

## ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ ИМПРЕССИОННОЙ ЦИТОЛОГИИ БУЛЬБАРНОЙ КОНЬЮНКТИВЫ

Дога А.В., Мушкова И.А., Борзенко С.А., Каримова А.Н.,  
Хубецова М.Х., Островский Д.С., Образцова М.Р.\*

ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза»

им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

DOI: 10.25881/20728255\_2023\_18\_4\_S1\_22

**Резюме.** Актуальность. Общеизвестно, что в эпителии конъюнктивы находятся продуцирующие муцин – бокаловидные клетки и дендритные клетки Лангерганса. Бокаловидные клетки конъюнктивы выделяют растворимые муцины в водно-муциновый слой слезной пленки, выполняя защитную и регуляторную функции. В связи с этим для оценки состояния водно-муцинового слоя слезной пленки возможно проведение цитологического исследования конъюнктивы с целью верификации диагноза синдрома сухого глаза.

Цель. Оценить состояние бокаловидных клеток конъюнктивы у пациентов рефракционного профиля на до- и после операционных этапах.

Материал и методы. В ходе работы сформировано две группы исследования: первая группа – это пациенты с верифицированным диагнозом синдрома сухого глаза и вторая группа – это пациенты с исходно отсутствием признаков синдрома сухого глаза. Пациентам обеих групп выполнялась импрессионная цитология бульбарной конъюнктивы с использованием фильтров «JET BIOFIL» MCE НЕЙЛОН PVDF PES PTFE CA SFCA PES Express после местной анестезии. Полученные образцы фиксировались в 96% этиловом спирте с последующей окраской методом ШИК – Альциановый синий (Labiko, Россия). Оценка образцов осуществлялась с использованием инвертированного светового фазово-контрастного микроскопа IX81 (Olympus, Япония) с интегрированной цифровой фотокамерой XC10 (Olympus, Япония). Забор образцов осуществлялся в сроки до операции, через 7 дней, 1,3 и 6 месяцев после операции.

Результаты и обсуждение. При проведении импрессионной цитологии бульбарной конъюнктивы у пациентов с диагнозом синдром сухого глаза и у пациентов с исходно отсутствием признаков ксероза глазной поверхности до и после проведения кераторефракционной хирургии было отмечено различие в распределении плотности бокаловидных клеток в зависимости от зоны фиксации мазка-отпечатка на глазной поверхности, периода взятия образца (до и на сроках после операции), статуса глазной поверхности до операции и вида технологии лазерной коррекции зрения.

Выводы. Таким образом, цитологическое исследование конъюнктивы совместно со стандартным диагностическим модулем состояния глазной поверхности обеспечивает комплексную оценку патофизиологического звена в верификации диагноза синдрома сухого глаза у пациентов до и после проведения кераторефракционной хирургии.

**Ключевые слова:** синдром сухого глаза, бокаловидные клетки, слезная пленка, кераторефракционная хирургия.

Импрессионная цитология (ИЦ) (от латинского *impressio* – воздействие, вдавливание) представляет минимально инвазивный метод цитологического исследования поверхностных слоев глазной поверхности с применением для забора клеточного материала различных сорбирующих аппликаторов или фильтров [1; 2]. Данный метод был разработан в 1977 году двумя группами авторов: доктором R.W. Thatcher и его коллегами, предложившими для получения отпечатков эпителия бульбарной конъюнктивы использовать пластиковое устройство из полистирола в виде диска с рукояткой для обозначения разметки с последующей окраской мазка-отпечатка по Романовскому-Гимзе и красителем эозином -метиленовым синим по Райту [3; 4], и доктором P.R. Egbert и его

## THE MAIN ASPECTS OF THE IMPRESSION CYTOLOGY OF THE BULBAR CONJUNCTIVA

Doga A.V., Borzenok S.A., Mushkova I.A., Karimova A.N., Khubetsova M.Kh.,  
Ostrovskiy D.S., Obraztsova M.R.\*S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution of the Russian Ministry  
of Health, Moscow

**Abstract.** Background. It is well known that the conjunctival epithelium contains mucin-producing goblet cells and Langerhans dendritic cells. Goblet cells of the conjunctiva secrete soluble mucins into the water-mucin layer of the tear film, performing protective and regulatory functions. In this regard, to assess the condition of the water-mucin layer of the tear film, it is possible to conduct a cytological examination of the conjunctiva in order to verify the diagnosis of dry eye syndrome.

Purpose. To assess the condition of conjunctival goblet cells in refractive profile patients at the pre- and postoperative stages.

Materials and methods. In the course of the work, two study groups were formed: the first group is patients with a verified diagnosis of dry eye syndrome and the second group is patients with initially no signs of dry eye syndrome. Patients of both groups underwent impression cytology of the bulbar conjunctiva using JET BIOFIL MCE NYLON PVDF PES PTFE CA SFCA PES Express filters after local anesthesia. The obtained samples were fixed in 96% ethyl alcohol with subsequent coloring by the CHIC – Alcian blue method (Labiko, Russia). The samples were evaluated using an inverted light phase contrast microscope IX81 (Olympus, Japan) with an integrated digital camera XC10 (Olympus, Japan). Sampling was carried out in the time before the operation, 7 days, 1.3 and 6 months after the operation.

Results and discussion. During the impression cytology of the bulbar conjunctiva in patients diagnosed with dry eye syndrome and in patients with initially no signs of xerosis of the ocular surface before and after keratorefractive surgery, a difference was noted in the distribution of the density of goblet cells depending on the area of fixation of the smear imprint on the ocular surface, the period of sampling (before and after surgery), the status of the eye surface before surgery and the type of laser vision correction technology.

Conclusion. Thus, cytological examination of the conjunctiva together with the standard diagnostic module of the ocular surface condition provides a comprehensive assessment of the pathophysiological link in verifying the diagnosis of dry eye syndrome in patients before and after keratorefractive surgery.

**Keywords:** dry eye syndrome, goblet cells, tear film, keratorefractive surgery.

соавторами, осуществившими забор клеточного материала для проведения ИЦ с помощью аппликаторов из синтетической ацетатцеллюлозной фильтровальной бумаги с последующим окрашиванием полученного клеточного материала периодической кислотой Шиффа и морфологической оценкой клеток бульбарной конъюнктивы и выявление бокаловидных клеток с помощью световой микроскопии [4; 5]. Изучение методики забора и окрашивания клеточного материала продолжили доктор S.C. Tseng со своими соавторами и для повышения точности цитологического исследования добавили гематоксилин в протокол окрашивания клеточного материала реактивом Шиффа [4; 6; 7]. Одним из методов, использовавшихся для визуализации бокаловидных клеток конъюнктивы,

\* e-mail: Obraztsova.Maria@mail.ru

было окрашивание мазка-отпечатка красителем альциановым синим, предложенным доктором A.G. Pearse [8]. Альциановый синий избирательно окрашивает кислые мукополисахариды, содержащиеся в муцине бокаловидных клеток, в бирюзовый цвет [8; 9]. Помимо кислых мукополисахаридов бокаловидные клетки могут содержать и нейтральные мукополисахариды, что также требует визуализации при световой микроскопии [9]. Для этой идентификации был предложен способ с использованием реагента Шиффа при выполнении PAS (Шик)-реакции, где бокаловидные клетки, содержащие нейтральные мукополисахариды, приобретали пурпурное окрашивание [9–11]. На сегодняшний день актуальным протоколом окрашивания бокаловидных клеток является сочетанное использование красителя альцианового синего совместно с Шик-реакцией [4; 12; 13].

Традиционно ИЦ используют в верификации патологических процессов, происходящих в бульбарной конъюнктиве при синдроме сухого глаза (ССГ), синдроме Шегрена, плоскоклеточной неоплазии глазной поверхности, синдроме Стивенса-Джонсона, конъюнктивитах, дефицита витамина А, что позволяет контролировать и своевременно определять тактику и способы консервативного лечения таких пациентов [14; 15]. Например, доктор K.S. Khimani со своими коллегами из медицинского колледжа Бейлора США в первой части своего исследования продемонстрировали снижение плотности и уменьшение размера бокаловидных клеток в исследуемой площади у пациентов с диагнозом ССГ испарительной формы и у пациентов с диагнозом ССГ испарительной формы на фоне синдрома Шегрена по сравнению с контрольной группой, где были включены пациенты с исходно нормальным статусом глазной поверхности, и где не отмечалось статистически значимой разницы в распределении плотности и морфометрических параметрах бокаловидных клеток в контрольных сроках наблюдения [16]. В исследовательской работе медицинского факультета Афьонкарахисарского университета Турции у большинства пациентов с саркоидозом отмечались симптоматические признаки сухости глаз, которые подтверждались при выполнении общих стандартных методов исследования глазной поверхности – тест Ширмера-1, определение времени разрыва слезной пленки (ВРСП) и окрашивание глазной поверхности красителем флюоресцеина, а также и при выполнении ИЦ мазков-отпечатков, взятых с височной части бульбарной конъюнктивы, окрашенных PAS-реакцией и красителем гематоксилин-эозином, были обнаружены морфологические изменения характерные для плоскоклеточной метаплазии, более крупные и полигональные эпителиальные клетки с мелкими и пикнотичными ядрами и уменьшенные по количеству и размеру бокаловидные клетки с четко очерченными границами по сравнению с контрольной группой пациентов без саркоидоза и исходно нормальным статусом глазной

поверхности, что служит диагностическим маркером введения и контроля лечения пациентов с диагнозом саркоидоз и ССГ [17].

Интересным опытом поделились доктор Р. Кумар со своими коллегами из медицинского колледжа Сантоса Индии об отсутствии корреляционной связи чувствительности и специфичности тестов по определению ВРСП, исследованию слезопродукции при выполнении методики Ширмер-1 и окрашиванием глазной поверхности красителем бенгальским розовым и цитологическим исследованием мазков-отпечатков, взятых с нижней части бульбарной конъюнктивы, окрашенных PAS-реакцией, у пациентов с диагнозом ССГ испарительной формы, что послужило доказательным основанием считать результаты ИЦ лучшим предиктором морфологических и цитологических изменений в бульбарной конъюнктиве при постановке диагноза ССГ по сравнению с общепризнанным золотым стандартом [11]. Не менее дискуссионной работой стало исследование корреляции между клеточным биомаркером аутофагической гибели клеток бульбарной конъюнктивы – LC3 при выполнении ИЦ с последующей полимеразной цепной реакцией и стандартными функциональными тестами, определяющих статус глазной поверхности: тест-опросник OSDI, тест Ширмера-1, проба Норна, результаты которой подтвердили отсутствие корреляции между обычно используемыми клиническими диагностическими тестами при ССГ и клеточным биомаркером LC3, что подчеркивает недостаточность доступных клинических инструментов для оценки состояния глазной поверхности и многогранность ксероза глазной поверхности [18].

Исследования в этой области заставляют задуматься о пересмотре общепризнанной концепции золотого стандарта диагностики ССГ в клинической работе офтальмолога.

Диагностические возможности применения ИЦ развиваются и становятся актуальными и в исследованиях молекулярных и клеточных медиаторов воспаления глазной поверхности. За последние несколько лет исследования ИЦ бульбарной конъюнктивы способствовали углубленному пониманию патофизиологии ССГ, а также подтвердили, что воспаление глазной поверхности связано с клиническими проявлениями этого заболевания. Исследования ИЦ бульбарной конъюнктивы прояснили механизм действия воспаления глазной поверхности, где были показаны пусковые звенья Th1-опосредованного процесса ССГ – местные поверхностные клетки, выделяемые цитокины, нарушающие баланс глазной поверхности [14; 19]. Воспалительная сигнализация активирует повышение медиаторов воспаления – провоспалительных факторов: IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , и противовоспалительных факторов: IFN- $\gamma$ , IL-6, HLA-DR, что в свою очередь снижает плотность бокаловидных клеток конъюнктивы и выработку муцина – действующего строительного компонента водно-муцинового

слоя слезной пленки, вызывая стойкую хронизацию процесса [19–21].

Из-за многофакторной природы воспаления глазной поверхности необходимо оценивать качественный клеточный состав на предмет изменений в экспрессии генов или белков, чтобы выявить первопричинность патологического состояния и потенциально классифицировать результаты, полученные в ходе взятия мазка-отпечатка с бульбарной конъюнктивы, по этиологическим подтипам.

Исследовательская работа института биомедицинских наук Национального университета Сунь Ятсена Тайвань посвящена изучению экспрессии генов, связанных с аутофагией и с возрастной макулярной дегенерацией (ВМД) экссудативной формы. При выполнении ИЦ нижней части бульбарной конъюнктивы исследователи определили с помощью полимеразной цепной реакции уровни мРНК белков-ассоциированных генных структур, связанных с рецептором гамма-аминомасляной кислоты (GABARAPL1), и белков-ассоциированных генных структур (MAP1LC3B), связанных с процессом аутофагии, что послужило поводом доказательного критерия в диагностики ВМД экссудативной формы при взятии мазка-отпечатка с нижней части бульбарной конъюнктивы [22].

В фонде глазных исследований Хайдарабада Индии было проведено большое пилотное исследование о выявлении антигена вируса простого герпеса-1 (ВПГ-1) для диагностики герпетического кератита путем взятия мазка-отпечатка с поверхности роговицы с последующим проведением иммунопероксидазного или иммунофлуоресцентного анализа для выявления антигена ВПГ-1 с использованием поликлонального антитела к ВПГ-1. Итоги данной работы показали, что во всех случаях подтвержденного клинически диагноза герпетический кератит были обнаружены антиген ВПГ-1 во всех мазках-отпечатках, взятых с поверхности роговицы [23].

Таким образом, важным достоинством метода ИЦ является простота техники выполнения и достоверность получаемого результата, осуществимые и в амбулаторных условиях клинической офтальмологии для верификации диагноза, тактики введения пациентов и контроля схемы лечения.

### Заключение

Таким образом, диапазон применения импрессионной цитологии охватывает традиционную цитологическую оценку клеток глазной поверхности на предмет морфологического изучения, исследования молекулярных и клеточных медиаторов воспаления, оценку экспрессии генов путем определения уровней их транскриптов или белков, что характеризует данную методику как эффективный и безопасный метод диагностики в развитии как клинической, так и исследовательской офтальмологии.

**Вклад авторов в работу:** А.В. Дога, С.А. Борзенко, И.А. Мушкова – научное консультирование, редактирование статьи, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования; А.Н. Каримова, М.Х. Хубецова, Д.С. Островский – научная идея и дизайн работы, сбор данных, написание текста, редактирование статьи; М.Р. Образцова – сбор данных, написание текста.

Participation of the authors : A.V. Doga, S.A. Borzenok, I.A. Mushkova – scientific consulting, editing of the article, final approval of the version of the article for publication; A.N. Karimova, M.Kh. Khubetsova, D.S. Ostrovskiy – scientific idea and design of the work, data collection, writing of the text, editing of the article; M.R. Obraztsova – data collection, writing of the text.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).**

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Nelson JD. Impression cytology. *Cornea*. 1988;7(1):71-81.
- Nelson J D, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol*.1984;102(7):1049-51. doi:10.1001/archophth.1984.01040030851031.
- Thatcher RW, Darougar S, Jones, B. Conjunctival impression cytology. *Arch Ophthalmol*. 1977;95(4):678-681. doi: 10.1001/archophth.1977.04450040144022.
- Злобин И.А., Чурашов С.В., Куликов А.Н., Чирский В.С., Черныш В.Ф., Гаврилюк И.О. Импрессионная цитология как метод цитологической диагностики в офтальмологии. Обзор литературы. *Офтальмология*. 2023;20(1):53-60. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2023-1-53-60>. [Zlobin I.A., Churashov S.V., Kulikov A.N., Chirsky V.S., Chernysh V.F., Gavrilyuk I.O. Impression Cytology as a Method of Cytological Diagnostics in Ophthalmology. Literature Review. *Ophthalmology in Russia*. 2023; 20(1):53-60. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2023-1-53-60>. (in Russ.)].
- Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol*.1977;84(6):798-801. doi: 10.1016/0002-9394(77)90499-8.
- Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology*. 1985;92(6):728-733. doi: 10.1016/s0161-6420(85)33967-2.
- Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)*. 1989;3:141-157. doi: 10.1038/eye.1989.22.
- Pearse AG. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. 1960;1(2): 55-64.
- Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:330-337. doi: 10.1001/archophth.120.3.330.
- McManus JF. Histological and histochemical application of periodic acid. *Coloring Technology*.1948; 23(3): 99-108. doi: 10.3109/1052029480910-6232.
- Kumar P, Bhargava R, Kumar M, Ranjan S, Kumar M, Verma P. The Correlation of Routine Tear Function Tests and Conjunctival Impression Cytology in Dry Eye Syndrome. *Korean J Ophthalmol*. 2014; 28(2): 122-129. doi: 10.3341/kjo.2014.28.2.122.
- Nelson JD, Havener VR, Cameron JD. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. *Arch Ophthalmol*. 1983;101(12):1869-1872. doi: 10.1001/archophth.1983.01040020871007.
- Singh R, Joseph A, Umapathy T. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(12):1655-1659. doi: 10.1136/bjo.2005.073916.
- Pflugfelder SC, Tseng SC, Yoshino K, Monroy D, Felix C, Reis BL. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology*. 1997;104(2):223-235. doi: 10.1016/s0161-6420(97)30330-3.
- Shiboski SC, Shiboski CH, Criswell LA, Baer AN, Challacombe S, Lanfranchi H, Schiødt M, Umehara H, Vivino F, Zhao Y, Dong Y, Greenspan D,

- Heidenreich AM, Helin P, Kirkham B, Kitagawa K, Larkin G, Li M, Lietman T, Lindegaard J, McNamara N, Sack K, Shirlaw P, Sugai S, Vollenweider C, Whitcher J, Wu A, Zhang S, Zhang W, Greenspan JS, Daniels TE. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren's International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2012; 64(4):475-487. doi: 10.1002/acr.21591.
16. Khimani KS, Go JA, Souza RG, Mitchell T, Yu Z, Paiva CS, Saumur M, Stephen C. Regional Comparison of Goblet Cell Number and Area in Exposed and Covered Dry Eyes and Their Correlation with Tear MUC5AC. *Sci Rep*. 2020; 10: 2933. doi: 10.1038/s41598-020-59956-7.
17. Eroğul Ö, Balcı A, Gobeka H, Efe N, Akdoğan M, Oral AY, Doğan M, Özdemir Ç, Kaşıkçı M, Saraçlı S. Conjunctival Impression Cytology and Tear Film Changes in Sarcoidosis: A Subjective and Objective Diagnosis Study. *Turk J Ophthalmol*. 2023; 53(4): 200-205. doi: 10.4274/tjo.galenos.2022.58153.
18. Lin T, Filek R, Wang JM, Wu Ch.W, Liu H, Hutnik C. Impression cytology implicates cell autophagy in aqueous deficiency dry eye. *Clin Ophthalmol*. 2017; 11: 773-779. doi: 10.2147/OPHTH.S124889.
19. Pflugfelder SC, De Paiva CS, Moore QL, Volpe EA, Li DQ, Gumus K, Zaheer ML, Corrales RM. Aqueous tear deficiency increases conjunctival interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) expression and goblet cell loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7545-7550. doi: 10.1167/iovs.15-17627.
20. Nicolle P, Liang H, Reboussin E, Rabut G, Warcoïn E, Brignole-Baudouin F, Melik-Parsadaniantz S, Baudouin Ch, Labbe A, Goazigo AR. Proinflammatory markers, chemokines, and enkephalin in patients suffering from dry eye disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1221. doi: 10.3390/ijms19041221.
21. Goyal S, Chauhan SK, Zhang Q, Dana R. Amelioration of murine dry eye disease by topical antagonist to chemokine receptor 2. *Arch. Ophthalmol*. 2009;127(7):882-887. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.125.
22. Shu Ch.W, Bee YS, Chen JL, Tsen Ch.L, Tsai WL, Sheu SJ, Jan YK. Detection of Autophagy-Related Gene Expression by Conjunctival Impression Cytology in Age-Related Macular Degeneration. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(2): 296. doi: 10.3390/diagnostics11020296.
23. Athmanathan S, Bandlapally SR, Rao GN. Collection of corneal impression cytology directly on a sterile glass slide for the detection of viral antigen: An inexpensive and simple technique for the diagnosis of HSV epithelial keratitis – A pilot study. *BMC Ophthalmol*. 2001; 1: 3. doi: 10.1186/1471-2415-1-3.