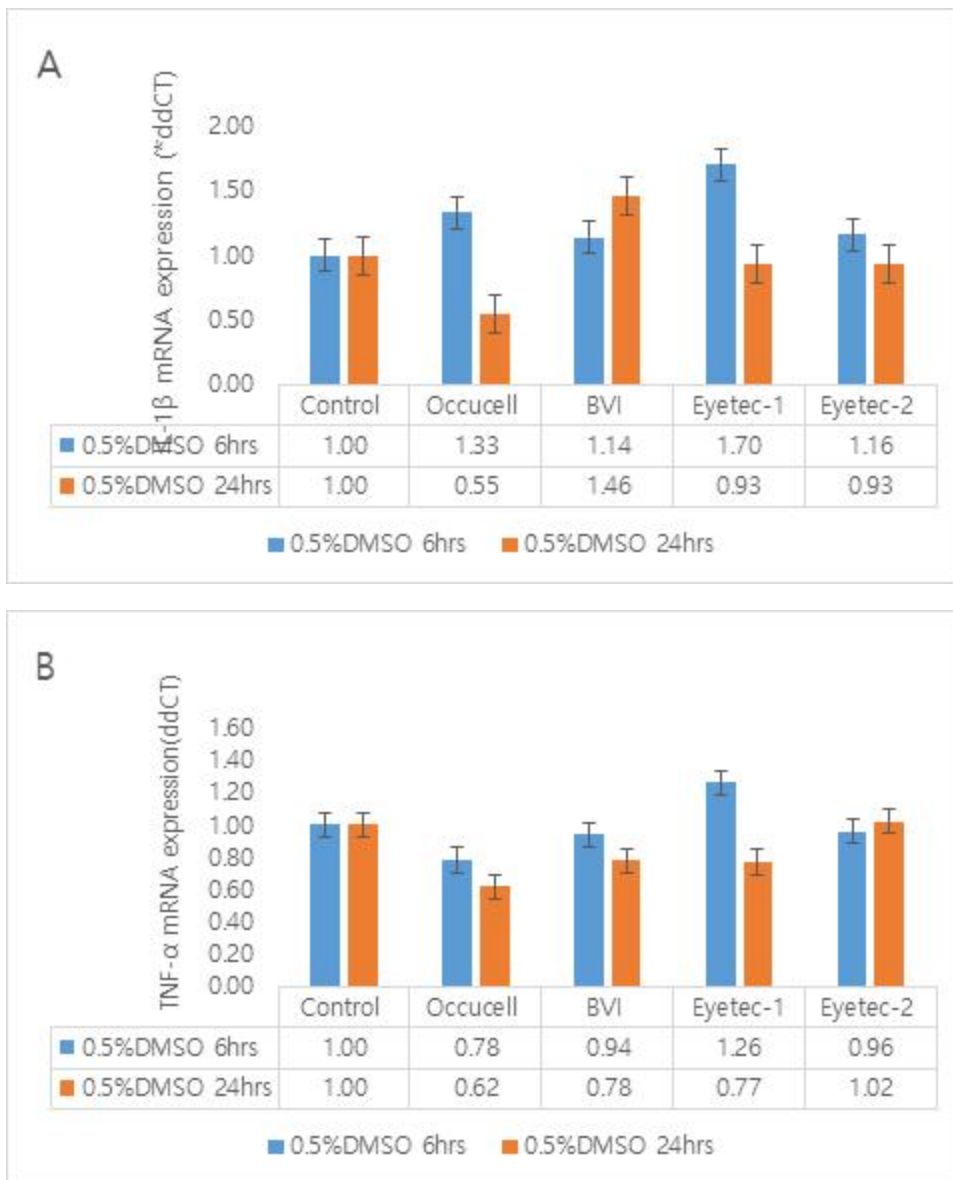


Figure 7. Comparison of the effect of 0.5% dilution eluate for 6hrs & 24hrs in DMSO of four types of ophthalmic sponges on IL-1 β (A), TNF α (B) mRNA expression. The *p*-values were derived from *t*-test. (*Delta-Delta-Ct (ddCt) algorithm is an approximation method to determine relative gene expression with RT-PCR)