

УДК 617.711-002-085-07+577.11-092.9

Експериментальні передумови для корекції рівня глутатіону в тканинній слизовій оболонці ока і слізної рідини при гострому кон'юнктивіті в умовах гіперглікемії

Г. І. Дрожжина¹, д-р мед. наук, професор, Т. М. Жмудь², канд. мед. наук

¹ ГУ «Інститут очних захворювань і тканинної терапії ім.

В. П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

² Вінницький національний медичний університет ім. Н. І. Пирогова, кафедра очних захворювань; Вінниця (Україна)

E-mail: cornea@te.net.ua

Ключеві слова: гострий кон'юнктивіт, гіперглікемія, глутатіон, корекція

Ключові слова: гострий кон'юнктивіт, гіперглікемія, глутатіон, корекція

Вступ. Проведення досліджень по вивченню проблем патологічних станів тканин поверхні очного яблука набуває особливої актуальності.

Мета. Вивчити рівень глутатіону в тканинній слизовій оболонці кон'юнктиви і слізної рідини при експериментальному кон'юнктивіті в умовах розвитку цукрового діабету.

Матеріал і методи. Для проведення експерименту використовували 52 кролика, які були розділені на 3 групи: 1 група — контрольна (8 тварин), 2 група — дослідна, тварини в яких розвивається кон'юнктивіт (23 кролика), 3 група — дослідна, тварини з кон'юнктивітом в умовах розвитку діабету (21 кролик). Для дослідження брали тканину кон'юнктиви і слізну рідину, в яких визначали рівень відновленого глутатіону.

Результати. В умовах розвитку експериментального кон'юнктивіту і стрептозотоцинового діабету визначається зниження рівня відновленої форми глутатіону в тканинній кон'юнктиви і слізної рідини.

Висновки. 1. При розвитку запального процесу в кон'юнктиві в умовах моделювання стрептозотоцинового діабету визначається більш різке зменшення рівня глутатіону в порівнянні з даними, коли кон'юнктивіт викликали у тварин без діабету. В цих умовах рівень глутатіону знизився на 17,0 %, 18,0 % і 29,4 % в різні терміни спостереження. 2. При моделюванні стрептозотоцинового діабету у тварин з кон'юнктивітом більшою мірою знижувалася секреція глутатіону в слізну рідину, ніж в групі з кон'юнктивітом без діабету. Так, в перший термін зниження склало — 13,6 %, в другий строк — 18 % і в третій термін — 21,8 %.

Experimental presuppositions for correction the glutathione level in the tissue of the mucous membrane and lacrimal fluid in acute conjunctivitis in conditions of hyperglycemia

Drozhzhina G. I.¹, Zhmud T. M.²,

¹ State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine; Odessa, (Ukraine)

² Vinnitsa National Medical University named after Pirogov; Vinnitsa (Ukraine)

Introduction. Research on the problems of pathological conditions of the surface tissues of the eye is of particular relevance.

Purpose. Examine the level of glutathione in the mucosal tissue of the conjunctiva and lacrimal fluid in experimental conjunctivitis in terms of developing diabetes.

Material and methods. For the experiment used 54 rabbits, which were divided into 3 groups: Group 1 — control group (8 animals), Group 2 — experimental animals with developing conjunctivitis (23 rabbits), group 3 — experimental animals with conjunctivitis in terms of developing diabetes (21 rabbit). To investigate the tissue taken conjunctiva and lacrimal fluid in which a determination is made of reduced glutathione.

Results. With the development of experimental conjunctivitis and streptozotocin diabetes marked lowering of reduced glutathione in the tissue of the conjunctiva and lacrimal fluid.

Conclusions. 1. With the development of inflammation in the conjunctiva in a simulation of streptozotocin diabetes says a sharp decrease in the levels of glutathione compared with the data when conjunctivitis is caused in animals without diabetes. Under these conditions, the level of glutathione decreased by 17.0 %, 18.0 % and 29.4 % in different periods of observation. 2. In the simulation streptozotocin diabetes in animals with conjunctivitis largely reduces the secretion of glutathione in the lacrimal fluid than in the group with conjunctivitis without diabetes. Thus, in the first term of the reduction was — 13.6 %, in the second period — 18 % and in the third term — 21.8 %.

Key words: acute conjunctivitis, hyperglycemia, glutathione levels, correction

Введение. В последнее время проблема патологических состояний тканей поверхности глазного яблока приобретает особую актуальность [2].

Число больных с конъюнктивитами постоянно увеличивается, и они все чаще приобретают характер хронического процесса, резистентного к проводимому лечению. При этом необходимо учитывать, что значительную роль в защитно-приспособительных реакциях органа зрения играет функциональное и метаболическое состояние поверхностных структур глаза [8, 9, 13, 22].

На сегодняшний день этиология и патогенез конъюнктивитов недостаточно изучены, что обуславливает отсутствие высокоэффективных методов их лечения, в особенности это касается хронических конъюнктивитов. Использование традиционных медикаментозных средств не всегда приводит к излечению больного и предупреждению возникновения рецидивов, оказывая в ряде случаев иммунодепрессивное влияние и угнетая местные механизмы неспецифической защиты. Это определяет актуальность поиска новых методов патогенетического воздействия на воспалительный процесс в конъюнктиве при острых и хронических конъюнктивитах [3, 11, 26].

Особенно важной в данном аспекте представляется функциональная особенность конъюнктивы, связанная с транспортом важнейшего детоксиканта — глутатиона. Роль этого трипептида заключается не только в детоксикационных и антиоксидантных функциях, но обусловлена также его участием в регуляции воспалительных и иммунных процессов. Кроме того, транспорт глутатиона в слезную жидкость играет значительную роль в обеспечении функционального состояния роговой оболочки, а также оказывает противовирусное действие [12, 15, 17, 21].

Известно, что глутатион играет ключевую роль не только в физиологии тканей органа зрения (слизистой оболочки конъюнктивы и др.), но также и в патогенезе разнообразных воспалительных заболеваний конъюнктивы [16, 19].

Важным открытием в настоящее время является установление интенсивного синтеза и трансэпителиального транспорта глутатиона в конъюнктиве. Экспериментальные данные свидетельствуют

о секреции глутатиона в эпителии конъюнктивы в направлении от базо-латеральной до апикальной мембраны через конъюнктиву в слезную жидкость. Транспорт глутатиона через мембраны культуры эпителиальных клеток конъюнктивы обеспечивается одновременно и Na^+ -зависимыми и Na^+ -независимыми процессами, причем Na^+ -независимые механизмы происходят за счет мембранного энергетического потенциала мембранных структур эпителия [18, 20].

Ранее были проведены исследования, установившие, что у больных бактериальным конъюнктивитом общий уровень глутатиона в слезной жидкости значительно снижен, при этом падение концентрации происходит за счет уменьшения содержания его восстановленной формы [1].

Было также показано, что степень дефицита глутатиона в слезной жидкости у больных бактериальным конъюнктивитом зависит от выраженности воспалительного процесса в конъюнктиве. При высокой степени воспаления уровень глутатиона в слезе снижался почти вдвое, составляя 55 % от нормы [1].

Особую актуальность в этом аспекте приобретает состояние тиолового статуса при воспалительных заболеваниях переднего отдела глаза у диабетиков, так как известно, что при этой системной патологии значительно нарушается обмен и функция глутатионовой системы. В частности, при развитии стрептозотоцинового диабета отмечается резкое падение восстановительного потенциала глутатионовой системы, в первую очередь, за счет резкого снижения уровня восстановленной формы кофермента [6, 8, 14, 23, 24].

Было установлено, что при исследовании различных форм глутатиона у пациентов с начальными формами диабетической ретинопатии уровень восстановленной формы его снижался на 60 % [5].

В то же время изучения уровня глутатиона при экспериментальном конъюнктивите и развитии сахарного диабета не проводилось.

Цель настоящей работы заключалась в изучении уровня глутатиона в ткани конъюнктивы и слезной жидкости при экспериментальном конъюнктивите в условиях развития сахарного диабета.

Материал и методы

Для проведения экспериментов было использовано 52 кролика породы шиншилла массой 2,2–2,9 кг.

Подопытные животные были разделены на три группы: первая — контрольная группа (8 кроликов), вторая — опытная группа, животные с острым конъюнктивитом (23 кролика), третья — опытная группа, животные с конъюнктивитом в условиях моделирования стрептозотоцинового диабета (21 кролик).

При проведении эксперимента были соблюдены рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом при офтальмологических исследованиях.

Опытным группам вводили раствор липополисахарида из *Escherichia coli* — K235 10 мкл путем единичной субконъюнктивальной инъекции при концентрации 200 нг/мкл в верхний отдел бульбарной конъюнктивы (с целью моделирования острого конъюнктивита) [25].

Клинические признаки воспалительного процесса в конъюнктиве оценивались модифицированным тестом Draize до моделирования — 0 и через 2 (I срок), 4 (II срок), 24 часа (III срок) после моделирования конъюнктивита [6, 25].

Диабет вызывали путем инъекции стрептозотоцина (55 мг на 1 кг веса тела, интраперитонеально). Инсулин вводился диабетическим животным для предотвращения снижения веса при условии поддержании гипергликемии (уровень сахара в крови колебался от 20 до 25 мМ).

В ткани конъюнктивы и слезной жидкости проводили определение восстановленного глутатиона. Для этого готовили гомогенат ткани с применением 6 % хлорной взвеси в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). Слезную жидкость также депротенинизировали в соотношении 1:1 (объем:объем). После центрифугирования при 5 °С в течение 10 мин при 1000 об/мин надосадочную жидкость нейтрализовали 1,75 М раствором трехзамещенного фосфата калия. В полученном нейтральном экстракте определяли содержание восстановленного глутатиона с помощью энзиматического метода [4, 10].

Содержание восстановленного глутатиона выражали в мкмоль/л или мкмоль/г ткани.

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [7].

Результаты и их обсуждение

Данные об изменении концентрации восстановленной формы глутатиона в ткани конъюнктивы и слезной жидкости при развитии экспериментального конъюнктивита и стрептозотоцинового диабета представлены в таблице 1.

В группе диабетических животных концентрация восстановленной формы глутатиона в ткани конъюнктивы была снижена и составила (7,14±0,64) мкмоль/г, т.е. 65,4 % (p<0,001) по сравнению с нормой (10,92±0,68) мкмоль/г.

Изучая уровень восстановленной формы глутатиона в ткани конъюнктивы у животных с конъюнктивитом, можно отметить его снижение до 72,3 %, что составило (7,89±0,56) мкмоль/г — в 1 срок (p<0,01), до 61,2 %, т.е. (6,68±0,48) мкмоль/г — во 2 период наблюдения (p<0,001), и до 79,4 %, т.е.

Таблица 1. Изменение концентрации восстановленной формы глутатиона в слезной жидкости и ткани конъюнктивы при развитии экспериментального конъюнктивита и стрептозотоцинового диабета

Исследуемая ткань	Статистические показатели	Норма	I срок	II срок	III срок
Слезная жидкость, мкмоль/л	Конъюнктивит				
	n	15	15	15	14
	M	108,50	81,90	72,35	65,37
	m	6,30	5,84	5,30	4,62
	p	—	<0,01	<0,001	<0,001
	%	100,0	75,5	66,7	60,2
	p ₁	—	—	—	—
	% ₁	—	100,0	100,0	100,0
	Конъюнктивит+диабет				
	n	15	15	14	12
	M	108,50	70,76	59,32	51,12
	m	6,30	5,62	3,20	4,34
p	—	<0,001	<0,001	<0,001	
%	100,0	65,2	54,7	47,1	
p ₁	—	>0,05	<0,05	<0,05	
% ₁	—	86,4	82,0	78,2	
Ткань конъюнктивы, мкмоль/г	Конъюнктивит				
	n	15	15	15	14
	M	10,92	7,89	6,68	8,67
	m	0,68	0,56	0,48	0,52
	p	—	<0,01	<0,001	<0,05
	%	100,0	72,3	61,2	79,4
	p ₁	—	—	—	—
	% ₁	—	100,0	100,0	100,0
	Конъюнктивит+диабет				
	n	15	15	14	12
	M	10,92	6,55	5,48	6,12
	m	0,68	0,48	0,30	0,42
p	—	<0,01	<0,0001	<0,0001	
%	100,0	60,0	50,2	56,0	
p ₁	—	>0,05	<0,05	<0,001	
% ₁	—	83,0	82,0	70,6	

Примечание: p — уровень значимости различий данных в зависимости от срока по отношению к норме; p₁ — уровень значимости различий данных в зависимости от срока по отношению к группе «Конъюнктивит».

(8,67±0,52) мкмоль/г — в 3 срок (p<0,05) сравнительно с нормой.

Необходимо указать, что уровень восстановленного глутатиона в ткани конъюнктивы у животных с конъюнктивитом и диабетом снижался в 1 срок — до 60,0 %, т.е. (6,55±0,48) мкмоль/г по сравнению с нормой (p<0,01).

Во 2 срок исследуемый показатель был понижен до 50,2 %, что составило (5,48±0,30) мкмоль/г по отношению к норме (p<0,001), а в 3 срок понизился до 56,0 %, составляя (6,12±0,42) мкмоль/г относительно нормы (p<0,001).

При сопоставлении данных двух опытных групп, можно отметить, что уровень восстановлен-

ного глутатиона в ткани конъюнктивы при конъюнктивите и моделировании стрептозотоцинового диабета снижался в большей степени по сравнению с данными, когда конъюнктивит вызывали у животных без диабета. Так, в первый срок снижение составило 17 %, во второй срок — 18 %, ($p < 0,05$), в третий срок — 29,4 % ($p < 0,001$).

В слезной жидкости концентрация восстановленной формы глутатиона у животных с диабетом была понижена относительно нормы ($108,50 \pm 6,30$) мкмоль/л на 29,5 %, что составило ($76,52 \pm 5,40$) мкмоль/л ($p < 0,001$).

Как видно из представленных данных, показатели восстановленной формы глутатиона снижены во все сроки развития воспалительного процесса по сравнению с нормой.

В группе животных с конъюнктивитом уровень восстановленной формы глутатиона в слезной жидкости экспериментальных животных понижался до 75,5 %, составляя ($81,90 \pm 5,84$) мкмоль/л — в 1 срок ($p < 0,01$), до 66,7 %, что составило ($72,35 \pm 5,30$) мкмоль/л — во 2 период ($p < 0,001$), до 60,2 %, составляя ($65,37 \pm 4,62$) мкмоль/л — в 3 срок ($p < 0,001$) сравнительно с нормой.

Уровень восстановленного глутатиона в слезной жидкости исследуемых животных с конъюнктивитом и диабетом снижался во все периоды наблюдения, составляя в 1 срок — 65,2 %, т.е. ($70,76 \pm 5,62$) мкмоль/л по сравнению с нормой ($p < 0,001$).

Во 2 срок исследуемый показатель был понижен до 54,7 %, что составило ($59,32 \pm 3,20$) мкмоль/л по отношению к норме ($p < 0,001$), а в 3 срок понизился

до 47,1 %, составляя ($51,12 \pm 4,34$) мкмоль/л относительно нормы ($p < 0,001$).

Следует указать, что во все сроки исследования у животных с конъюнктивитом в условиях развития диабета отмечается уменьшение концентрации восстановленного глутатиона в слезной жидкости, по сравнению с группой животных с конъюнктивитом без диабета. Так, в первый срок понижение составляет — 13,6 %, во второй срок — 18,0 %, в третий срок — 21,8 %.

На основании анализа представленных результатов можно полагать, что выявленная нами высокая степень дефицита глутатиона в изучаемых тканях при развитии конъюнктивита у животных со стрептозотоциновым диабетом зависит от состояния процессов синтеза глутатиона в конъюнктиве и скорости транспорта глутатиона в слезную жидкость.

Выводы

1. При развитии воспалительного процесса в условиях моделирования стрептозотоцинового диабета в конъюнктиве отмечается более резкое уменьшение уровня глутатиона по сравнению с данными, когда конъюнктивит вызывали у животных без диабета. В этих условиях уровень глутатиона понизился на 17,0 %, 18,0 % и 29,4 % в различные сроки наблюдения.

2. При моделировании стрептозотоцинового диабета у животных с конъюнктивитом в большей степени снижалась секреция глутатиона в слезную жидкость, чем в группе с конъюнктивитом без диабета. Так, в первый срок снижение составило — 13,6 %, во второй срок — 18 % и в третий срок — 21,8 %.

Литература

1. **Бондарева О. В.** Возможность медикаментозной коррекции уровня глутатиона в ткани слизистой оболочки и слезной жидкости при экспериментальном конъюнктивите // Украинский мед. альманах. — 2009. — Т. 12. — № 5. — С. 34–36.
2. **Дрожжина Г. И.** Вирусные заболевания роговицы и конъюнктивы // Здоров'я України, № 5. — 2002. — С. 35–36.
3. **Майчук Ю. Ф.** Новые лекарственные средства в лечении конъюнктивитов и кератитов / Майчук Ю. Ф. // Человек и лекарство: XIII Российский национальный конгресс: лекции для практикующих врачей. — М., 2005. — С. 83–92.
4. Новые методы биохимического анализа. — Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
5. **Олейник Т. В.** Современные патогенетически ориентированные пути профилактики и лечения начальных стадий диабетической ретинопатии: дис. ...д-ра мед. наук / Т. В. Олейник. — Донецк, 2010. — 268 с.
6. **Петруня А. М., Бондарева О. В.** Влияние воспалительного процесса на уровень глутатиона в эпителии конъюнктивы и слезной жидкости // Украинский Медицинский Альманах. — 2009. — Т. 12. — № 1. — С. 131–133.
7. **Реброва О. Ю.** Статистический анализ медицинских данных // М. Медиа. Сфера, 2002. — 305 с.
8. Academy for EYECARE excellence. Anterior eye complications in diabetes mellitus: Part 1 // Optometry. — 2011. — Vol. 2. — P. 40–45.
9. **Baudouin C., Becquet F., Saint-Jean M.** Ocular surface defense mechanisms. // In: Inflammatory diseases of the conjunctiva. Edited by T. Hoang-Xuan, Thieme, 2001. — P. 27–50.
10. **Bergmeyer H. V.** Methoden der enzymatischen Analyse / Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — 2220 p.
11. **Bilen H., Ates O., Astam N., Uslu H.** Conjunctival flora in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus // Adv. Ther. — 2007. — Vol. 24. — P. 1028–1035.
12. **Bukowska B.** Glutathione functions and factors decreasing its concentration. // Med Pr. — 2005. — Vol. 56. — № 1. — P. 69–80.
13. **Calonge M., Enriquez-de-Salamanca A.** The role of the conjunctival epithelium in ocular allergy // Curr Opin Allergy Clin Immunol. — 2005. — Vol. 5. — № 5. — P. 441–445.
14. **Citicic M., Berker N., Haksever H.** Conjunctival impression cytology in non-proliferative and proliferative diabetes

- ic retinopathy // *Int. J. Ophthalmol.* — 2014. — Vol. 7. — P. 321–325.
15. **Debbasch C., Pisella P. J., Magda De Saint Jean.** Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved β -blockers on chang conjunctival cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2001. — Vol.42. — № 11. — P. 2525–2533.
 16. **Droge W., Schulze-Osthoff K., Mihm S.** Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology // *FASEB J.* — 2004. — Vol. 18. — P. 1131–1138.
 17. **Goebbels M.** Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics // *Br. J. Ophthalmol.* — 2000. — Vol. 84. — P. 19–21.
 18. **Gukasyan H. J., Kim K. J., Lee V. H., Kannan R.** Glutathione and its transporters in ocular surface defense // *Ocul Surf.* — 2007. — Vol. 5. — № 4. — P.269–279.
 19. **Gukasyan H. J., Kim K. J., Kannan R. et al.** Specialized protective role of mucosal glutathione in pigmented rabbit conjunctiva // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2003. — Vol. 44. — № 10. — P. 4427–4438.
 20. **Gukasyan H. J., Lee V. H. L., Kim K. J., Kannan R.** Net glutathione secretion across primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2002. — Vol. 43. — № 4. — P.1154–1161.
 21. **Gukasyan H. J., Kannan R., Lee V. H. L., Kim K. J.** Regulation of Γ — cystine transport and intracellular GSH level by a nitric oxide donor in primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2003. — Vol. 44. — № 3. — P.1202–1210.
 22. **Hovding G.** Bacterial conjunctivitis. // *Acta Ophthalmol Scand.* — 2008. — Vol. 13. — P.5–17.
 23. **Isenberg S. J., McRee W. E., Jedrzynski M. S.** Conjunctival hypoxia in diabetes mellitus // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1986. — Vol. 27. — P.1512–1515.
 24. **Karimsab D., Razak S. K.** Study of aerobic bacterial conjunctival flora in patients with diabetes mellitus // *Nepal. J. Ophthalmol.* — 2013. — Vol. 5. — P.28–32.
 25. **Liang H., Baudouin C., Labbe A.** In vivo confocal microscopy and ex vivo flow cytometry: new tool for assessing ocular inflammation applied to rabbit lipopolysaccharide-induced conjunctivitis // *Molecular Vision.* — 2006. — Vol. 12. — P. 1392–1402.
 26. **Turner H. C., Bernstein A., Candia O. A.** Presence of CFTR in the conjunctival epithelium // *Curr Eye Res.* — 2002. — Vol. 24. — № 3. — P. 182–187.

Посылана 26.09.2014

References

1. **Bondareva OV.** Possibility of drug correction for glutathione levels in mucosal tissue and tear fluid in experimental conjunctivitis. *Ukrainskii med. almanakh.* 2009;12(5):34–6. Russian.
2. **Drozhdzhina GI.** Viral diseases of the cornea and conjunctiva. *Zdorovya Ukrainy.* 2002;5:35–6. Russian.
3. **Maichuk YuF.** New drugs in the treatment of conjunctivitis and keratitis. XIII Russian National congress: lectures for medical practitioners. M., 2005. 83–92.
4. New methods of biochemical analysis. *Izd. Leningradskogo univer.* 1991. 395 p.
5. **Oleinik TB.** Modern pathogenetically oriented ways of prophylaxis and treatment of early stages of diabetic retinopathy; thesis for Doctor of Med. Science. Donetsk; 2010. 268 p.
6. **Petrunya AM, Bondareva OV.** Effect of inflammation on glutathione level in the epithelium of the conjunctiva and lacrimal fluid. *Ukrainskii Medychnyi Almanakh.* 2009;12(1):131–3. Russian.
7. **Rebrova O. Yu.** Statistical analysis of medical data. *M. Media. Sfera;* 2002. 305 p.
8. Academy for EYECARE excellence. Anterior eye complications in diabetes mellitus: Part 1. *Optometry.* 2011;2:40–5.
9. **Baudouin C, Becquet F, Saint-Jean M.** Ocular surface defense mechanisms. In: *Inflammatory diseases of the conjunctiva.* Edited by T. Hoang-Xuan, Thieme, 2001. 27–50.
10. **Bergmeyer HV.** Methoden der enzymatischen Analyse. Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. Berlin. 1986. 2220 p.
11. **Bilen H, Ates O, Astam N, Uslu H.** Conjunctival flora in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *Adv. Ther.* 2007;24:1028–35.
12. **Bukowska B.** Glutathione functions and factors decreasing its concentration. *Med Pr.* 2005;56(1):69–80.
13. **Calonge M, Enriquez-de-Salamanca A.** The role of the conjunctival epithelium in ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(5): 441–5.
14. **Citicic M, Berker N, Haksever H.** Conjunctival impression cytology in non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy. *Int. J. Ophthalmol.* 2014;7: 321–5.
15. **Debbasch C, Pisella PJ, Magda De Saint Jean.** Mitochondrial activity and glutathione injury in apoptosis induced by unpreserved and preserved β -blockers on chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(11):2525–33.
16. **Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S.** Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 2004;18.:1131–8.
17. **Goebbels M.** Tear secretion and tear film function in insulin dependent diabetics. *Br. J. Ophthalmol.* 2000;84: 19–21.
18. **Gukasyan HJ, Kim KJ, Lee VH, Kannan R.** Glutathione and its transporters in ocular surface defense. *Ocul Surf.* 2007;5(4):269–79.
19. **Gukasyan HJ, Kim KJ, Kannan R, Farley RA, Lee VHL.** Specialized protective role of mucosal glutathione in pigmented rabbit conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4427–38.
20. **Gukasyan HJ, Lee VHL, Kim KJ, Kannan R.** Net glutathione secretion across primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1154–61.
21. **Gukasyan HJ, Kannan R, Lee VHL, Kim KJ.** Regulation of Γ — cystine transport and intracellular GSH level by a nitric oxide donor in primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(3):1202 –10.
22. **Hovding G.** Bacterial conjunctivitis. *Acta Ophthalmol Scand.* 2008;13:5–7.

23. **Isenberg SJ, McRee WE, Jedrzynski M. S.** Conjunctival hypoxia in diabetes mellitus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1986;27:1512–5.
24. **Karimsab D, Razak SK.** Study of aerobic bacterial conjunctival flora in patients with diabetes mellitus. *Nepal. J. Ophthalmol.* 2013;5:28–32.
25. **Liang H, Baudouin C, Labbe A.** In vivo confocal microscopy and ex vivo flow cytometry: new tool for assessing ocular inflammation applied to rabbit lipopolysaccharide–induced conjunctivitis. *Molecular Vision.* 2006;12:1392–402.
26. **Turner HC, Bernstein A, Candia OA.** Presence of CFTR in the conjunctival epithelium. *Curr Eye Res.* 2002;24(3):182–7.