

# 硫醇转移酶对高糖诱导大鼠晶状体氧化应激的保护作用

于 罡, 严 宏

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81070720)

作者单位: (710038) 中国陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院眼科

作者简介: 于罡, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障发病机制。

通讯作者: 严宏, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障发病机制. yhongb@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2014-08-07 修回日期: 2014-10-23

## Protective effects of thioltransferase in rat lens incubated with high glucose

Gang Yu, Hong Yan

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81070720)

Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong Yan. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. yhongb@fmmu.edu.cn

Received: 2014-08-07 Accepted: 2014-10-23

### Abstract

• AIM: To investigate the effect of high glucose on the redox system of the cultured rat lenses *in vitro*, and evaluate the effect of thioltransferase (TTase) against oxidative stress in diabetic cataract.

• METHODS: Lenses were incubated with different concentrations of glucose: control group (5.5 mmol/L), high glucose groups (35.5, 65.5, 95.5 mmol/L) and mannitol control group for 7d. Following incubation, the lenses were evaluated daily using a dissecting microscope. After 7d of incubation, lenses were homogenized in lysis buffer and processed for measurement the activity of TTase, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and the specific value of GSSG/T-GSH.

• RESULTS: The lenses treated with high glucose exhibited mistlike opacity in the early stages, while the lenses of control group remained relatively transparent. With the rise of the concentration of high glucose, the activity of TTase increased and the maximum appeared in 35.5 mmol/L group (1.743±0.20 mU/mg protein,  $P < 0.01$ ). No changes were observed in the mannitol control group ( $P > 0.05$ ). The specific value of GSSG/T-GSH of lenses with high glucose groups increased compared with the control groups, there were 2.89, 2.57 and 2.42 times to the normal control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between each group treated with

high glucose, and the difference was also no significant between the mannitol group and the control group. Compared with the control group, the activities of CAT and SOD decreased in the high glucose treatment groups, the activities of SOD were 0.71, 0.52 and 0.49 times to the normal control group ( $P < 0.05$ ), and the activities of CAT were 0.47, 0.56 and 0.50 times to the normal control group ( $P < 0.05$ ). There was no significantly different between each group treated with high glucose.

• CONCLUSION: The antioxidant system of the lens was activated by the high glucose following the increased activity of TTase, the specific value of GSSG/T-GSH, and the decreased activities of CAT and SOD. The gradually decreased oxidation resistance in the lens may contribute to the development of diabetic cataract.

• KEYWORDS: diabetic cataract; high glucose; lens culture; thioltransferase

Citation: Yu G, Yan H. Protective effects of thioltransferase in rat lens incubated with high glucose. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1927-1930

### 摘要

目的: 观察高浓度葡萄糖对离体大鼠晶状体氧化还原系统的影响, 探讨硫醇转移酶 (Thioltransferase, TTase) 在糖尿病性白内障中抗氧化应激的作用。

方法: 用不同浓度葡萄糖 (35.5, 65.5, 95.5 mmol/L 葡萄糖组以及相应的甘露醇等渗对照组) 体外培养大鼠晶状体 7d, 动态观察晶状体的混浊情况。测定各组晶状体中 TTase、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性, 以及氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 与总谷胱甘肽 (T-GSH) 的比值。

结果: 高糖组晶状体早期就已出现雾状混浊, 而对照组保持相对透明; 在高糖刺激下, TTase 活性增加较正常对照组增加, 并在含 35.5 mmol/L 葡萄糖的高糖组中最高 (1.743±0.20 mU/mg protein,  $P < 0.01$ )。高糖组 GSSG/T-GSH 比值均较正常对照组增加, 分别增加 2.89 倍、2.57 倍和 2.42 倍, 其组间互相比较无明显差异, 相应等渗对照组和正常对照组比较差异不明显; 高糖处理组的 SOD 和 CAT 较正常对照组降低, 其中 SOD 分别为正常对照的 0.71 倍、0.52 倍和 0.49 倍 ( $P < 0.05$ ), CAT 分别为正常对照的 0.47 倍、0.56 倍、0.50 倍 ( $P < 0.05$ ), 不同葡萄糖浓度处理组间差异无显著性。

结论: 高糖环境激活晶状体内的抗氧化系统, 诱导 TTase 活性增加, GSSG/T-GSH 比例增高, CAT, SOD 活性下降, 晶状体抗氧化能力降低是糖尿病性白内障形成的重要机制。

关键词: 糖尿病性白内障; 高糖; 大鼠晶状体培养; 硫醇转移酶

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.03

引用:于罡,严宏. 硫醇转移酶对高糖诱导大鼠晶状体氧化应激的保护作用. 国际眼科杂志 2014;14(11):1927-1930

## 0 引言

硫醇转移酶(Thioltransferase, TTase)又称谷氧还蛋白(Glutaredoxin, GRx),分子量为11.8kD,是体内重要的氧化修复酶,广泛存在于动物各组织细胞胞浆中。TTase主要通过还原谷胱甘肽(GSH)被氧化而形成的二硫化物(PSSG)、调节细胞内巯基平衡、还原脱氢抗坏血酸等方式确保细胞内氧化还原状态的平衡,以维持晶状体透明性。糖尿病性白内障(diabetic cataract)是糖尿病患者的第二大眼部并发症<sup>[1]</sup>,但发病机制不明确。本实验通过建立糖尿病性白内障的离体模型动态观测晶状体混浊程度,并观察高浓度葡萄糖对离体晶状体氧化修复系统的影响,初步探讨TTase在糖尿病性白内障形成中作用,为进一步研究糖尿病性白内障发病机制中氧化损伤和糖基化作用的相关性提供依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物:健康清洁的SPF级SD大鼠40只,雄性,1月龄,体质量207.3±28.11g,由第四军医大学实验动物中心提供。实验动物的使用遵循中国国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。主要试剂及仪器:M199培养基(美国Gibco公司);D-葡萄糖、D-甘露醇、GSH、β-NADPH、HEDS、谷胱甘肽还原酶(美国Sigma公司);SOD、CAT、GSH/T-GSH测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究所)。其余试剂均为国产分析纯。紫外分光光度计(美国Beckman Coulter公司)、解剖显微镜。

### 1.2 方法

**1.2.1 离体晶状体培养** 过量麻醉法处死SD大鼠,取其眼球,用生理盐水洗净眼球表面的血迹,剔除肌肉、筋膜等组织,安尔碘浸泡5min,生理盐水冲洗3次后,将眼球浸入M199培养基中转移至超净台操作。在解剖显微镜下自后极部视神经断端处剪开巩膜,小心娩出晶状体,尽量去除晶状体表面的玻璃体。然后将晶状体放入含100U/mL青霉素和0.1mg/mL链霉素的M199培养基中,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养8h后,弃去混浊晶状体13枚,留取67枚透明、完整晶状体纳入实验。

**1.2.2 糖尿病性白内障模型的建立** 将67只晶状体按随机数字大小分为7组:正常对照组(含5.5mmol/L葡萄糖的M199培养基, n=9),高糖组(共3组:含35.5mmol/L葡萄糖的M199培养基, n=10;含65.5mmol/L葡萄糖的M199培养基, n=10;含95.5mmol/L葡萄糖的M199培养基, n=10),等渗组(共3组:含35.5mmol/L甘露醇的M199培养基, n=10;含65.5mmol/L甘露醇的M199培养基, n=10;含95.5mmol/L甘露醇的M199培养基, n=8)分别放入无菌的24孔板中,于37℃,5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,每日换液。

**1.2.3 离体晶状体混浊程度的动态观察** 利用解剖显微镜,每日观察,记录晶状体混浊程度。参考Mathur等<sup>[2]</sup>离体晶状体混浊的分级方法,将晶状体混浊程度分为0~V级,并评分以便统计分析(表1)。

表1 离体晶状体混浊程度评级

分级	分级标准	分数
0	透明的晶状体	0
I	晶状体呈雾状混浊	1
II	晶状体皮质和核之间出现可见分界	2
III	轻度晶状体核混浊	3
IV	重度晶状体核混浊	4
V	晶状体完全混浊	5

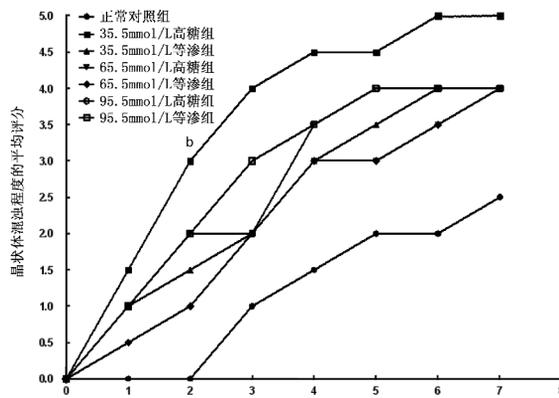


图1 不同高糖浓度孵育晶状体的混浊程度变化<sup>b</sup> P<0.01 vs 正常处理组。

**1.2.4 TTase活性的测定** GSSG在谷胱甘肽还原酶的催化下,由NADPH供氢,还原成GSH,NADPH因消耗而减少。通过分光光度计检测30℃条件下,1min内NADPH在340nm波长处吸光度值的降低,可用来表示TTase的活性,具体步骤参考Raghavachari等<sup>[3]</sup>采用的方法。

**1.2.5 其他酶活性的测定** 晶状体孵育7d后,用PBS漂洗晶状体,将晶状体用滤纸吸干水分后电子天平称量并记录。按重量体积比1:9加入4℃生理盐水,冰浴条件下于玻璃匀浆器内匀浆15min,4℃,3500r/min离心10min,取上清液。按试剂盒说明书测定晶状体中T-GSH、GSSG、CAT以及SOD酶活性,其中还原型GSH=T-GSH-2×GSSG。各酶活测定均严格按试剂盒说明操作。

统计学分析:采用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析。各组不同级别晶状体混浊枚数比较采用等级资料差异比较的Kruskal-Wallis H检验。TTase、GSSG/T-GSH、SOD、CAT用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计资料的One-way ANOVA分析,组间两两比较采用SNK-q检验, P<0.05认为差异有统计学意义,各实验均重复3次。

## 2 结果

**2.1 晶状体混浊情况的动态观察结果** 随孵育时间的延长,各组的混浊程度均有加重。培养1d的高糖组,在显微镜下可见部分晶状体呈雾状混浊,2d部分晶状体皮质和核之间出现分界,大多数晶状体呈雾状混浊,3d出现轻度晶状体核混浊,6d出现重度晶状体核混浊,7d大部分晶状体出现核混浊,部分晶状体完全混浊。等渗组大部分晶状体可保持3d透明,4d开始有少量晶状体皮质和核之间出现分界。正常对照组大多数保持相对透明,4d开始有少量雾状混浊,7d有少量晶状体皮质和核之间出现分界。从培养2d起,高糖组和相应的等渗组、正常对照组间混浊程度开始有较显著的差异(P<0.01),高糖组晶状体出现雾状混浊时间提前(P<0.05,图1)。

表2 不同浓度葡萄糖孵育大鼠晶状体 TTase 活性和 GSSG/T-GSH 比值及 SOD 和 CAT 含量比较

组别	TTase(mU/mg protein)	GSSG/T-GSH(%)	SOD(mU/mg protein)	CAT(mU/mg protein)	$\bar{x} \pm s$
正常对照组	0.87±0.25	10.51±2.56	25.38±4.16	5.47±0.53	
35.5mmol/L 高糖组	1.74±0.20 <sup>b</sup>	30.41±6.09 <sup>a</sup>	17.88±3.96 <sup>a</sup>	2.57±0.66 <sup>a</sup>	
35.5mmol/L 等渗组	0.79±0.19	16.68±4.73	21.65±3.11	4.46±1.18	
65.5mmol/L 高糖组	1.49±0.09 <sup>a</sup>	26.99±7.19 <sup>a</sup>	13.31±3.39 <sup>b</sup>	2.79±1.77 <sup>a</sup>	
65.5mmol/L 等渗组	0.90±0.15	16.22±5.39	22.87±4.55	4.30±0.68	
95.5mmol/L 高糖组	1.39±0.17 <sup>a</sup>	25.39±8.83 <sup>a</sup>	12.55±6.27 <sup>b</sup>	2.74±0.98 <sup>a</sup>	
95.5mmol/L 等渗组	1.08±0.46	19.78±7.52	20.98±4.44	4.17±0.38	

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

## 2.2 酶活性的检测

### 2.2.1 不同浓度葡萄糖孵育对晶状体 TTase 活性的影响

经过 7d 高糖培养后,测定晶状体内 TTase 活性结果发现在高糖刺激后,TTase 活性较正常对照组升高,在 35.5mmol/L 葡萄糖组中最高(1.743±0.20mU/mg protein,  $P < 0.01$ ),随糖浓度的增高略有下降,甘露醇等渗组与正常对照组相比 TTase 活性无明显变化( $P > 0.05$ ),详见表 2。

### 2.2.2 不同浓度葡萄糖孵育对晶状体 GSSG/T-GSH 和 SOD 及 CAT 的影响

各组晶状体中 GSSG/T-GSH、SOD 及 CAT 含量比较见表 2,结果发现高糖组 GSSG/T-GSH 比值均较正常对照组增加,分别为正常组的 2.89 倍、2.57 倍和 2.42 倍( $P < 0.05$ ),且 35.5mmol/L 高糖组增加最为明显(30.41%±6.1%),高糖组 3 组间比较并无明显差异( $P > 0.05$ );相应的高渗组 GSSG/T-GSH 比值虽也有增加,但与正常对照组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。测定晶状体 SOD 和 CAT 含量结果显示,高糖组与正常对照组相比均降低,SOD 分别为正常对照组的 0.71 倍( $P < 0.05$ )、0.52 倍和 0.49 倍( $P < 0.01$ ),CAT 分别为正常对照组的 0.47 倍、0.56 倍、0.50 倍( $P < 0.05$ ),不同葡萄糖浓度处理组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),相应的高渗组晶状体 SOD 和 CAT 含量与正常对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

1974 年 Askelöf 等<sup>[4]</sup>首次在大鼠肝组织中发现 TTase 后,1996 年 Raghavachari 等<sup>[3]</sup>又首次报道牛晶状体中存在 TTase,发现不同物种晶状体中 TTase 的活性类似。TTase 主要集中分布在易受到氧化损伤的眼前节,在晶状体上皮细胞中的活性远大于晶状体皮质和核<sup>[5]</sup>。在生理条件下,晶状体处于氧化还原动态平衡中,其内部的抗氧化系统发挥着阻止白内障发生的关键作用<sup>[6]</sup>,以确保晶状体在各种氧化因素的长期作用下能保持透明。晶状体内高水平的 GSH 是其抗氧化损伤的重要防线,各种修复酶则是另一道重要防线。TTase 作为重要修复酶之一<sup>[7]</sup>,在抵抗氧化应激、调节晶状体的氧化还原状态方面的作用非常重要。

糖尿病的各种并发症与高血糖状态有着密不可分的联系。高糖可导致高渗透压与诱发糖基化,激活氧化应激反应,对组织造成严重损害。那么高糖是否参与了糖尿病性白内障的形成,TTase 是否参与了高糖诱导的氧化损伤修复,发挥保护性作用未有报道。本实验结果发现高糖组在孵育早期就已出现雾状混浊,第 7d 雾状混浊较明显,而对照组保持相对透明,提示高糖能诱导晶状体发生氧化应激反应,加剧晶状体混浊的发生,继而发生糖尿病性白内障。随后观察不同浓度高糖对 TTase 活性的影响,结果显示高糖组 TTase 活性增高,虽随糖浓度增高有所下降,但

仍高于正常组。Raghavachari 等<sup>[8]</sup>研究报道暴露于同一浓度下培养的人晶状体上皮细胞,TTase mRNA 的表达随时间的推移呈现先升后降。Moon 等<sup>[9]</sup>发现用不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下培养的猪晶状体,弱 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激下 TTase 活性缓慢增加,强 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激下酶活性快速增加后稳定下降。结果与本实验结果一致,提示高糖诱发的氧化应激反应能够使 TTase 表达上调、活性增加,但随着糖浓度增高引发更剧烈的氧化应激反应,活性有所降低。说明在一定程度的氧化应激下,TTase 在氧化损伤的早期阶段具有保护晶状体蛋白和酶的重要功能。

晶状体内 GSH 能够还原氧化物。当细胞对抗氧化应激时,GSH 被氧化形成氧化型 GSSG。通过测定 GSSG/T-GSH,可反映细胞的氧化状态<sup>[10]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究发现,经紫外线 B 照射诱导小鼠发生白内障后,小鼠晶状体中 GSSG 积聚增加,且随年龄增大而逐渐加重。本实验结果与其相似,高糖引起晶状体 GSH 含量降低,GSSG/T-GSH 的比例显著增加。提示高糖诱发的糖基化作用使晶状体细胞内的氧化/抗氧化稳态的失衡,GSH 大量消耗,GSSG 含量相应增加,晶状体抗氧化能力逐渐下降。

SOD 和 CAT 活性可反映晶状体上皮细胞的抗氧化活性和机体清除氧自由基的能力<sup>[12]</sup>,Hashim 等<sup>[13]</sup>研究发现在糖尿病性白内障大鼠或 2 型糖尿病性白内障患者的晶状体中,GSH、SOD 和 CAT 含量明显低于对照组,脂质过氧化产物高于对照组。本实验有类似结果,随葡萄糖浓度的增加,晶状体混浊程度加重,CAT、SOD 活性均显著下降,相应的 TTase 的活性增高。说明在高糖激活晶状体内抗氧化应激系统,在 TTase 的修复作用下,抗氧化酶并没有消耗殆尽,仍有部分活性以抵抗氧化损伤。

综上所述,高糖环境可以激活晶状体内的抗氧化系统,使晶状体发生抗氧化应激反应,GSSG/T-GSH 比例增高,CAT、SOD 部分失活,晶状体抗氧化能力下降。而 TTase 表达适应性增加、酶活性增高,提示 TTase 可能参与了对抗高糖诱导的氧化应激,在一定程度上维持晶状体细胞内氧化还原状态平衡,发挥着抵抗氧化应激、调节晶状体氧化还原稳态的保护作用,但其作用机制及调控机制还有待深入研究。

## 参考文献

- Dedov I, Maslova O, Suntsov Y, et al. Prevalence of diabetic retinopathy and cataract in adult patients with type 1 and type 2 diabetes in Russia. *Rev Diabet Stud* 2009;6(2):124-129
- Mathur P, Gupta SK, Wegener AR, et al. Comparison of various calpain inhibitors in reduction of light scattering, protein precipitation and nuclear cataract *in vitro*. *Curr Eye Res* 2000;21(6):926-933
- Raghavachari N, Lou MF. Evidence for the presence of thioltransferase

in the lens. *Exp Eye Res* 1996;63(4):433-441

4 Askelöf P, Axelsson K, Eriksson S, et al. Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide interchange. Thioltransferases rather than transhydrogenases. *FEBS Lett* 1974;38(3):263-267

5 Wu F, Wang GM, Raghavachari N, et al. Distribution of thioltransferase (glutaredoxin) in ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(3):476-480

6 Xing KY, Lou MF. Effect of age on the thioltransferase (glutaredoxin) and thioredoxin systems in the human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6598-6604

7 Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(5):657-682

8 Raghavachari N, Krysan K, Xing K, et al. Regulation of thioltransferase expression in human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(5):1002-1008

9 Moon S, Fernando MR, Lou MF. Induction of thioltransferase and thioredoxin/thioredoxin reductase systems in cultured porcine lenses under oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(10):3783-3789

10 Ganea E, Harding JJ. Glutathione-related enzymes and the eye. *Curr Eye Res* 2006;31(1):1

11 Zhang J, Yan H, Löfgren S, et al. Ultraviolet radiation-induced cataract in mice: the effect of age and the potential biochemical mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(11):7276-7285

12 Bala K, Tripathy BC, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006;7(2):81-89

13 Hashim Z, Zarina S. Antioxidant markers in human senile and diabetic cataractous lenses. *J Coll Physicians Surg Pak* 2006;16(10):637-640

## 2014年眼科杂志 SCI 影响因子排名

Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	Impact Factor	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	Impact Factor
1	<a href="#">PROG RETIN EYE RES</a>	9.897	30	<a href="#">EYE CONTACT LENS</a>	1.679
2	<a href="#">OPHTHALMOLOGY</a>	6.170	31	<a href="#">VISUAL NEUROSCI</a>	1.676
3	<a href="#">ARCH OPHTHALMOL-CHIC</a>	4.488	32	<a href="#">CURR EYE RES</a>	1.663
4	<a href="#">OCUL SURF</a>	4.212	33	<a href="#">OCUL IMMUNOL INFLAMM</a>	1.440
5	<a href="#">AM J OPHTHALMOL</a>	4.021	34	<a href="#">J OCUL PHARMACOL TH</a>	1.420
6	<a href="#">INVEST OPHTH VIS SCI</a>	3.661	35	<a href="#">OPHTHALMIC RES</a>	1.376
7	<a href="#">SURV OPHTHALMOL</a>	3.507	36	<a href="#">OPTOMETRY</a>	1.339
8	<a href="#">RETINA-J RET VIT DIS</a>	3.177	37	<a href="#">OPHTHAL SURG LAS IM</a>	1.318
9	<a href="#">EXP EYE RES</a>	3.017	38	<a href="#">CAN J OPHTHALMOL</a>	1.299
10	<a href="#">BRIT J OPHTHALMOL</a>	2.809	39	<a href="#">OPHTHAL EPIDEMIOLOG</a>	1.271
11	<a href="#">J REFRACT SURG</a>	2.781	40	<a href="#">CLIN EXP OPTOM</a>	1.256
12	<a href="#">J VISION</a>	2.727	41	<a href="#">OPHTHALMIC GENET</a>	1.233
13	<a href="#">OPHTHAL PHYSIOL OPT</a>	2.664	42	<a href="#">SEMIN OPHTHALMOL</a>	1.196
14	<a href="#">CURR OPIN OPHTHALMOL</a>	2.638	43	<a href="#">J AAPOS</a>	1.142
15	<a href="#">J CATARACT REFR SURG</a>	2.552	44	<a href="#">DOC OPHTHALMOL</a>	1.108
16	<a href="#">ACTA OPHTHALMOL</a>	2.512	45	<a href="#">BMC OPHTHALMOL</a>	1.075
17	<a href="#">J GLAUCOMA</a>	2.427	46	<a href="#">EUR J OPHTHALMOL</a>	1.058
18	<a href="#">VISION RES</a>	2.381	47	<a href="#">J EYE MOVEMENT RES</a>	1.056
19	<a href="#">CORNEA</a>	2.360	48	<a href="#">INDIAN J OPHTHALMOL</a>	0.927
20	<a href="#">GRAEF ARCH CLIN EXP</a>	2.333	49	<a href="#">CUTAN OCUL TOXICOL</a>	0.920
21	<a href="#">MOL VIS</a>	2.245	50	<a href="#">OPHTHAL PLAST RECONS</a>	0.914
22	<a href="#">OPTOMETRY VISION SCI</a>	2.038	51	<a href="#">J PEDIAT OPHTH STRAB</a>	0.731
23	<a href="#">CONTACT LENS ANTERIO</a>	2.000	52	<a href="#">OPHTHALMOLOGE</a>	0.719
24	<a href="#">CLIN EXP OPHTHALMOL</a>	1.953	53	<a href="#">KLIN MONATSBL AUGENH</a>	0.665
25	<a href="#">J OPHTHALMOL</a>	1.935	54	<a href="#">INT J OPHTHALMOL-CHI</a>	0.500
26	<a href="#">EYE</a>	1.897	55	<a href="#">ARQ BRAS OFTALMOL</a>	0.440
27	<a href="#">OPHTHALMOLOGICA</a>	1.867	56	<a href="#">J FR OPHTALMOL</a>	0.361
28	<a href="#">J NEURO-OPHTHALMOL</a>	1.807	57	<a href="#">REV BRAS OFTALMOL</a>	0.163
29	<a href="#">JPN J OPHTHALMOL</a>	1.795	58	<a href="#">JAMA OPHTHALMOL</a>	