

## 섬유주세포에서 국소 탄산탈수효소억제제가 일산화질소의 생성에 미치는 영향에 대한 연구

홍정흠 · 김세은 · 김재우

대구가톨릭대학교 의과대학 안과학교실

**목적:** 섬유주세포에서 국소 탄산탈수효소억제제가 일산화질소의 생성에 미치는 영향과 차이를 알아 보고자 하였다.

**대상과 방법:** 섬유주세포를 일차배양한 후 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 0, 10, 100  $\mu$ M의 도르졸라미드와 브린졸라미드에 각각 3일간 노출시킨 후 Griess assay를 이용하여 일산화질소의 생성량을 측정하였으며, RT-PCR을 이용하여 eNOS mRNA의 발현을 조사하였다.

**결과:** 10, 100  $\mu$ M의 도르졸라미드와 브린졸라미드는 섬유주세포에서 일산화질소의 생성을 유의하게 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), eNOS mRNA의 발현을 증가시켰다. 도르졸라미드가 브린졸라미드에 비해 더 유의하게 일산화질소를 생성하였으며 eNOS mRNA의 발현도 증가시켰다.

**결론:** 섬유주세포에서 국소 탄산탈수효소억제제는 일산화질소의 생성과 발현을 증가시켰으며 도르졸라미드가 브린졸라미드에 비해 더 유의하게 일산화질소의 생성을 증가시켰다. 따라서 국소 탄산탈수효소억제제는 탄산탈수효소저해작용 외에 또 다른 작용기전에 의해 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

〈대한안과학회지 2014;55(3):416-421〉

안과 영역에서 탄산탈수효소의 억제제는 녹내장 치료에 있어 중요한 역할을 한다.<sup>1</sup> 탄산탈수효소억제제의 작용기전은 섬모체에서 방수생성을 억제함으로써 안압을 낮추는 것으로 알려졌다.<sup>2,3</sup> 이러한 안압하강 작용 외에도 탄산탈수효소억제제는 시신경과 망막의 안혈류를 증가시키는 작용도 있는 것으로 알려졌다<sup>4-6</sup> 탄산탈수효소억제제의 혈관 이완 작용은 탄산탈수효소의 억제와는 무관하며,<sup>7</sup> 일산화질소(Nitric oxide, NO)의 생성과 관련이 있다.<sup>8</sup>

섬유주세포는 녹내장에서 방수유출로의 조절에 중요한 역할을 하는데, 섬유주의 변성으로 인해 방수유출로의 저항이 증가되면 개방각녹내장을 유발할 수 있는 기전이 된다.<sup>9,10</sup> 자유유리기인 NO는 세포의 종류에 따라 세포의 생존에 다양한 역할을 나타낼 수 있으며, 평활근 이완효과도 나타내는 것으로 알려졌다. 섬유주세포는 형태학적 연구와 전기생리학적 연구에서 평활근과 유사한 성질을 가진 것으로 알려졌다<sup>11,12</sup> eNOS (endothelial nitric oxide syn-

thase)에서 생산하는 NO는 섬유주를 이완시켜 방수유출을 촉진하는 것으로 알려졌다.<sup>13-15</sup>

따라서 인체의 섬유주세포에서도 방수생성을 억제하는 기전 이외에 탄산탈수효소억제제가 NO의 생성을 촉진시켜 섬유주를 이완시킴으로써 방수유출을 증가시킬 가능성이 있으나 이에 대한 연구는 아직 자세히 되어 있지 않다.

본 연구에서는 사람의 섬유주세포를 일차배양하여 국소 탄산탈수효소억제제가 섬유주세포에서 NO의 생성과 eNOS의 발현에 미치는 영향을 알아보고 임상적으로 사용되고 있는 국소 탄산탈수효소억제제들이 NO의 생성에 미치는 영향에 대한 차이를 비교해 보고자 하였다.

### 대상과 방법

#### 세포배양

안구은행에서 얻은 사후 6시간 이내에 적출한 안구의 앞방각에서 섬유주를 벗겨내어 폴리라이신(Sigma, USA)으로 처리한 배양접시에 옮긴 후 항생제(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 15% 우태아혈청(Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지(DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 초대배양하였다. 섬유주세포가 이식된 조직편 주위로 자라나온 것을 확인한 후 섬유주조직의 이식편을

■ Received: 2013. 7. 19.      ■ Revised: 2013. 9. 17.  
■ Accepted: 2014. 1. 29.  
■ Address reprint requests to Jae Woo Kim, MD, PhD  
Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University  
Medical Center, #33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu  
705-718, Korea  
Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133  
E-mail: jwkim@cu.ac.kr

제거하고 배양을 계속하였으며 세포가 배양접시에 충만해 지면 10% 우태아혈청(Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 배지로 1:3의 비율로 트립신 처리하여 계대배양하였다.

#### 약물처리

상용의 도르졸라미드(Dorzolamide, Trusopt<sup>®</sup>, Merck, Whitehouse Station, NJ, USA)와 브린졸라미드(Brinzolamide, Azopt<sup>®</sup>, Alcon, Fort Worth, Texas, USA)를 이용하여 실험을 시행하였다. 24 well 배양접시에  $2 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 각 well에 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양기에 넣어 세포를 부착시킨 후 배지를 제거하고 나서 혈청이 포함되지 않은 DMEM배지를 이용하여 희석한 도르졸라미드와 브린졸라미드에 각각 3일간 노출시켰다. 이때 eNOS 저해제인 0.5 mM L-NAME (N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma, St. Louis, MO, USA)에도 동시에 노출시켰다.

#### MTT assay와 Griess assay

세포의 생존에 대한 효과는 세포증식과 세포독성의 screening test로 흔히 이용되고 있는 colorimetric test의 일종인 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St Louis, MO, USA) assay를<sup>16,17</sup> 이용하였고 NO의 생성은 Griess assay를<sup>18</sup> 이용하였다. MTT assay는 3일간 각 농도의 도르졸라미드와 브린졸라미드에 노출시킨 세포의 배지에 MTT를 각 well당 100  $\mu$ l씩 투여한 후 4시간 동안 정치배양한 다음 염료용액으로 씻어낸 후 dimethylsulfoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well당 0.5 mL씩 넣어 10분 이상 흔든 다음 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨 spectrophotometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포의 증식정도는 실험군의 값을 약물처리를 하지 않은 대조군의 비로 나누어 백분율로 나타내었다.

Griess assay는 각 농도의 도르졸라미드와 브린졸라미드에 노출시킨 세포의 배지에 동량의 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞은 후 96-well plate에 옮겨 spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma, St Louis, MO, USA)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

#### eNOS mRNA 발현을 측정하기 위한 RT-PCR

섬유주세포에서 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 분리된 RNA에서 eNOS mRNA의 발현을 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 3일간 각

농도의 약물에 노출시킨 후 섬유주세포에서 분리한 RNA와 Oligo dT primer, Nuclease-free water를 혼합하여 만든 RNA denaturation mix를 70°C에 5분간 denaturation 시키고 얼음에 5분간 둔 다음 Prime RT premix (Genet bio, Seoul, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 70°C 10분간 반응시켜 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA에 2XGoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, WI, USA)와 10 pmol의 forward primer (ctg gct ttc cct tcc agt tc, 225 bp), reverse primer (cct tcc aga tta agg cgg ac, 225 bp)를 각각 혼합하여 DNAEngine cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분, 94°C 30초, 54°C 30초, 72°C 30초로 총 30 cycles를 시행한 후 57°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에 전기 영동하여 DNA band를 multi Gauge v2.02 (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

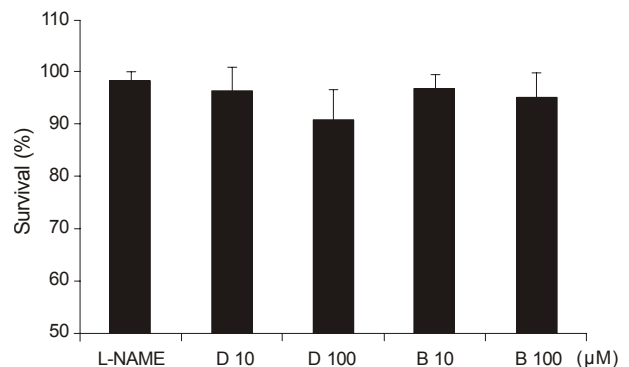
#### 통계적 처리

모든 실험은 3계대에서 5계대 사이의 세포를 이용하였고 대조군은 약물처리를 하지 않은 군으로 3회 이상 시행하였으며, 실험군과 대조군의 비교는 각 농도에 따라 측정된 값을 평균  $\pm$  표준오차로 나타내어 unpaired *t*-test를 사용하여 비교하였으며 유의수준은 0.05%로 정하였다.

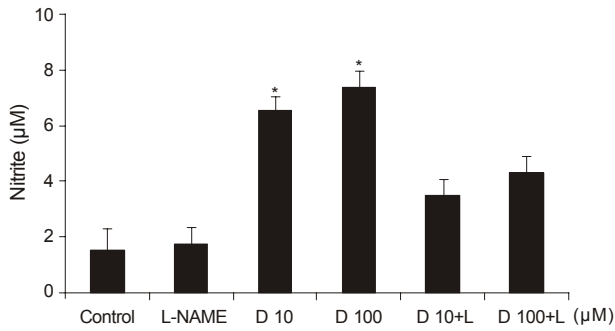
## 결 과

#### 국소 탄산탈수효소억제제가 섬유주세포의 생존에 미치는 영향

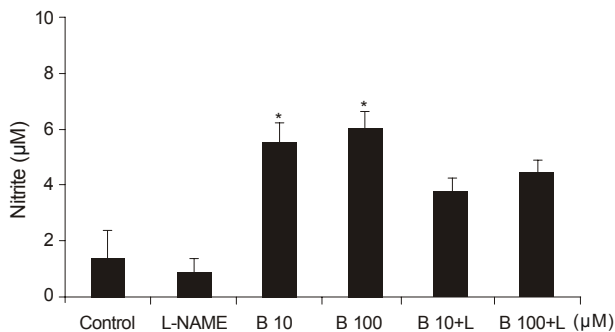
국소 탄산탈수효소억제제를 혈청이 결핍된 상태에서 3일간 섬유주세포에 노출시켰을 때, 도르졸라미드와 브린졸라미드 모두 10, 100  $\mu$ M의 농도에서는 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 세포의 생존을 유의한 영향을 미치지



**Figure 1.** Effects of topical carbonic anhydrase inhibitors on the survival of trabecular meshwork cells. Both dorzolamide (D) and brinzolamide (B) did not affect cellular survival at concentrations of 10 and 100  $\mu$ M ( $p > 0.05$ ).



**Figure 2.** Effects of topical carbonic anhydrase inhibitors on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. Dorzolamide (D) increased NO production in a dose-dependent manner, which was abolished by co-exposed L-NAME (L) (\* $p < 0.05$ ).

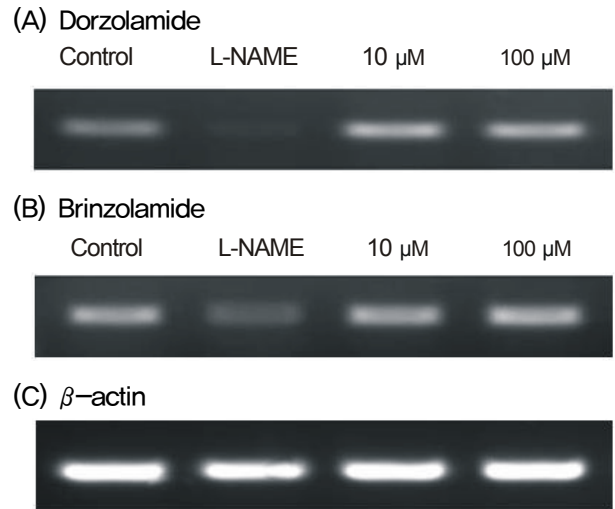


**Figure 3.** Effects of topical carbonic anhydrase inhibitors on the production of nitric oxide in trabecular meshwork cells. Brinzolamide (B) increased NO production in a dose-dependent manner which was abolished by co-exposed L-NAME (L) (\* $p < 0.05$ ).

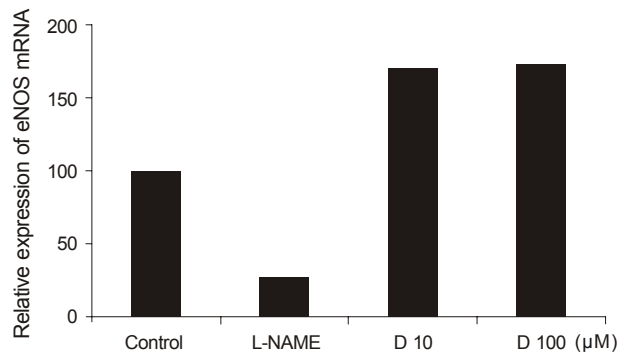
않았으나( $p > 0.05$ ) (Fig. 1), 1000  $\mu\text{M}$ 의 농도에서는 세포의 생존이 두 군 모두 유의하게 감소하였다( $p = 0.001$ ). 따라서 본 실험은 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 10, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 아래의 실험을 진행하였다.

국소 탄산탈수효소억제제가 NO의 생성에 미치는 영향

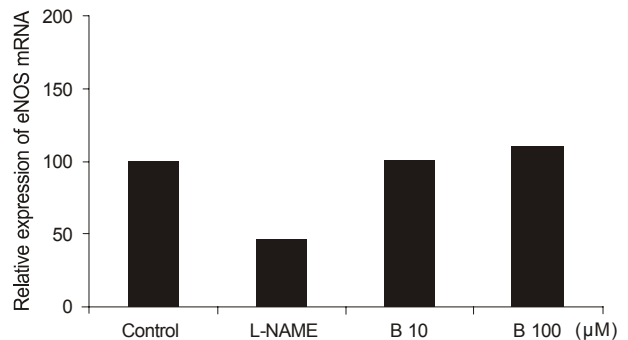
국소 탄산탈수효소억제제는 무혈청 상태에서 3일간 노출시켰을 때 도르졸라미드와 브린졸라미드 모두 약물처리를 하지 않은 대조군에 비하여 농도에 비례하여 배지에서의 nitrite 생성을 각각 유의하게 증가시켰다( $p < 0.05$ ) (Figs. 2, 3). 이때 eNOS제해제인 0.5 mM L-NAME를 동시에 노출시켰을 때 NO의 생성이 억제되었으며 이는 국소 탄산탈수효소억제제에 의한 NO 생성 증가에 eNOS가 관여함을 나타낸다. 이러한 국소 탄산탈수효소억제제에 의한 NO 생성 증가는 브린졸라미드에 비하여 도르졸라미드에서 더 강한 것으로 나타났다.



**Figure 4.** Effects of topical carbonic anhydrase inhibitors on the activity of eNOS in trabecular meshwork cells. Exposure to 10, 100  $\mu\text{M}$  dorzolamide (A) or brinzolamide (B) increased eNOS mRNA expression compared to the non-exposed control.  $\beta$ -actin used as internal standard.



**Figure 5.** Effects on the relative expression of eNOS mRNA after exposure to dorzolamide (D) in trabecular meshwork cells. Exposure to 10, 100  $\mu\text{M}$  dorzolamide increased eNOS mRNA expression compared to the non-exposed control.



**Figure 6.** Effects on the relative expression of eNOS mRNA after exposure to brinzolamide (B) in trabecular meshwork cells. Exposure to 100  $\mu\text{M}$  brinzolamide slightly increased eNOS mRNA expression compared to the non-exposed control.

## 국소 탄산탈수효소억제제가 eNOS mRNA의 발현에 미치는 영향

국소 탄산탈수효소억제제를 3일간 섬유주세포에 노출시켰을 때 대조군에 비하여 eNOS의 활성이 증가되었다(Fig. 4). 도르졸라미드의 경우 대조군에 비해 10  $\mu$ M 농도에서부터 eNOS의 활성이 70% 정도로 증가되었으나 브린졸라미드의 경우 100  $\mu$ M 농도에서 10% 정도의 활성 증가가 나타나 도르졸라미드가 브린졸라미드에 비해 eNOS의 활성에 미치는 영향이 더 큰 것으로 나타났다(Figs. 5, 6).

## 고 찰

본 연구의 결과는 사람의 섬유주세포에서 국소 탄산탈수효소억제제가 eNOS의 활성을 증가시켜 NO의 생성을 촉진하였으며, 도르졸라미드가 브린졸라미드에 비해 NO 생성 효과가 더 크다는 것을 보여주고 있다.

섬모체에 작용하여 방수 생성을 억제하여 안압을 하강시키는 시신경과 망막의 혈류를 개선함으로써 시신경 보호효과를 나타내는 것으로 여겨지고 있다. 이러한 탄산탈수효소억제제는 혈관이완 작용은 NO가 관여할 것이라는 생각하였으나 이산화탄소, pH (acidosis),  $\text{HCO}_3^-$ 와 무관하게 나타나므로 탄산탈수효소억제와는 무관한 것으로 알려졌는데<sup>7</sup> 최근의 연구에서 도르졸라미드에 의한 섬모체동맥의 이완 작용에 NO와 혈관내피세포가 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>19</sup> 따라서 혈관내피세포와 평활근세포의 성질을 지닌 섬유주세포에서도 탄산탈수효소억제제가 작용하여 NO의 생성에 관여할 가능성이 있다.<sup>11,12</sup>

본 연구는 상용의 도르졸라미드(분자량 360.9)와 브린졸라미드(분자량 383.5)를 희석하여 시행하였는데 고농도에서는 두 약물 모두 섬유주세포의 생존을 유의하게 감소시켰으므로 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도인 10, 100  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하였다. 방수 내에서 국소 탄산탈수효소억제제의 농도는 2-20  $\mu$ g/ml로 알려졌다<sup>20,21</sup> 이는 본 연구에서 사용한 10-100  $\mu$ M의 범위에 해당한다.

본 연구의 결과에 따르면 국소 탄산탈수효소억제제는 섬유주세포에서 eNOS의 활성을 증가시키며 NO의 생성을 증가시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 따라서 혈관내피세포의 경우와 유사하게 탄산탈수효소억제제는 섬유주세포에서 NO의 생성을 촉진할 가능성이 있으며 이러한 효과는 평활근세포의 성질을 가진 섬유주세포에 작용하여 섬유주를 이완시킴으로써 방수유출을 증가시킬 가능성이 있을 것임을 시사한다. 그러나 잘 알려진 바와 같이 국소 탄산탈수효소억제제의 주된 작용기전은 방수생성의 억제이므로 임상적 효과에 대해서는 향후 여러 가지 실험 조건이나 기간에

따른 좀더 상세한 연구와 생체 내 실험도 필요할 것으로 생각된다.

아세타졸라미드와 도르졸라미드는 제2형 탄산탈수효소를 억제하며 도르졸라미드가 좀 더 선택적으로 작용한다.<sup>1,22,23</sup> 도르졸라미드는 점안 수일 후에 안구 후반부로 흡수되어 시신경 혈류를 증가시키는 데 이는 혈관 주위 조직에 의해 매개되는 것으로 알려졌다.<sup>24-26</sup> 도르졸라미드의 혈관이완 작용의 기전은 아세타졸라미드와는 다르다. 즉 아세타졸라미드는 주로 혈관의 평활근세포에 직접적으로 작용하며 혈관 주위 조직이 없는 경우 이완작용을 나타내지 않는다.<sup>27</sup> 따라서 탄산탈수효소억제제들은 각각 다른 기전에 의해 혈관이완작용을 나타내는 것으로 생각되며, 탄산탈수효소의 억제와는 무관하게 혈관이완작용을 나타내므로 탄산탈수효소억제제의 또 다른 작용기전에 대해서는 향후 보다 자세한 연구를 요한다.

그러나 상용화된 약제에는 보존제와 그 외 다른 성분들이 함유되어 있으므로 이에 의한 영향을 배제할 수 없다는 것이 본 연구의 제한점이다.<sup>28,29</sup> 따라서 순수한 탄산탈수효소억제제 성분만으로 실험을 시행하여 이를 확인할 필요가 있을 것이다. 또한 본 실험에서 사용한 두 가지 농도 외에 약물의 농도에 따른 eNOS의 활성과 NO의 생성 추이를 좀 더 자세히 살펴볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 섬유주세포에서 국소 탄산탈수효소억제제는 eNOS의 활성을 증가시키고 NO의 생성을 촉진시켰으며 이러한 효과는 도르졸라미드가 브린졸라미드에 비해 더 크게 나타났다. 따라서 국소 탄산탈수효소억제제는 방수생성의 억제 외에 섬유주를 통한 방수유출을 증가시킬 가능성이 있으나 향후 그 기전과 임상적 효과에 대해 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Sugrue MF. The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J Ocul Pharmacol Ther* 1996;12:363-76.
- 2) Sugrue MF. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:87-112.
- 3) Martens-Lobenhoffer J, Banditt P. Clinical pharmacokinetics of dorzolamide. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:197-205.
- 4) Josefsson A, Sigurdsson SB, Bang K, Eysteinnsson T. Dorzolamide induces vasodilatation in isolated pre-contracted bovine retinal arteries. *Exp Eye Res* 2004;78:215-21.
- 5) Stefánsson E, Jensen PK, Eysteinnsson T, et al. Optic nerve oxygen tension in pigs and the effect of carbonic anhydrase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2756-61.
- 6) Pedersen DB, Koch Jensen P, la Cour M, et al. Carbonic anhydrase inhibition increases retinal oxygen tension and dilates retinal

- vessels. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:163-8.
- 7) Torring MS, Holmgaard K, Hesselund A, et al. The vasodilating effect of acetazolamide and dorzolamide involves mechanisms other than carbonic anhydrase inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:345-51.
- 8) Aamand R, Dalsgaard T, Jensen FB, et al. Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: a possible link between metabolic activity and vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H2068-74.
- 9) Alvarado J, Murphy C, Juster R. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 1984;91:564-79.
- 10) Rohen JW, Lütjen-Drecoll E, Flügel C, et al. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 1993;56:683-92.
- 11) Wiederholt M, Dörschner N, Groth J. Effect of diuretics, channel modulators, and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 1997;211:153-60.
- 12) Wiederholt M, Stumpff F. The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption. In: Civan MM, ed. *Current topics in membranes. The eye's aqueous Humor: from secretion to glaucoma*. San Diego: Academic Press, 1998; v. 45. chap. 7.
- 13) Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2515-20.
- 14) Behar-Cohen FF, Goureau O, D'Hermies F, Courtois Y. Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1711-5.
- 15) Dismuke WM, Mbadugha CC, Ellis DZ. NO-induced regulation of human trabecular meshwork cell volume and aqueous humor outflow facility involve the BKCa ion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1378-86.
- 16) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 17) Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3727-9.
- 18) Green, LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of Nitrate, Nitrite and [15N]Nitrate in biologic fluids. *Analytical Biochem* 1982;126:131-8.
- 19) Kringelholz S, Simonsen U, Bek T. Dorzolamide-induced relaxation of intraocular porcine ciliary arteries in vitro depends on nitric oxide and the vascular endothelium. *Curr Eye Res* 2012;37:1107-13.
- 20) Sugrue MF. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:87-112.
- 21) Loftsson T, Jansook P, Stefánsson E. Topical drug delivery to the eye: dorzolamide. *Acta Ophthalmol* 2012;90:603-8.
- 22) Berg JT, Ramanathan S, Gabrielli MG, Swenson ER. Carbonic anhydrase in mammalian vascular smooth muscle. *J Histochem Cytochem* 2004;52:1101-6.
- 23) Kobayashi M, Naito K. Pharmacological profiles of the potent carbonic anhydrase inhibitor dorzolamide hydrochloride, a topical antiglaucoma agent. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2000;115:323-8.
- 24) Martinez A, Gonzalez F, Capeans C, et al. Dorzolamide effect on ocular blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1270-5.
- 25) Costagliola C, Campa C, Parmeggiani F, et al. Effect of 2% dorzolamide on retinal blood flow: a study on juvenile primary open angle glaucoma patients already receiving 0.5% timolol. *Br J Clin Pharmacol* 2007;63:376-9.
- 26) Fuchsjäger-Mayrl G, Wally B, Rainer G, et al. Effect of dorzolamide and timolol on ocular blood flow in patients with primary open angle glaucoma and ocular hypertension. *Br J Ophthalmol* 2005;10:1293-7.
- 27) Kehler AK, Holmgaard K, Hesselund A, et al. Variable involvement of the perivascular retinal tissue in carbonic anhydrase inhibitor-induced relaxation of porcine retinal arterioles in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4688-93.
- 28) Yee RW. The effect of drop vehicle on the efficacy and side effects of topical glaucoma therapy: a review. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:134-9.
- 29) Baudouin C, Labbe A, Liang H, et al. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010;29: 312-34.

=ABSTRACT=

## The Effects of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors on Nitric Oxide Production in Trabecular Meshwork Cells

Jeung Hum Hong, MD, Se Eun Kim, MD, Jae Woo Kim, MD, PhD

*Department of Ophthalmology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, Korea*

**Purpose:** To investigate and compare the effects of topical carbonic anhydrase inhibitors on the production and expression of nitric oxide in cultured human trabecular meshwork cells (HTMC).

**Methods:** Primarily cultured HTMC were exposed to 0, 10, and 100  $\mu$ M dorzolamide and brinzolamide using serum-deprived media for 3 days. Production of nitric oxide was assessed with Griess assay. Expressions of eNOS mRNA were assessed with RT-PCR.

**Results:** Both dorzolamide and brinzolamide increased the production of nitric oxide eNOS activity ( $p < 0.05$ ). Dorzolamide had a more potent effect than brinzolamide on the production of nitric oxide and the expression of eNOS mRNA.

**Conclusions:** Topical carbonic anhydrase inhibitors increased the production of nitric oxide, which was accompanied by increased eNOS activity. Dorzolamide had a more potent effect than brinzolamide on the production of nitric oxide and expression of eNOS mRNA in HTMC. The increased production of nitric oxide by topical carbonic anhydrase inhibitors involves mechanisms other than carbonic anhydrase inhibition.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(3):416-421

**Key Words:** Brinzolamide, Dorzolamide, Nitric oxide, Topical carbonic anhydrase inhibitor, Trabecular meshwork cells

---

Address reprint requests to **Jae Woo Kim, MD, PhD**

Department of Ophthalmology, Daegu Catholic University Medical Center

#33 Duryugongwon-ro 17-gil, Nam-gu, Daegu 705-718, Korea

Tel: 82-53-650-4728, Fax: 82-53-627-0133, E-mail: jwkim@cu.ac.kr