

# 增殖性视网膜病变与血管新生的研究进展

王海红<sup>1</sup>, 沈伟<sup>2</sup>, 王智<sup>1</sup>

基金项目: 中国上海市卫生局科研基金资助项目 (No. 2009006)  
作者单位: <sup>1</sup> (200540) 中国上海市, 复旦大学附属金山医院眼科金山区眼病防治所; <sup>2</sup> (200040) 中国上海市, 复旦大学附属华山医院心内科  
作者简介: 王海红, 女, 本科, 研究方向: 眼病防治。  
通讯作者: 王智, 男, 副主任医师, 副主任, 研究方向: 眼底病、糖尿病视网膜病变。 wangzhi100@hotmail. com  
收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-09

## Advances in researches for the relationship between proliferative retinopathies and angiogenesis

Hai-Hong Wang<sup>1</sup>, Wei Shen<sup>2</sup>, Zhi Wang<sup>1</sup>

**Foundation item:** The City Health Administration Project of Shanghai, China (No. 2009006)

<sup>1</sup> Department of Ophthalmology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China; <sup>2</sup> Department of Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

**Correspondence to:** Zhi Wang. Department of Ophthalmology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China. wangzhi100@hotmail. com

Received: 2010-08-10 Accepted: 2010-09-09

### Abstract

• Proliferative retinopathies such as proliferative diabetic retinopathy (PDR) and retinopathy of prematurity (ROP), are the leading causes of blindness. These pathologies are characterized by excessive pre-retinal blood vessel growth that can ultimately lead to a fibrous scar formation and culminate in retinal detachment. This abnormal and disproportionate hyper-vascularization is a compensatory mechanism to overcome an earlier phase of microvessel degeneration and reinstate metabolic equilibrium to the hypoxic retina. To date, the treatment modalities to counter these diseases largely rely on invasive surgical interventions. In this review, tightly around the angiogenesis, we discuss the current views on mechanisms and available treatments and present future strategies to tackle these diseases.

• **KEYWORDS:** retina; angiogenesis; oxygen toxicity; metabolism; inflammation

Wang HH, Shen W, Wang Z. Advances in researches for the relationship between proliferative retinopathies and angiogenesis. *Int J Ophthalmol* (Guoji Yanke Zazhi) 2010;10(10):1933-1936

### 摘要

增殖性视网膜病变, 如增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR), 早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 等, 是致盲的主要原因。这类疾病的病理特点是视网膜前血管过度生长, 引发纤维瘢痕形成, 最终导致视网膜脱离。这种不正常和不成比例的血管过度生成是一种代偿机制, 用以克服早期阶段的微血管退化和恢复缺氧视网膜的代谢平衡。迄今为止, 治疗方式很大程度上依赖于外科侵入性干预。在本篇综述中, 我们以血管新生为中心, 对这类疾病的发生机制和治疗策略进行深入讨论。

**关键词:** 视网膜; 血管新生; 氧中毒; 代谢; 炎症

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.029

王海红, 沈伟, 王智. 增殖性视网膜病变与血管新生的研究进展. 国际眼科杂志 2010;10(10):1933-1936

### 0 引言

无论是肿瘤生长还是致盲性疾病的病理生理发生过程中, 存在血管网络不受抑制的反常生长方式。Kempen等<sup>[1]</sup>发现, 在普通人群中糖尿病的发病率为7%, 而50%糖尿病患者25a后会发展成不同程度的PDR, 是导致工作年龄致盲的最主要原因。对ROP而言, 有11%婴儿为早产儿; 一项发达国家失明注册研究提示, 有6%~18%的致盲患者归因于这一疾病<sup>[2]</sup>。目前, 增殖性视网膜病变已经成为医疗保健系统的一项重要负担之一, 大大降低了患者的生活质量。尽管PDR和ROP在疾病起源位置上存在不同, 血管异常生长的初始刺激不同, 但是它们均是二相性疾病。第一阶段为血管衰退、血管停止生长, 致使视网膜缺氧; 第二阶段为血管异常生长, 以克服组织的缺氧状态。它们均具有血管新生的共同要素, 即视网膜内部缺氧边缘处血管异常生长和增殖, 并误导进入玻璃体腔。在本篇综述中, 我们以血管新生为切入点, 对增殖性视网膜病变的发生机制和治疗策略进行深入讨论。

### 1 氧中毒

在发达国家中, 由于广泛给予早产儿氧疗, 使得ROP发病率明显增高。氧疗和ROP之间的直接联系是之后才被证实的。尽管有关氧中毒概念的提出可追溯至1770年代, 但其有害作用的机制阐明却仅始于25a前。重要的是, 对于正在发育的组织系统, 如: 大脑、肺、特别是眼睛, 高氧的毒害作用会对组织内皮细胞产生严重影响。对于早产儿而言, 由于氧疗和缺乏抗氧化剂等因素的存在, 使婴儿视网膜更易受损害<sup>[3]</sup>。

**1.1 活性氧** 氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 的产生应包含所有细胞有氧代谢的组分。氧自由基主要来源于氧分子的不完全电子传递, 为NADPH氧化酶、环加氧

酶(cyclooxygenase, COX)和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)等产生的生物学中间体。由于其外壳存在不成对价电子,所以ROS极具活性,它可以与其它分子或原子团发生快速反应,形成稳定的电子构型。在高氧条件下,ROS对生物学组织器官来说是十分有害的,因为它可以破坏富含脂质的细胞组分、损伤DNA和氧化氨基酸。在这方面,ROS被认为是视网膜血管的调节者。由于视网膜自身调节能力受损、高氧化代谢率和游离铁大量堆积,会强化和促进氧化反应,因此早产儿视网膜对ROS的易感性显得尤为突出。在成熟的视网膜中,抗氧化剂如维生素C和E, Cu-Zn超氧化物歧化酶、金属硫蛋白、血红素氧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化酶等,它们共同对抗ROS;但在未成熟的视网膜中抗氧化剂水平是降低的,会使预后更为恶化<sup>[3]</sup>。尽管ROS可以通过增加血栓素等缩血管物质来干扰眼部血流动力学变化,但是其被人们所认知的有害作用主要是对细胞膜多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)的脂质过氧化作用。这一作用会使细胞膜流动性下降,最终导致细胞膜功能丧失。因为大约20%视网膜干重由脂类(富含PUFAs)组成,所以很容易受到氧中毒的影响。有趣的是,很难解释ROS对内皮细胞的毒性作用,却很少影响到平滑肌细胞、星状细胞、周细胞和神经元<sup>[3,4]</sup>。

**1.2 氧调节因素** 为组织递送产生能量所需的氧气和营养物是脉管系统的基本作用。可以肯定的是,当组织灌注不足时,组织器官会通过有效代谢驱动和氧敏感机制来促进毛细血管生长<sup>[4,5]</sup>。低氧诱导转录因子(hypoxia-inducible transcription factor, HIF)可能是解释氧敏感分子调节机制的最佳途径。HIF一旦被激活,会促进产能酶(如:糖酵解相关酶等)的合成,刺激血管生成因子的产生,进而引发局部毛细血管生长。总体来看,HIF能够驱使60多种基因的转录,从而提升组织对低氧环境的适应能力<sup>[6,7]</sup>。当组织中血管生长时,最初的缺氧刺激会被减弱。当氧水平升高时,HIF会被降解,其转录产物也会被抑制。Chen等<sup>[8]</sup>认为,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和红细胞生成素(erythropoietin, Epo)是受HIF调控的血管生成因子,它们对视网膜血管生长及其动态平衡的维持至关重要。在整个胚胎发育过程中,VEGF扮演着血管生成的核心作用。在视网膜神经元分化和代谢活动增加时,血管生长对组织缺氧的最初反应,主要是通过星形细胞和类神经节细胞产生的VEGF来完成。当缺氧或贫血时,肾脏会产生Epo以刺激红细胞生成;而在高氧状态下,VEGF和Epo水平会明显下降。在血管衰退阶段,VEGF或Epo对细胞保护和视网膜血管床维持起到决定性作用<sup>[9]</sup>。

## 2 发病机制(第一阶段):血管变性

**2.1 糖尿病视网膜病变** 早期的病理表现为视网膜血管进行性衰退。血管通透性的逐渐增加,致使黄斑水肿,导致PDR的形成。血管病变表现为微动脉瘤、周细胞丢失和基膜肥厚。尽管糖基化终末产物、蛋白激酶C激活和急性发病初期的胰岛素强化治疗与DR的恶化有关,但这一疾病血管病变表型的相关机制仍然难以确定。胰岛素抵抗和高胰岛素血症是血管性疾病的重要危险因素,但糖代谢障碍与内皮损伤之间的相互关系仍然难以明确。事

实上,胰岛素信号通路的紊乱会对内皮产生直接的负面影响。例如,Wheatcroft等<sup>[10]</sup>研究认为,在生理浓度时,胰岛素具有舒张血管的作用,从而影响局部血流,其部分原因是由于胰岛素激发一氧化氮(nitric oxide, NO)的升高和内皮缩血管肽-1(endothelin-1, ET-1)的降低。相反,在胰岛素抵抗的背景下,NO的反应性降低,同时伴有ET-1的升高。由此产生的结果是增加血管收缩和减少毛细血管生成(尽管这一结果尚未在视网膜血管的研究中证实),最终会进一步导致组织葡萄糖水平失控和内皮功能恶化。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)具有慢性炎症疾病的许多突出特征,越来越多的研究提示炎症介质在DR相关的血管变性和血管新生中发挥作用<sup>[11]</sup>。在疾病的早期阶段,这些炎症介质会增加血管的通透性,促进白细胞浸润。随着炎症的持续,一些细胞因子可能会加速血管丢失。例如,糖尿病患者的视网膜中促炎细胞因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )水平是增加的,而且IL-1 $\beta$ 还可以通过激活NF- $\kappa$ B,加速视网膜毛细血管细胞凋亡,从而参与毛细血管的衰退机制。Kowluru等<sup>[12]</sup>的相关研究提示,在高糖条件下这一过程会变得更为严重。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是另一促炎细胞因子,与DR早期病变相关。它参与上调黏附分子、招募白细胞和单核细胞、放大免疫反应等炎症过程。Navarro等<sup>[13]</sup>的研究发现,TNF- $\alpha$ 还可以通过TNF-R1受体或Fas受体来诱导细胞凋亡,而且还参与DR的血管闭塞病理阶段。

**2.2 ROP** 对缺血性视网膜病变的认识,源于对ROP病因和后果的研究。这些研究大部分是基于类似这一疾病的动物模型之上的。尽管ROP与其他增殖性疾病的起因不同,但随后血管生长的生物化学和表型代偿机制却十分相似。人类视网膜血管的发育始于胚胎发育的第4wk,终止于第4wk。因此,早产儿的视网膜血供尚未完善,极易受影响而发生蜕变。血管的这一缺陷会使视网膜易于发生并发症,出生体质量和孕龄是十分重要的影响因素。为了解氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy, OIR)的起源,重要的是要首先考虑视网膜内部的血液供应。眼部血液循环的调控机制受到系统因素(循环激素和自主神经)相互作用的支配和影响,系统因素会影响整体心输出量和局部血流的调节因素(灌注压的调节者,如:pH, PaO<sub>2</sub>和PaCO<sub>2</sub>等),它们共同作用以保证有足够的血液供应来满足组织的需求。视网膜由于缺乏自主血管神经,因此主要受局部因素的影响。通过上述因素的共同作用,可以使血流供应始终在灌注压之上,或调整血流量以满足代谢需求,这种能力被称为自身调节。这一自身调节作用在初生婴儿中是缺乏的,原因在于围产期伴随有前列腺素类物质(如:PGD<sub>2</sub>和PGE<sub>2</sub>)和一氧化氮水平的显著升高,并进一步影响血管紧张度,使视网膜自身调节能力下降,而在脉络膜中几乎完全丧失调节作用<sup>[14]</sup>。由于组织氧张力的变化主要依赖自身调节作用来代偿,因此新生儿视网膜的氧中毒水平会进一步恶化。

## 3 发病机制(第二阶段):过度代偿的血管增殖

由于上述所提及的原因,视网膜组织会启动强大的代偿修复机制,以确保足够的血流灌注来对抗缺氧。在PDR和ROP中,有许多信号通路会激发过度的血管生长,同样

在胚胎视网膜中也是如此。Sapieha 等<sup>[15]</sup>认为,在视网膜病变的增殖阶段,前期血管新生反应源于神经元和星形细胞,随后血管新生因子如 VEGF 和 Epo 显著升高,导致血管不受控制的弥漫性生长,并向玻璃体和晶状体蔓延。与此同时,这种灌注的增加会导致纤维瘢痕的形成,引发视网膜色素上皮剥离。第二阶段是治疗干预的主要靶点。

**3.1 代谢信号与血管增殖** 充足的组织供氧和营养递送是自身细胞代谢和能量生成的保障。代谢的供需平衡依赖于健康的血管灌注。新近的研究表明,视网膜病变的代谢紊乱是这些疾病进展的关键<sup>[15]</sup>,腺苷和丁二酸是激活血管新生反应的重要代谢产物。腺苷是在 ATP 代谢过程中产生的,而丁二酸为三羧酸循环的中间产物。有趣的是,它们除了在能量代谢中发挥作用外,这些分子还可以与同源 G 蛋白配对受体相结合,发挥额外的生物学作用。重要的是,在低氧环境下,两者会上调它们各自的受体,诱导大量的血管生长<sup>[15,16]</sup>。以腺苷和丁二酸为代表的代谢信号通路和血管形成方式是病变血管邻近细胞参与的一种新型信号通路范例,也是一种血管新生反应,用以修复组织能量平衡<sup>[15,17]</sup>。

**3.2 视网膜病变的炎症和增殖** 作为血管损伤的继发反应,组织会启动非特异性反应以应对损伤。虽然在急性期这是有益的,但慢性和持续的炎症却是有害的。促炎细胞因子会增加血管通透性,刺激白细胞和其他免疫细胞的招募和激活。在血管新生过程中,单核细胞/巨噬细胞、T 淋巴细胞和中性粒细胞可以分泌细胞因子,来影响内皮细胞的功能。在增殖性视网膜病变患者的玻璃体液和糖尿病鼠的视网膜中,细胞因子(如:IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ )水平是增高的。在增殖性视网膜病变的发病过程中,上述细胞因子可以增加血管的通透性、加速细胞凋亡,相反却促进新生血管的形成<sup>[18]</sup>。IL-1 $\beta$  就是具备典型双重作用的例子,它既抑制也促进毛细血管的细胞凋亡,是血管新生的有效介质。IL-1 $\beta$  主要由活化的单核细胞和巨噬细胞产生,参与免疫细胞和脉管系统之间的交互作用。IL-1 $\beta$  可以促进内皮细胞增殖、增加黏附分子的表达、传播炎症和上调 HIF-1 $\alpha$ ,因此它具有促血管新生的潜能<sup>[18]</sup>。TNF- $\alpha$  是另一具有双重特性的细胞因子。在急性期,它会引发内皮细胞的死亡;而在慢性炎症环境下,低浓度的 TNF- $\alpha$  却会促进血管新生。在有关 TNF-Rp55 基因缺陷小鼠的研究中,存在抵抗病理性血管新生的保护作用,提示 TNF- $\alpha$  直接参与视网膜病变的增殖过程<sup>[18]</sup>。通过抑制炎症相关酶,可以减缓视网膜的血管新生。参与前列腺素类合成的环氧化酶(cyclooxygenase, COXs)就是一个例子。研究提示,COXs 可以通过产生前列腺素 E2 来参与视网膜的血管新生,它的激活主要是通过前列腺素 E 受体 3 完成。COXs 和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)通路的生物学脂质代谢底物源于主要的长链多不饱和脂肪酸类(longchain polyunsaturated fatty acids, LCPUFAs),如: $\omega$ -6 花生四烯酸( $\omega$ -6arachidonic acid, AA)、 $\omega$ -3 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)<sup>[19,20]</sup>。因此,有研究认为调节饮食对脂质的摄入可以作为一种改变炎症状态的有效策略。近期 Connor 等<sup>[21]</sup>关于小鼠的研究证实,富含  $\omega$ -3 LCPUFAs 的饮食(模仿疾病的日本饮食)可以有效升高视网膜  $\omega$ -3 脂肪酸的含量。在 OIR 动物模型中,这一

饮食与富含  $\omega$ -6 LCPUFAs 的饮食(典型的西方饮食)相比,具有抗血管新生作用。

#### 4 视网膜血管新生的治疗

**4.1 现状** 治疗 PDR 和 ROP 的经典方法包括局灶性视网膜消融和玻璃体切除术。目前,视网膜消融治疗的主要方法是激光光凝法,原理为靶向性破坏视网膜低氧区、抑制分泌型前血管新生因子的生成、阻碍增殖信号的传递,进而防止血管生长和视网膜剥离。PDR 激光治疗可以使视力丢失减少 50%,而 ROP 激光治疗可以使致盲率减少 25%。就二者而言,尽管治疗效果已经很明显,但治疗后的视敏度仍然很差。在疾病的晚期,可以行玻璃体切除术,这是防止视网膜完全剥离的最后选择。用生理盐水代替玻璃体,从而消除了玻璃体对视网膜的牵拉,避免了新生血管向基质的生长。迄今为止,这些侵入性操作仍是唯一有效的治疗方法,急需开发新型药物干预的治疗方法。

**4.2 展望** 当前,如何缓解(直接或间接)影响内皮的生长因子负荷,是应对眼部血管新生的焦点问题。抗 VEGF 治疗老年性黄斑变性(wet age related macular degeneration, AMD),是首项药理学干预的相关报道。在 PDR 和 ROP 治疗中,抗 VEGF 的益处正在受到人们的重视。未来理想的治疗策略可能在于阻止和保护最初血管的衰退。在妊娠晚期血管发育阶段,胰岛素生长因子-1(insulin growth factor-1, IGF-1)和  $\omega$ -3 LCPUFAs 具有潜在血管保护作用。有关鼠视网膜病变模型的研究结果证实,IGF-1 和  $\omega$ -3 PUFAs 对于发育中的视网膜血管具有细胞保护作用<sup>[21]</sup>。另外,有关 IGF-1 的临床研究正在进行之中。就增殖性视网膜病变的潜在细胞机制而言,我们认为需要综合性治疗策略。Dorrell 等<sup>[22]</sup>和 Fletcher 等<sup>[23]</sup>的相关研究发现,当面对低氧刺激时,由胶质细胞和神经元细胞等组成的细胞网络会首先产生反应,并为功能失调的脉管系统提供代谢支持。细胞治疗就是一种试验性探索,包括将造血干细胞注入眼部,靶向性激活星形细胞,有助于重建健康的脉管系统;或应用细胞外基质蛋白质(如 EGFL7)靶向性治疗,以维持和滋养脉管系统。另外,Sapieha 等<sup>[15]</sup>认为,随着对代谢信号系统理解的深入,新的进展将主要源于对细胞能量代谢组分的研究。近年来,越来越多的代谢产物被鉴定为 G 蛋白配对受体,它们的治疗潜能将有望引入新的药理治疗途径。

#### 5 结论

无论是在发达国家还是在发展中国家中,增殖性视网膜病变是致盲的最主要原因。视网膜血管衰退和血管异常生长的发生机制不仅是血管新生负荷的增加,而且应该包括代谢和炎症的参与。在视网膜独特的微环境中,神经元、神经胶质、免疫细胞和血管之间相互作用。这些概念的引入将有助于开辟新型而有效的治疗途径,以遏制视网膜血管新生<sup>[18]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Kempen JH, O' Colmain BJ, Leske MC, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):552-563
- 2 Gilbert C. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 2008;84(2):77-82
- 3 Weinberger B, Watorek K, Strauss R, et al. Association of lipid per-

- oxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit Care* 2002;6(6):521-525
- 4 Brüne B, Zhou J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Curr Med Chem* 2003;10(10):845-855
- 5 Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005;2005(306):re12
- 6 Bruck RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia - inducible transcription factor. *Genes Dev* 2003;17(21):2614-2623
- 7 Paul SA, Simons JW, Mahjeesh NJ. HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2004;200(1):20-30
- 8 Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007;10(2):133-140
- 9 Chen J, Connor KM, Aderman CM, et al. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008;118(2):526-533
- 10 Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, et al. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 2003;20(4):255-268
- 11 Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* 2008;30(2):65-84
- 12 Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* ;2004;88(10):1343-1347
- 13 Navarro JF, Mora - Fernandez C. The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(6):441-450
- 14 Budd SJ, Thompson H, Hartnett ME. Association of retinal vascular endothelial growth factor with avascular retina in a rat model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2010;128(8):1014-1021
- 15 Sapielha P, Sirinyan M, Hamel D, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 2008;14(10):1067-1076
- 16 Cronstein BN. Adenosine receptors and wound healing. *Scientific World J* 2004;4(1):1-8
- 17 Clark AN, Youkey R, Liu X, et al. A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res* 2007;101(11):1130-1138
- 18 Sapielha P, Hamel D, Shao Z, et al. Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(1):5-12
- 19 SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005;24(1):87-138
- 20 Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti - inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):349-361
- 21 Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, et al. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007;13(7):868-873
- 22 Dorrell MI, Aguilar E, Jacobson R, et al. Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen - induced retinopathy. *Glia* 2010;58(1):43-54
- 23 Fletcher EL, Downie LE, Ly A, et al. A review of the role of glial cells in understanding retinal disease. *Clin Exp Optom* 2008;91(1):67-77