



Ситник Г.В.¹ ✉, Степанова Ю.И.²

¹ Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

² Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Нарушение гомеостаза глазной поверхности при кератоконусе

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования – Ситник Г.В.; сбор материала, редактирование, обработка, написание текста – Ситник Г.В., Степанова Ю.И.

Подана: 19.02.2024

Принята: 26.02.2024

Контакты: drhalinasitnik@gmail.com

Резюме

Цель. Изучение цитоморфологических особенностей глазной поверхности у пациентов с кератоконусом различных стадий во взаимосвязи с экспрессией в слезной жидкости биохимических маркеров состояния экстрацеллюлярного матрикса и воспаления.

Материалы и методы. Для проведения исследования были сформированы 3 группы. В 1-ю группу вошли 28 пациентов с кератоконусом I–III стадии, во 2-ю группу – 28 пациентов с кератоконусом IV стадии, 3-ю группу составили 28 здоровых добровольцев. Выполнены забор слезы и определение концентрации в ней биохимических показателей. У 15 пациентов (30 глаз) с различными стадиями кератоконуса был проведен забор материала путем аппликации стерильного мембранного ацетат-целлюлозного диска для импрессионной цитологии.

Результаты. Выявлены различия в содержании в слезе маркеров воспаления (СРБ, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, ФНО- α) при кератоконусе I–III стадии и кератоконусе IV стадии. Концентрация маркеров состояния экстрацеллюлярного матрикса (коллаген IV типа, ММП-9, альфа-2-макроглобулин) при кератоконусе достоверно отличается от таковой у здоровых добровольцев. Результаты импрессионной цитологии показали выраженные изменения роговичного эпителия и стромы, отражающие нарушение цитокин-опосредованных эпителиально-стромальных коммуникаций, что является морфологическим субстратом прогрессирования заболевания.

Выводы. Определен диагностический комплекс маркеров кератоконуса, включающий изменение концентрации ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, α 2-МГ в слезной жидкости, установлены их пороговые уровни.

Ключевые слова: кератоконус, слезная жидкость, цитокины, импрессионная цитология



Sitnik H.¹ ✉, Stepanova Y.²

¹ Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The Disorder of Ocular Surface Homeostasis in Keratoconus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design of the study – Sitnik H.; collection of material, editing, processing, writing the text – Sitnik H., Stepanova Y.

Submitted: 19.02.2024

Accepted: 26.02.2024

Contacts: drhalinasitnik@gmail.com

Abstract

Purpose. To study the cytomorphological features of the ocular surface in patients with keratoconus in relation to the expression of biochemical markers of the extracellular matrix and inflammation in the tear fluid.

Materials and methods. Three groups of patients were included in the study. Group 1 consisted of 28 patients with grade I–III keratoconus, group 2 included 28 patients with grade IV keratoconus, group 3 included 28 healthy volunteers. A tear samples were collected in all groups and the concentrations of biochemical markers were determined. The sterile membrane cellulose acetate disks for impression cytology were used for collecting material in 15 patients (30 eyes) with various grades of keratoconus.

Results. The differences in the concentrations of inflammatory markers (CRP, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α) in tears were revealed in grade I–III keratoconus and grade IV keratoconus. The concentration of markers of the state of the extracellular matrix (type IV collagen, MMP-9, alpha-2 macroglobulin) in keratoconus is significantly different from that in healthy volunteers. Impression cytology showed changes in the corneal epithelium and stroma illustrating disruption of cytokine-mediated epithelial-stromal communications, which is the morphological substrate of disease progression.

Conclusions. A diagnostic complex of keratoconus markers including of MMP-9, IL-1 β and IL-17, α 2-MG in the tear fluid and their cut-off levels was determined.

Keywords: keratoconus, tear fluid, cytokines, impression cytology

■ ВВЕДЕНИЕ

Кератоконус представляет собой двустороннее заболевание, имеющее четкую генетическую предрасположенность [1]. Однако его развитие и скорость прогрессирования зависят как от биологических особенностей самого организма, так и от внешних факторов, таких, например, как длительное механическое воздействие, которое связано с привычкой чесать глаза у пациентов с сопутствующей аллергией или заболеваниями кожи [1–3].

По данным исследований, на глазной поверхности у пациентов с кератоконусом наблюдается нарушение нормального соотношения про- и противовоспалительных маркеров, что может быть вызвано различными факторами и являться одной из причин прогрессирования заболевания [3–8].

Гомеостаз глазной поверхности представляет собой баланс или относительно стабильное равновесие между взаимозависимыми элементами. Межклеточные взаимодействия, опосредованные различными метаболитами, имеют решающее значение в поддержании гомеостаза глазной поверхности, заживлении и восстановлении структуры роговицы, в которой эпителиальная и соединительная ткани контактируют анатомически и влияют друг на друга функционально [9, 10].

Изменение глазной поверхности, в частности состояния роговицы и конъюнктивы, состава слезной жидкости, предполагает широкий спектр молекулярных событий, которые приводят к клеточному стрессу [11]. Следует различать эпителиально-стромальные взаимодействия, при которых эпителиальные клетки роговицы продуцируют метаболически активные протеины для модуляции функций кератоцитов, и обратные стромально-эпителиальные взаимодействия, при которых кератоциты продуцируют цитокины для регулирования функциональной активности эпителиальных клеток. Следовательно, благодаря взаиморегулируемому иммунному ответу на повреждение клеточные структуры роговицы способны к самовосстановлению с минимальными тканевыми изменениями. Стресс как неспецифическая реакция организма может способствовать адаптации к критической ситуации и ее преодолению с восстановлением ключевых параметров [11, 12]. В противном случае развивается патологическое состояние, которое ведет к заболеванию.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение цитоморфологических особенностей глазной поверхности у пациентов с кератоконусом различных стадий во взаимосвязи с экспрессией в слезной жидкости биохимических маркеров состояния экстрацеллюлярного матрикса и воспаления.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на кафедре офтальмологии ГУО «БелМАПО» и в НИЛ БелМАПО в период 2021–2023 гг. после одобрения этического комитета. Для его проведения были сформированы 3 группы: в 1-ю группу вошли 28 пациентов с кератоконусом I–III стадии, во 2-ю группу – 28 пациентов с кератоконусом IV стадии, 3-ю группу составили 28 здоровых добровольцев. Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1.

Всем пациентам проводили полное офтальмологическое обследование, выполняли тест Ширмера, проводили забор слезной жидкости по ранее описанному методу для анализа биохимических маркеров воспаления и фиброза [13].

Содержание биохимических маркеров в слезе определяли иммунотурбидиметрическим или иммуноферментным методами с использованием тест-наборов реагентов Cormay (Польша), Bioassay Technology Laboratory (Китай), IMTEC (Германия). Оценивали концентрацию С-реактивного белка (СРБ), интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17), фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), альфа-2-макроглобулина (α 2-МГ), коллагена IV, матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9). Итоговую оценку

Таблица 1
Характеристики пациентов
Table 1
Patient' characteristics

Параметр	Группа 1, кератоконус I–III стадии, n=28	Группа 2, кератоконус IV стадии, n=28	Группа 3, здоровые добровольцы, n=28
Возраст, лет	23,5 (22–31,5)	31,5 (28–37)	23,5 (21,5–31,5)
Пол, м/ж	15/13	20/8	14/14
Стаж болезни, лет	1–15	2–15	–
Тест Ширмера, мм	15 (10,5–15,5)	15 (10–25)	15 (14–18)
Толщина роговицы, мкм	460 (420–485)	317,5 (300–345)	510 (500–534)

концентрации аналитов в слезной жидкости проводили с учетом кратности разведения слезы на преаналитическом этапе по разработанному методу [13].

У 15 пациентов (30 глаз) с различными стадиями кератоконуса был проведен забор материала для выполнения импрессионной цитологии. После предварительной местной анестезии получение клеточного материала проводили путем аппликации стерильного мембранного ацетат-целлюлозного (смешанные эфиры целлюлозы, MCE) диска с диаметром пор 0,44 мкм производства Macherey-Nagel (Германия) с экспозицией 10 сек. на поверхность роговицы. Полученный материал на диске фиксировали 96%-ным этиловым спиртом в течение 5 мин., высушивали при комнатной температуре, окрашивали азур-эозиновым красителем по методу Романовского. Цитологические препараты исследовали путем световой микроскопии и фоторегистрации с помощью микроскопа Motic Panthera Series (Гонконг) с цифровой фотокамерой Moticom при увеличении $\times 200$, $\times 400$ и $\times 1000$. Оценивали клеточный состав, морфофункциональное состояние эпителиальных клеток, выполняли морфометрический анализ.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительные результаты определения концентраций биохимических маркеров в слезной жидкости в группах пациентов представлены в табл. 2.

Сравнение трех и более независимых групп количественных данных проводили с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. При обнаружении статистически значимых различий между группами далее проводили попарные сравнения с помощью критерия Манна – Уитни с изменением критического уровня значимости в соответствии с числом проводимых сравнений (поправка Bonferroni). Как следует из табл. 2, были установлены достоверные различия в концентрации следующих маркеров между группами 1 (кератоконус I–III стадии) и 2 (кератоконус IV стадии): СРБ, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-17.

При сравнении данных здоровых лиц и группы 1 различия получены по содержанию следующих маркеров: ИЛ-1 β , ИЛ-17, $\alpha 2$ -МГ, ММР-9. Проведение последующего ROC-анализа позволило определить пороговые уровни этих показателей, которые могут быть использованы в качестве предикторов в комплексе диагностических критериев при скрининге пациентов в группе риска, при подозрении на кератоконус или при монолатеральном кератоконусе.

Таблица 2
Концентрации биохимических маркеров в слезной жидкости пациентов исследуемых групп
Table 2
Concentrations of biochemical markers in the tear fluid of patients in the study groups

Параметр	Группа 1, кератоконус I–III стадии, n=28	Группа 2, кератоконус IV стадии, n=28	Группа 3, здоровые, n=28	Статистическая зна- чимость, критерий Манна – Уитни (U), с по- правкой Бонферрони, p _{крит} =0,0167
СРБ, мг/мл	4,6 (3,1–5,5)	46,4 (31,6–70,8)	2,9 (2,2–4,7)	p _{КК I–III vs 3д} =0,0519 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,000
ИЛ-1β, пг/мл	119,9 (75,6– 147,1)	63,8 (41,3–95)	20,7 (16,3–31)	p _{КК I–III vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,000
ИЛ-17, пг/мл	807,7 (501–1378)	1284 (715–1849)	160,5 (149,8–218,5)	p _{КК I–III vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,000
ФНО-α, пг/мл	109 (81,7–178)	205,8 (167–286,4)	126,2 (106–169)	p _{КК I–III vs 3д} =0,229 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,000
ИЛ-6, пг/мл	27,8 (16,3–39,1)	122,9 (97,7– 151,4)	31,8 (22,2–35,9)	p _{КК I–III vs 3д} =0,503 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,000
Коллаген IV, нг/мл	–	107,5 (101,5–136)	52,3 (44,9–58,9)	p _{КК IV vs 3д} =0,000
α2-МГ, мг/дл	236,9 (189–290)	235,1 (184–309,2)	163,9 (143,6–176,4)	p _{КК I–III vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,483
ММП-9, нг/л	471 (310,6–674,6)	502,4 (334–694)	48,3 (33,2–62,7)	p _{КК I–III vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs 3д} =0,000 p _{КК IV vs КК I–III} =0,451

Метод импрессионной цитологии с высокой достоверностью позволяет оценить in vivo морфологическую картину эпителия глазной поверхности путем анализа объ-
ективных качественных и количественных данных [14, 15].

Для цитоморфологической картины роговицы при кератоконусе I стадии было
характерно сохранение нормальной citoархитектоники поверхностных слоев
роговичного эпителия, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) составило

Таблица 3
Характеристики ROC-кривых биохимических показателей слезной жидкости пациентов 1-й и 3-й
групп
Table 3
Characteristics of ROC curves of biochemical parameters of tear fluid in patients of groups 1 and 3

Параметр	Площадь под кривой (AUC)	95%-ный до- верительный интервал	Cut off (по- роговый уровень)	ДЧ	ДС	p
ММП-9, нг/мл	1,0	1,0–1,0	115,4 нг/мл	100%	100%	0,000
ИЛ-1β, пг/мл	0,99±0,013	0,96–1,0	63,9 пг/мл	95%	100%	0,000
ИЛ-17, пг/мл	1,0	1,0–1,0	404,1 пг/л	100%	100%	0,000
α2-МГ, мг/дл	0,82±0,059	0,71–0,94	188,3 мг/дл	81%	86%	0,000



0,045±0,001 усл. ед. (рис. 1). В исследовании Reinstein D.Z. et al. была показана компенсаторная роль увеличения толщины роговичного эпителия на самых ранних стадиях развития кератоконуса [16].

При кератоконусе II стадии наблюдались явления эпителиопатии как результат реактивных изменений (нарушение стратификации эпителиальных клеток, плеоморфизм ядер, тенденция к увеличению ЯЦО до 0,053±0,001 усл. ед.), кроме того,

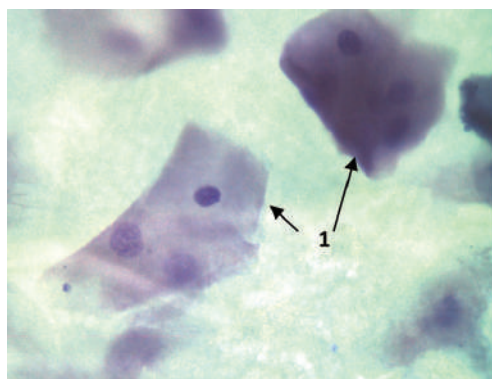


Рис. 1. Препарат импрессионной цитологии, ×1000. Кератоконус I стадии: 1 – поверхностный плоский эпителий
Fig. 1. Impression cytology preparation, ×1000. Keratoconus stage I: 1 – superficial squamous epithelium

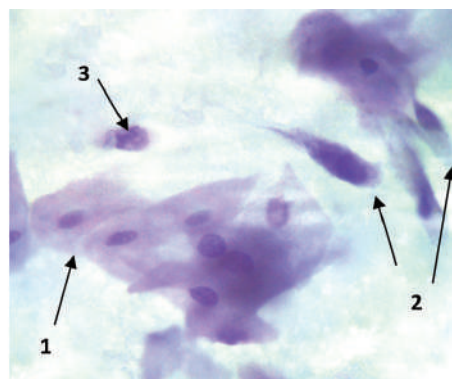


Рис. 2. Препарат импрессионной цитологии, ×1000. Кератоконус II стадии: 1 – поверхностный плоский эпителий, 2 – кератоциты, 3 – нейтрофил
Fig. 2. Impression cytology preparation, ×1000. Keratoconus stage II: 1 – superficial squamous epithelium, 2 – keratocytes, 3 – neutrophil

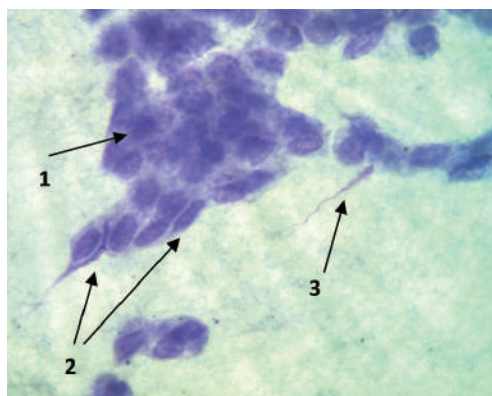


Рис. 3. Препарат импрессионной цитологии, ×1000. Кератоконус III стадии: 1 – эпителиоциты, 2 – кератоциты-фибробласты, 3 – фиброзные волокна
Fig. 3. Impression cytology preparation, ×1000. Keratoconus stage III: 1 – epithelial cells, 2 – keratocytes-fibroblasts, 3 – fibrous fibers

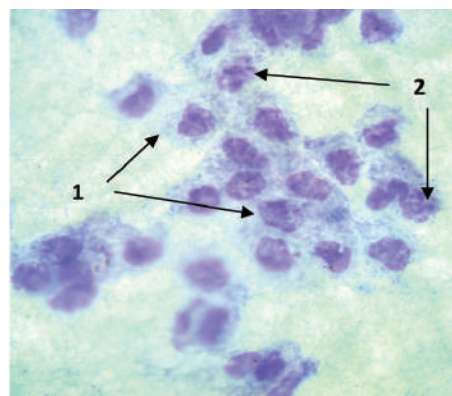


Рис. 4. Препарат импрессионной цитологии, ×1000. Кератоконус IV стадии: 1 – цитоллиз клеток эпителия, 2 – фрагментация ядер
Fig. 4. Impression cytology preparation, ×1000. Keratoconus stage IV: 1 – cytolysis of epithelial cells, 2 – fragmentation of nuclei

в препаратах встречались кератоциты, нейтрофилы, что не характерно для эпителия интактной роговицы (рис. 2).

Для кератоконуса III стадии были характерны дегенеративно-дистрофические изменения эпителия (признаки кератинизации и полиморфизма клеток, размывание границ между клетками, увеличение ядер в размерах и неравномерное их распределение), наблюдалось повышение ЯЦО в сравнении с кератоконусом I стадии до $0,072 \pm 0,003$ усл. ед. ($p=0,019$) и присутствие нейтрофилов, кератоцитов-фибробластов и фиброзных волокон, что свидетельствует о повреждении подлежащей боуменовой мембраны (рис. 3).

Так, в исследовании E. Sykakis et al. в 2012 г. были изучены роговицы 36 пациентов с кератоконусом, удаленные во время трансплантации роговицы, и в 92% роговиц были обнаружены разрывы боуменовой мембраны, за счет чего происходит контакт эпителия и стромы роговицы [17]. Это объясняет обнаружение в нашем исследовании стромальных кератоцитов в препаратах импрессионной цитологии у пациентов с кератоконусом III стадии. Также было отмечено, что при кератоконусе эти разрывы приводят к фрагментации боуменовой мембраны, которые затем заполняются избыточно синтезированным стромальным коллагеном II, IV типов [18]. По нашим данным, содержание коллагена IV типа в слезе при кератоконусе IV стадии значительно выше по сравнению со здоровыми (табл. 2). Кроме того, увеличение нуклеарных размеров в этой группе свидетельствует об усилении метаболической активности эпителия роговицы при прогрессировании кератоконуса.

В препаратах импрессионной цитологии при кератоконусе IV отмечались десквамация эпителиальных клеток в виде пластов, фрагментация ядер, признаки вакуольной дистрофии и некробиоза клеток вплоть до клеточного цитолиза с образованием детрита, ЯЦО не определялось (рис. 4). Визуализировались единичные нейтрофилы и макрофаги между клеточным детритом. Присутствие лейкоцитарных клеток с большим количеством включений объясняется активностью воспалительных реакций и продукцией цитокинов, протеаз, в том числе металлопротеиназ, ведущих к лизису базальной мембраны и разрушению межклеточных связей, что отражается присутствием в препаратах этой группы пациентов пластов эпителиальных клеток и повышенным содержанием ММП-9 в слезе у пациентов с кератоконусом в сравнении с нормой. Полученные результаты соотносятся с литературными данными, в которых продемонстрировано, что эпителий зоны максимального выпячивания и деформации роговицы характеризуется усиленной гибелью клеток, низкой дифференцировкой, пролиферацией и слабой эпителиально-стромальной связью [19]. Следовательно, нарастание воспалительно-дегенеративных процессов, дистрофии и десквамации клеток приводит к снижению барьерных свойств роговичного эпителия, нарушению его транспортной и трофической функций, что демонстрирует нарушение гомеостатического равновесия глазной поверхности при прогрессировании кератоконуса.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Поддержание нормальной структуры и функции роговицы требует постоянного взаимодействия между эпителиальными клетками роговицы, кератоцитами и нервными клетками. Ранее была выдвинута гипотеза, что поддержание целостности мембраны Боумена зависит от непрерывных разнонаправленных



цитокин-опосредованных межклеточных взаимодействий [20]. Различные цитокины могут высвобождаться из неповрежденного эпителия роговицы для регулирования функциональной активности кератоцитов. Стромально-эпителиальные коммуникации между эпителиальными клетками и клетками стромы, такими как кератоциты, кератобласты и фибробласты, вносят основной вклад в поддержание гомеостаза и ранозаживление роговицы, а нарушение клеточных связей, наоборот, способствует развитию патологии роговицы, так как многие из этих взаимодействий опосредуются цитокинами, факторами роста и другими межклеточными медиаторами как при физиологических процессах, так и при патологических состояниях. Известно, что ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α высвобождаются эпителием роговицы в ответ на повреждение, при этом ИЛ-1 β является основным регулятором заживления дефектов роговицы, так как он модулирует такие функции кератоцитов и фибробластов, как синтез матриксных металлопротеиназ и ростовых факторов, а также регулирует апоптоз кератоцитов после повреждения [21, 22]. Было доказано, что цитокины, секретируемые фибробластами, регулируют пролиферацию эпителиоцитов, в то время как факторы роста, секретируемые эпителиальными клетками, влияют на целостность роговицы [23]. Фактически тесное взаимодействие между роговичным эпителием и фибробластами роговицы человека имеет решающее значение для поддержания гомеостаза глазной поверхности.

Нами продемонстрировано нарушение цитокин-опосредованных клеточных коммуникаций между клетками роговицы у пациентов с кератоконусом. При этом эпителий роговицы имеет характерные компенсаторные изменения на ранних стадиях болезни: гипертрофия и гиперплазия. При прогрессировании кератоконуса ведущими становятся атрофические и деструктивные изменения. В работе Crespo M.S. et al., 2020, было установлено, что толщина эпителия роговицы не коррелирует с толщиной стромы ни в центральных, ни в периферических зонах при кератоконусе [24].

Полученные нами данные импрессионной цитологии согласуются с изменениями концентрации биохимических маркеров в слезной жидкости при прогрессировании кератоконуса. Возможно, новым направлением лечения кератоконуса может стать локальное медикаментозное влияние на маркеры воспаления в слезной жидкости пациентов на ранних стадиях болезни.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с кератоконусом наблюдаются выраженные цитоморфологические изменения роговичного эпителия и стромы, отражающие нарушение цитокин-опосредованных эпителиально-стромальных коммуникаций, что является морфологическим субстратом прогрессирования патологического процесса. Для кератоконуса I–III стадии характерно нарастание дегенеративно-дистрофических нарушений, изменение клеточного состава с наличием кератоцитов-фибробластов и нейтрофилов, увеличение ЯЦО до $0,072 \pm 0,003$ усл. ед., в то время как при кератоконусе IV стадии отмечаются выраженная клеточная деструкция, признаки вакуольной дистрофии и некробиоза клеток вплоть до клеточного цитолиза с образованием пластов детрита.
2. Определен диагностически значимый комплекс патогенетических факторов кератоконуса, включающий изменение концентрации ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, α 2-МГ в слезной жидкости, установлены их пороговые уровни – 115,4 нг/мл, 63,9 пг/мл,

404,1 пг/л и 188,3 мг/дл соответственно, превышение которых свидетельствует в пользу наличия кератоконуса и может быть использовано при скрининге пациентов в группе риска, при подозрении на кератоконус и при монолатеральном кератоконусе.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Gomes J.A., Tan D., Rapuano C.J. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. *Cornea*. 2015;34(4):359–369.
- Georgiou T., Funnell C.L., Cassels-Brown A. et al. Influence of ethnic origin on the incidence of keratoconus and associated atopic disease in Asians and white patients. *Eye (Lond)*. 2004;18:379–383.
- Balasubramanian S.A., Pye D.C., Willcox M.D. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin. Exp. Optom.* 2013;96:214–218.
- Pannebaker C., Chandler H.L., Nichols J.J. Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis*. 2010;16:1949–1957.
- Balasubramanian S.A., Mohan S., Pye D.C., Willcox M.D. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(4):303–309.
- Pahuja N., Kumar N.R., Shroff R. et al. Differential molecular expression of extracellular matrix and inflammatory genes at the corneal cone apex drives focal weakening in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:5372–5382.
- Lema I., Duran J.A. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology*. 2005;112:654–659.
- Lema I., Sobrino T., Duran J.A. et al. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:820–824.
- Karamichos D., Zieske J.D., Sejersen H., Sarker-Nag A., Asara J.M., Hjortdal J. Tear metabolite changes in keratoconus. *Exp Eye Res*. 2015;132:1–8.
- Volatier T.L.A., Figueiredo F.C., Connon C.J. Keratoconus at a Molecular Level: A Review. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020;303(6):1680–1688.
- Buddi R., Lin B., Attilano S.R. et al. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(3):341–51.
- Yoshimoto T., Yoshimoto T. *Cytokine frontiers: regulation of immune responses in health and disease*. Springer Science and Business Media, 2013. 389 p.
- Sitnik G., Lebedeva P., Stepanova Yu., Alekhnovich L. Laboratory study of tear fluid based on the use of standardized technology for its collection and sample preparation: results of validation of the method of collecting biological fluid. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2021;10(4):483–492.
- Egorova G., Fedorov A., Mitichkina T. Possibilities of the impression cytology method in diagnosing and assessing the effectiveness of drug correction of dry eye syndrome when wearing contact lenses. *Bulletin of Ophthalmology*. 2012;128(1):33–35.
- Zlobin I., Churashov S., Kulikov A. Selection of tactics for surgical treatment of vascular lesions based on impression cytology. *Russian ophthalmological journal*. 2022;15(2):61–68. doi: 10.21516/2072-0076-2022-15-2-supplement-61-68.
- Reinstein D.Z., Archer T.J., Urs R., Gobbe M., RoyChoudhury A., Silverman R.H. Detection of keratoconus in clinically and algorithmically topographically normal fellow eyes using epithelial thickness analysis. *Journal of Refractive Surgery*. 2015;31(11):736–744.
- Syakakis E., Carley F., Irion L., Denton J., Hillarby M.C. An in depth analysis of histopathological characteristics found in keratoconus. *Pathology*. 2012;44(3):234–9.
- Sherwin T., Brookes N.H. Morphological changes in keratoconus: pathology or pathogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2004;32:211–217.
- Shetty R., Vunnav K.P., Dhamodaran K., Matalia H., Murali S., Jayadev C., Murugeswari P., Ghosh A., Das D. Characterization of corneal epithelial cells in keratoconus. *Transl Vis Sci Technol*. 2019;8:2.
- Wilson S.E., Netto M., Ambrósio R. Jr. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(3):530–6.
- Shetty R., Vunnav K.P., Dhamodaran K., Matalia H., Murali S., Jayadev C., Murugeswari P., Ghosh A., Das D. Characterization of corneal epithelial cells in keratoconus. *Transl Vis Sci Technol*. 2019;8:2.
- Wong H.L., Poon S.H.L., Bu Y., Lo A.C.Y., Jhanji V., Chan Y.K., Shih K.C. A Systematic Review on Cornea Epithelial-Stromal Homeostasis. *Ophthalmic Res*. 2021;64(2):178–191.
- Kobayashi T., Shiraishi A., Hara Y. et al. Stromal-epithelial interaction study: the effect of corneal epithelial cells on growth factor expression in stromal cells using organotypic culture model. *Exp Eye Res*. 2015;135:109–117.
- Crespo M.S., Lopez J.C., Garcia-Lagarto E., Obregon E., Hileeto D., Maldonado M.J., Pastor J.C. Histological patterns of epithelial alterations in keratoconus. *J Ophthalmol*. 2020;1468258.