

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА НЕМАТОFLOW

А.А. Савченко<sup>1</sup>, А.Г. Борисов<sup>1</sup>, Е.Н. Анисимова<sup>2</sup>, В.Д. Беленюк<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>3,4</sup>, И.В. Решетников<sup>5</sup>, С.В. Квятковская<sup>5</sup>, В.Э. Цейликман<sup>5</sup>, А.Н. Зорин<sup>6</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>5</sup> ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия

<sup>6</sup> КГБУЗ Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Целью исследования явилась оценка информативности метода Nematoflow при определении патогенетической значимости нарушения состояния клеточных реакций врожденного и адаптивного иммунитета, а также решения вопроса о назначении иммуностропного лечения больным онихомикозами. Обследовано 42 больных с онихомикозами стоп и кистей/стоп в возрасте 20–45 лет до назначения им системной антифунгальной терапии. Диагноз онихомикоза был подтвержден микроскопическим исследованием фрагментов поврежденной ногтевой пластинки. Рост культуры гриба на специальных средах отмечался у 64% обследованных. В качестве контроля обследовано 24 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе и проточном цитометре с использованием набора антител Cytodiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. Оценка фенотипического состава лейкоцитов с помощью метода Nematoflow позволила установить у больных онихомикозами нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета. Обнаружены незначительные изменения в популяционном составе гранулярных лейкоцитов в периферической крови больных, выражающиеся в увеличении содержания юных и сегментоядерных гранулоцитов. На фоне моноцитопении у больных онихомикозами повышается содержание «классических» моноцитов и снижается уровень «неклассических» моноцитов. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов крови выявляются у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет и сохраняются в течение всего заболевания. Наиболее выраженные изменения у больных онихомикозами обнаружены со стороны показателей адаптивного иммунитета. Лимфопения у данных больных реализуется за счет снижения количества незрелых и зрелых В-клеток, но при повышении содержания Т-лимфоцитов. Причем если содержание незрелых В-клеток снижается уже у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет, то изменение количества зрелых Т- и В-лимфоцитов выявляется при продолжительности заболевания 3–10 и более 10 лет. Данные изменения в содержании Т- и В-лимфоцитов отражают иммунопатогенетические процессы и определяют значимость Т- и В-клеточного иммунитета при онихомикозах. В целом, метод Nematoflow является информативным в оценке нарушения состояния клеточного

## Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ ИЭМ.  
Тел.: +7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

## Contacts:

Igor V. Kudryavtsev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,  
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

## Библиографическое описание:

Савченко А.А., Борисов А.Г., Анисимова Е.Н., Беленюк В.Д., Кудрявцев И.В., Решетников И.В., Квятковская С.В., Цейликман В.Э., Зорин А.Н. Исследование фенотипа лейкоцитов крови у больных онихомикозами с помощью метода Nematoflow // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 339–348. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-339-348

## Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Anisimova E.N., Belenyuk V.D., Kudryavtsev I.V., Reshetnikov I.V., Kvjatkovskaja S.V., Cejlikman V.Je., Zorin A.N. Blood leukocytes phenotyping by Nematoflow method in patients with onychomycosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 339–348. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-339-348

врожденного и адаптивного иммунитета. Он позволяет оценивать степень тяжести иммунопатологического процесса, механизм и уровень повреждения иммунной системы, можно рекомендовать его применение для персонализированного подхода к назначению иммуотропного лечения.

**Ключевые слова:** онихомикозы, метод Hematoflow, лейкоциты, субпопуляции моноцитов, Т-лимфоциты, В-лимфоциты.

## BLOOD LEUKOCYTES PHENOTYPING BY HEMATOFLOW METHOD IN PATIENTS WITH ONYCHOMYCOSIS

Savchenko A.A.<sup>a</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>, Anisimova E.N.<sup>b</sup>, Belenyuk V.D.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>c,d</sup>, Reshetnikov I.V.<sup>e</sup>, Kvjatkovskaja S.V.<sup>e</sup>, Cejlikman V.Je.<sup>e</sup>, Zorin A.N.<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>e</sup> South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation

<sup>f</sup> Krasnoyarsk Regional sexually transmitted infection clinic No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the investigation was to evaluate the information content of Hematoflow method in the pathogenetic significance in determining the violations of the cellular responses of innate and adaptive immunity, as well as the decision on the appointment of immunotropic treatment of patients with onychomycosis. The study involved 42 patients with onychomycosis feet and hands/feet at the age of 20–45 years before the appointment of a systemic antifungal therapy. The diagnosis of mycosis, onychomycosis was confirmed by microscopic examination of the fragments of the damaged nail plate. The growth of the fungus culture on special media was observed in 64% of patients. 24 healthy persons were examined as controls. A study of the phenotype of white blood cells was performed on a dual-platform technology hematology analyzer and flow cytometry using a set of antibodies Cytodiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. The phenotypic composition evaluation of the white blood cells by the Hematoflow method allowed to establish in patients with onychomycosis the violation cellular innate and adaptive immunity. Minor changes were detected in the population composition of granule cells in the peripheral blood of patients manifested to an increase in the content of the young and segmented granulocytes. When monotsitopeniya patients with onychomycosis increases the content of the «classic» monocytes and decreases the level of «non-classical» monocytes. Changes in the composition of blood monocytes subpopulation identified in patients with the infection lasting up to 3 years and stored in the course of the disease. The most pronounced changes were found in patients with onychomycosis by the performance of adaptive immunity. Lymphopenia in these patients is realized by reducing the number of immature and mature B-cell, but by increasing the content of T-lymphocytes. Moreover, if the content of immature B-cells have decreased in patients with a duration of infection of up to 3 years, the change in the number of mature T- and B-lymphocytes detected during disease duration 3–10 and 10 years. These changes in the content of T- and B-lymphocytes reflect immunopathogenetic processes and determine the importance of T- and B-cell immunity in onychomycosis. In general, the Hematoflow method is informative in assessing violations the cell of innate and adaptive immunity. It allows to evaluate the severity of the immunopathological process mechanism and the level of damage to the immune system, can recommend its use for a personalized approach to the appointment immunotropic treatment.

**Key words:** onychomycosis, method Hematoflow, leukocytes, subpopulations of monocytes, T-lymphocytes, B-lymphocytes.

Онихомикозы — одно из наиболее частых инфекционных поражений ногтевой пластинки, вызванных чаще всего патогенными или условно-патогенными грибами [7, 10, 17, 27]. По сравнению с другими грибковыми инфекциями кожи, онихомикоз наиболее трудно поддается лечению, часто возникают рецидивы [13, 25, 26]. Особенности развития и течения онихомикозной инфекции определяются не только самим этиологическим фактором, но и нарушением барьерной функции кожи, периферическими ангиопатиями, различными анатомическими дефектами и прочее.

В этиологии и патогенезе онихомикозов значительную роль играют нарушения в иммунной системе. В связи с тем, что онихомикозы

определяются как вялотекущее хроническое инфекционное заболевание, с иммунологических позиций его можно характеризовать как стойкое гипореактивное иммунное нарушение клеточно-эффекторного звена [2, 4, 15, 16, 23]. В связи с этим, в комплексной терапии онихомикозов для успешного лечения необходимо применять иммуотропные препараты [3, 11]. Однако для эффективного проведения иммуоактивной терапии необходимо осуществить высокоточные иммунологические исследования с оценкой как адаптивного, так и врожденного звеньев иммунитета. Таким комплексным анализом обладает метод Hematoflow с использованием комплекта реагентов Cytodiff для проведения цитофлуориметрических исследований [21,

24]. Данный метод основан на количественном определении всех основных популяций клеток иммунной системы — нейтрофильных гранулоцитов различного уровня дифференцировки, эозинофилов, субпопуляций моноцитов и лимфоцитов — в периферической крови, что позволяет оценить состояние врожденного и адаптивного клеточного иммунитета.

Целью данного исследования была оценка информативности метода Hematoflow при определении патогенетической значимости нарушения состояния клеточных реакций врожденного и адаптивного иммунитета, а также решение вопроса о назначении иммуноотропного лечения больным онихомикозами.

## Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1» обследовано 42 больных с онихомикозами стоп и кистей/стоп в возрасте 20–45 лет до назначения им системной антифунгальной терапии. Диагноз онихомикоза был подтвержден микроскопическим исследованием фрагментов поврежденной ногтевой пластинки в нативном препарате с 10% раствором КОН в 100% случаев. Рост культуры гриба на специальных средах, содержащих углеводы (среда Сабуро, картофельный агар с глюкозой, картофельно-морковный агар, среда ДТМ, среда Чапека–Докса, хромогенные среды), отмечался только у 64% обследованных. Спектр выявленных микромицетов: дерматомицеты — *Trichophyton* spp., *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Microsporum canis*; нитчатые недерматомицеты — *Aspergillus niger*, *Alternaria* spp., *A. alternate*, *Penicillini* spp.; дрожжи — *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Exophiala dermatitidis*, *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. Сочетанная микотическая инфекция (два возбудителя) была установлена у 6 больных с онихомикозом стоп. Основанием для включения пациентов в обследование была постановка диагноза на основании клинической картины заболевания и данных лабораторного обследования. Критерием исключения из обследования явилось наличие у пациентов сопутствующих хронических заболеваний. В качестве контроля обследовано 24 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Inc., США) и проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора антител Cytodiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с инструкцией изготовителя:

100 мкл цельной крови инкубировали с 10 мкл красителя Cytodiff в течение 20 мин при комнатной температуре. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ и подсчет процентного и абсолютного количества клеток проводились после регистрации 20 000 лейкоцитов с использованием программы автоматического гейтирования CytoDiff СХР (Beckman Coulter, США) [22].

Диагностика иммунных нарушений осуществлялась на основе методов и приемов, применяемых в клинике инфекционно-воспалительных заболеваний, и результатов лабораторно-иммунологического обследования с помощью метода Hematoflow [1, 2].

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и Microsoft Excel 10 (Microsoft, 2010). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентов ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между количественными показателями выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. С помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона производили оценку достоверности различий между качественными показателями.

## Результаты

При исследовании популяционного состава гранулярных лейкоцитов с помощью метода Hematoflow у больных онихомикозами обнаружено, что при грибковой инфекции повышено процентное и абсолютное количество юных гранулоцитов ( $SS^{high}CD2-CD16-CD294-CD45^{int}$ ) и увеличено относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов ( $SS^{high}CD16^+CD45^{high}$ ) (табл. 1). Необходимо отметить, что такое сопоставление результатов возможно при гейтировании популяций и субпопуляций лейкоцитов с использованием канала для регистрации «бокового» светорассеяния клеток (side scatter, SS). Данный параметр позволяет оценить свет, рассеянный как самой клеткой, так и ее органеллами, локализованными в цитоплазме, что дает возможность охарактеризовать структуру и гранулярность исследуемых лейкоцитов [6].

Процентное и абсолютное содержание общей популяции моноцитов в периферической крови у больных ониомикозами снижено относительно контрольных значений (табл. 2). Однако при оценке субпопуляционного состава моноцитов обнаружено, что если процентное количество «классических» моноцитов ( $SS^{int}CD2^{-}CD16^{-}CD19^{-}CD36^{+}CD294^{-}$ ) повышено по сравнению с контрольным уровнем, то их абсолютное содержание снижено за счет выраженного понижения абсолютного содержания общих моноцитов. Также у больных ониомикозами по сравнению с контрольными значениями снижено относительное и абсолютное содержание «неклассических» моноцитов ( $SS^{int}CD2^{-}CD16^{+}CD19^{-}CD36^{+}CD294^{-}$ ). Разнонаправленное изменение количества основных популяций моноцитов приводит к повышению уровня соотношения «классических» и «неклассических» моноцитов у обследованных пациентов.

Установлено, что при грибковой инфекции снижено процентное и абсолютное количество лимфоцитов (табл. 3). Более того, значительно меняется субпопуляционный состав лимфоидных клеток. Так, у обследованных пациентов в 1,36 раза снижено абсолютное количество Т-лимфоцитов ( $SS^{low}(CD2^{+}$  или  $CD294^{+})CD45^{high}$ ). При микозной инфекции обнаружено понижение относительного и абсолютного содержания популяции В-лимфоцитов ( $SS^{low}CD2^{-}CD16^{-}CD19^{+}CD294^{-}CD45^{high}$ ).

При исследовании фенотипа лейкоцитов крови методом Nematoflow у больных ониоми-

козами в зависимости от локализации грибкового поражения обнаружено, что единственным показателем, по которому выявляются различия у пациентов с поражением стоп и поражением кисти/стоп, является абсолютное содержание Т-лимфоцитов в периферической крови: при поражении стоп —  $n = 32$  (76,2%),  $Me = 1,20 \times 10^9/л$ ,  $C_{25} = 1,12 \times 10^9/л$ ,  $C_{75} = 1,40 \times 10^9/л$ ; при поражении кисти/стоп —  $n = 10$  (33,8%),  $Me = 1,48 \times 10^9/л$ ,  $C_{25} = 1,30 \times 10^9/л$ ,  $C_{75} = 1,60 \times 10^9/л$ ;  $p = 0,045$ . Различия исследуемых показателей с контрольными значениями в группах больных с поражением стоп и поражением кисти/стоп соответствуют представленным для общей группы больных ониомикозами.

Также нами проведено исследование фенотипического состава лейкоцитов периферической крови у больных ониомикозами в зависимости от возбудителя инфекции. Установлено, что единственным показателем, величина которого статистически значимо меняется в зависимости от возбудителя инфекции, является относительное количество моноцитов: при возбудителях рода *Candida* (группа 1) —  $n = 20$  (47,6%),  $Me = 6,5\%$ ,  $C_{25} = 4,7\%$ ,  $C_{75} = 8,2\%$ ; при дерматомицетах (группа 2) —  $n = 11$  (26,2%),  $Me = 7,3\%$ ,  $C_{25} = 6,2\%$ ,  $C_{75} = 7,8\%$ ; при ониобактериозах (группа 3) —  $n = 10$  (23,8%),  $Me = 9,2\%$ ,  $C_{25} = 7,2\%$ ,  $C_{75} = 9,8\%$ . Статистически значимые различия выявляются при сравнении групп 1 и 3, а также 2 и 3 ( $p = 0,011$  в обоих случаях).

При исследовании особенностей фенотипического состава лейкоцитов крови у больных

**ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИОМИКОЗАМИ (ME,  $C_{25}$ — $C_{75}$ )**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Лейкоциты, $10^9/л$	5,85 (4,90–7,05)	6,30 (4,60–7,30)	
Юные, %	0,0 (0,0–0,0)	0,07 (0,04–0,10)	< 0,001
Юные, $10^9/л$	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0039 (0,0024–0,0050)	< 0,001
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,14 (0,08–0,27)	0,10 (0,07–0,18)	
Палочкоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	0,008 (0,004–0,019)	0,006 (0,004–0,012)	
Сегментоядерные нейтрофилы, %	47,6 (42,4–51,9)	52,8 (47,0–58,5)	0,023
Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	2,53 (2,09–3,52)	2,51 (2,24–3,73)	
Эозинофилы, %	3,0 (1,8–4,0)	3,2 (2,2–4,7)	
Эозинофилы, $10^9/л$	0,15 (0,11–0,23)	0,18 (0,12–0,28)	
Базофилы, %	0,55 (0,23–0,74)	0,64 (0,15–0,89)	
Базофилы, $10^9/л$	0,027 (0,016–0,038)	0,038 (0,008–0,056)	

**ТАБЛИЦА 2. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Моноциты, %	8,8 (7,6–9,9)	7,2 (6,2–8,9)	0,002
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,52 (0,44–0,60)	0,36 (0,29–0,45)	< 0,001
Моноциты «классические», %	93,5 (91,1–95,5)	96,7 (95,2–98,0)	< 0,001
Моноциты «классические», 10 <sup>9</sup> /л	0,48 (0,41–0,57)	0,33 (0,28–0,45)	< 0,001
Моноциты «неклассические», %	6,5 (4,5–9,0)	3,3 (2,1–4,9)	< 0,001
Моноциты «неклассические», 10 <sup>9</sup> /л	0,029 (0,022–0,049)	0,013 (0,007–0,017)	< 0,001
Моноциты «классические»/ Моноциты «неклассические»	14,37 (10,18–21,10)	29,27 (19,62–47,55)	< 0,001

онихомикозами (в зависимости от продолжительности инфекции) обнаружено, что процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов повышается в группе больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет и остается высоким при длительности более 10-ти лет (табл. 4). Процентное и абсолютное содержание юных гранулоцитов повышено у больных онихомикозами независимо от продолжительности заболевания.

Относительное количество моноцитов в периферической крови больных онихомикозами понижается с периода 3–10 лет, тогда как абсолютное количество клеток уменьшается уже

с периода до 3-х лет и у больных с продолжительностью инфекции более 10-ти лет является минимальным (табл. 5). Процентное содержание «классической» популяции моноцитов повышено при онихомикозах уже с периода до 3-х лет и достигает максимума у больных с продолжительностью инфекции более 10-ти лет. Абсолютное количество моноцитов данной фракции у обследованных пациентов снижается относительно контрольных значений с периода 3–10 лет. Процентное и абсолютное количество «неклассических» моноцитов у больных онихомикозами снижено относительно контрольных значений

**ТАБЛИЦА 3. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Лимфоциты, %	37,9 (33,4–44,5)	34,1 (29,5–39,8)	0,044
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,23 (1,88–2,62)	1,67 (1,49–2,11)	< 0,001
Т-лимфоциты, %	74,1 (72,0–76,6)	76,2 (72,2–82,7)	
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,73 (1,37–2,07)	1,27 (1,13–1,51)	< 0,001
Незрелые Т-лимфоциты, %	0,06 (0,02–0,15)	0,48 (0,02–0,75)	
Незрелые Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,001 (0,0004–0,0046)	0,0063 (0,0004–0,0114)	
В-лимфоциты, %	11,5 (10,2–13,7)	8,3 (5,1–13,1)	0,021
В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,27 (0,21–0,32)	0,14 (0,08–0,24)	< 0,001
Незрелые В-лимфоциты, %	0,05 (0,03–0,07)	0,02 (0,01–0,03)	< 0,001
Незрелые В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,0010 (0,0006–0,0018)	0,0003 (0,0002–0,0005)	< 0,001
НК-клетки, %	12,8 (10,5–16,4)	12,0 (6,8–18,8)	
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л	0,32 (0,22–0,39)	0,24 (0,15–0,34)	

**ТАБЛИЦА 4. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	5,85 (4,90–7,05)	5,90 (4,70–6,95)	6,75 (5,70–7,30)	4,60 (3,75–6,65)
Юные, %	0,0 (0,0–0,0)	0,09 (0,06–0,11)***	0,06 (0,04–0,08)***	0,07 (0,04–0,10)***
Юные, 10 <sup>9</sup> /л	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0045 (0,0035–0,0062)***	0,0039 (0,0021–0,0049)***	0,0028 (0,0020–0,0057)***
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,14 (0,08–0,27)	0,09 (0,06–0,13)	0,11 (0,06–0,18)	0,13 (0,09–0,58)
Палочкоядерные нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,008 (0,004–0,019)	0,005 (0,004–0,007)	0,007 (0,004–0,012)	0,007 (0,005–0,033)
Сегментоядерные нейтрофилы, %	47,6 (42,4–51,9)	50,7 (46,8–53,8)	53,7 (50,1–58,5)*	57,3 (49,8–61,8)*
Сегментоядерные нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	2,53 (2,09–3,52)	2,48 (2,29–3,33)	2,70 (2,26–4,73)	2,71 (1,84–4,38)
Эозинофилы, %	3,0 (1,8–4,0)	2,9 (1,8–3,2)	4,2 (2,6–5,6)	3,9 (2,4–6,4)
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,15 (0,11–0,23)	0,13 (0,12–0,21)	0,23 (0,12–0,35)	0,19 (0,13–0,24)
Базофилы, %	0,55 (0,23–0,74)	0,86 (0,33–0,99)	0,57 (0,12–0,88)	0,35 (0,12–0,83)
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,027 (0,016–0,038)	0,044 (0,023–0,056)	0,032 (0,006–0,063)	0,021 (0,007–0,038)

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  статистически значимые различия с контрольными показателями.

уже с периода до 3-х лет и достигает минимума при продолжительности инфекции более 10-ти лет. В связи с этим, соотношение содержания «классических» и «неклассических» моноцитов при грибковой инфекции повышено с периода до 3-х лет и достигает максимума при продолжительности заболевания более 10-ти лет.

Относительное и абсолютное количество лимфоцитов, а также абсолютный уровень

T-лимфоцитов в периферической крови больных онхомикозами понижается при продолжительности инфекции 3–10 лет и остается сниженным у пациентов с продолжительностью заболевания более 10-ти лет (табл. 6). Процентное и абсолютное содержание незрелых T-лимфоцитов (SS<sup>low</sup>CD2<sup>+</sup>(CD16<sup>-</sup> или CD294<sup>-</sup>)CD45<sup>low</sup>) понижается при продолжительности заболевания 3–10 лет относительно уровней,

**ТАБЛИЦА 5. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Моноциты, %	8,8 (7,6–9,9)	7,7 (6,4–9,4)	7,1 (6,2–8,9)*	6,5 (4,2–7,1)**
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,52 (0,44–0,60)	0,41 (0,34–0,54)*	0,38 (0,29–0,45)**	0,30 (0,19–0,33)***
Моноциты «классические», %	93,5 (91,1–95,5)	96,2 (95,2–97,5)**	97,1 (93,1–98,1)**	98,1 (96,5–98,6)**
Моноциты «классические», 10 <sup>9</sup> /л	0,48 (0,41–0,57)	0,39 (0,32–0,51)	0,35 (0,28–0,45)**	0,29 (0,18–0,32)***
Моноциты «неклассические», %	6,5 (4,5–9,0)	3,8 (2,5–4,9)**	3,0 (2,0–7,0)**	1,9 (1,4–3,6)***♦
Моноциты «неклассические», 10 <sup>9</sup> /л	0,029 (0,022–0,049)	0,015 (0,008–0,022)***	0,015 (0,005–0,017)***	0,007 (0,004–0,008)***♦
Моноциты «классические»/ моноциты «неклассические»	14,37 (10,18–21,10)	25,33 (19,60–38,60)**	33,23 (13,37–48,07)**	51,13 (30,54–70,28)***♦

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  статистически значимые различия с контрольными показателями; # —  $p < 0,05$  статистически значимые различия с показателями больных с продолжительностью онхомикозов до 3-х лет; ♦ —  $p < 0,05$  статистически значимые различия с показателями больных с продолжительностью онхомикозов 3–10 лет.

**ТАБЛИЦА 6. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Лимфоциты, %	37,9 (33,4–44,5)	36,0 (32,3–44,3)	34,1 (31,3–38,0)*	31,5 (25,6–34,9)*
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,23 (1,88–2,62)	1,85 (1,57–2,24)	1,66 (1,49–2,01)**	1,43 (1,22–1,65)***#
Т-лимфоциты, %	74,1 (72,0–76,6)	76,9 (71,5–83,1)	75,7 (71,1–82,7)	77,5 (74,1–83,6)
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,73 (1,37–2,07)	1,33 (1,13–1,61)	1,36 (1,13–1,51)**	1,18 (0,90–1,29)**
Незрелые Т-лимфоциты, %	0,06 (0,02–0,15)	0,38 (0,01–0,88)	0,04 (0,02–0,59)#	0,68 (0,50–0,86)* ♦
Незрелые Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,001 (0,0004–0,0046)	0,0042 (0,0002–0,0086)	0,0011 (0,0003–0,0072)#	0,0098 (0,0048–0,0121)***# ♦
В-лимфоциты, %	11,5 (10,2–13,7)	11,3 (7,21–13,4)	7,2 (4,3–12,9)**	6,3 (4,8–10,4)*
В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,27 (0,21–0,32)	0,20 (0,12–0,31)	0,16 (0,08–0,24)*	0,09 (0,07–0,12)***# ♦
Незрелые В-лимфоциты, %	0,05 (0,03–0,07)	0,02 (0,02–0,05)*	0,01 (0,01–0,02)***#	0,03 (0,02–0,04)* ♦
Незрелые В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,0010 (0,0006–0,0018)	0,0004 (0,0002–0,0010)**	0,0003 (0,0002–0,0003)***#	0,0004 (0,0003–0,0005)**
НК-клетки, %	12,8 (10,5–16,4)	12,9 (6,0–18,6)	12,0 (9,1–18,8)	11,7 (9,2–19,5)
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л	0,32 (0,22–0,39)	0,26 (0,15–0,33)	0,22 (0,15–0,40)	0,20 (0,14–0,26)

**Примечание:** то же, что и для табл. 5.

выявленных у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет. При продолжительности инфекции более 10-ти лет содержание незрелых Т-лимфоцитов повышается как относительно контрольных значений, так и уровней, выявленных у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет. Процентное содержание В-лимфоцитов снижается с периода инфекции 3–10 лет. В то же время, абсолютное количество В-лимфоцитов также снижается с периода инфекции 3–10 лет, но у больных с продолжительностью заболевания более 10-ти лет является минимальным. Процентное и абсолютное количество незрелых В-лимфоцитов у больных с онихомикозами снижено относительно контрольных значений, но у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет является минимальным по сравнению с другими периодами заболевания.

## Обсуждение

К настоящему времени вопрос об иммунной составляющей в патогенезе грибковой инфекции полностью еще не разрешен. Известно, что антигены грибов обладают слабой иммуногенностью [4, 30]. Основные защитные механизмы

реализуются за счет клеточных звеньев системы неспецифической резистентности и адаптивного иммунитета. Действительно, при обследовании больных онихомикозами обнаружено повышение количества юных гранулоцитов, невыраженная реакция со стороны нейтрофильных гранулоцитов и снижение уровня моноцитов в периферической крови. Необходимо отметить, что у большинства обследованных пациентов отмечается длительное течение грибковой инфекции, поэтому ожидать более выраженной реакции со стороны гранулоцитов не приходится.

Кроме полной характеристики популяционного состава гранулоцитов крови, метод *Нemato-flow* позволяет охарактеризовать субпопуляционный состав моноцитов. Все циркулирующие моноциты по фенотипическим характеристикам делятся на две основные субпопуляции, различающиеся по уровню экспрессии CD16. CD16-антиген является низкоаффинным Fc-рецептором для IgG [9, 14, 19]. Моноциты, не экспрессирующие CD16-антиген, определяются как «классические» [5, 8, 18]. Данная фракция представлена крупными клетками с высоким уровнем фагоцитарной активности. Для данной субпопуляции характерны повышенный уровень

экспрессии CCR2, CD36, CD64, CD62L и низкий уровень синтеза фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкина-1, а также высокая активность ферментов, осуществляющих «респираторный взрыв» [12, 20, 28]. «Неклассические» моноциты (экспрессирующие CD16-антиген) определяются как сравнительно небольшие клетки с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью, и, соответственно, с пониженным уровнем «респираторного взрыва». На их поверхности хорошо представлены CX3CR1, CD11c и HLA-DR, тогда как CD62L и CD64 практически отсутствуют [31]. Соответственно, повышение количества «классических» моноцитов и снижение содержания «неклассических» моноцитов (что также подтверждается уровнем их соотношения) у больных онихомикозами можно определить как реакцию иммунитета на возбудитель, отражающую значимость фагоцитарных процессов в иммунопатогенезе заболевания. Примечательно, что изменение субпопуляционного состава моноцитов проявляется уже в группе больных с длительностью инфекции до 3-х лет. Следовательно, вовлечение данной фракции клеток в иммунопатогенез онихомикозов, по-видимому, осуществляется с момента попадания патогена.

При анализе популяционного состава лимфоцитов периферической крови обнаружено, что лимфопения у больных онихомикозами является следствием преимущественного снижения количества В-лимфоцитов (как зрелых, так и незрелых форм). Причем, при анализе популяционного состава лимфоцитов крови при грибковой инфекции установлено, что содержание незрелых В-лимфоцитов снижается уже у больных с продолжительностью заболевания до 3-х лет, тогда как уровень зрелых В-лимфоцитов понижается у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет и более 10-ти лет. Также обнаружено, что количество незрелых Т-лимфоцитов значительно повышается у больных с продолжительностью заболевания более 10-ти лет. Защитная роль гуморального иммунитета при микозах не выражена [4, 23, 29]. В связи с этим можно предположить, что с начала инфекционного процесса запускаются иммунные механизмы, ингибирующие В-лимфопоэз. В то же время длительная персистенция грибов в организме стимулирует реакцию со стороны Т-клеточного звена иммунитета, что и проявляется в повышении количества Т-лимфоцитов у больных онихомикозами с продолжительностью инфекции более 10-ти лет.

На основе клинико-иммунологического анамнеза и лабораторных результатов, у больных онихомикозами определялись механизм и уровень повреждения иммунной системы, а также степень тяжести иммунопатологического процесса [1, 2]. Обнаружено, что у большинства пациентов

выявляется гипореактивный механизм повреждения иммунной системы (34 (81,0%), сочетанный механизм — у 8 (19,0) больных,  $p < 0,001$ ). Клеточно-эффекторный уровень повреждения выявлялся у 32 (76,2%) обследованных пациентов, тогда как комбинированный — у 10 (23,8%) ( $p < 0,001$ ). Макрофагально-фагоцитарный, гуморально-эффекторный и регуляторный уровень повреждения иммунной системы у больных онихомикозами не выявлялся. С легкой степенью тяжести повреждения иммунной системы выявлялось 22 (52,3%) пациента, со среднетяжелой — 18 (42,9%), с тяжелой степенью — 2 (4,8%). Учитывая, что диагностика и дальнейшая коррекция иммунных нарушений необходима для назначения эффективной терапии при онихомикозах, можно рекомендовать метод Nematoflow как комплексный метод оценки врожденного и адаптивного иммунитета в дерматологической практике.

Таким образом, оценка фенотипического состава лейкоцитов с помощью метода Nematoflow позволила установить у больных онихомикозами нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета. Обнаружены незначительные изменения в популяционном составе гранулярных лейкоцитов в периферической крови больных, выражающиеся в увеличении содержания юных и сегментоядерных гранулоцитов. На фоне моноцитопении, у больных онихомикозами повышается содержание «классических» моноцитов и снижается уровень «неклассических» моноцитов. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов выявляются у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет и сохраняются в течение всего заболевания. Наиболее выраженные изменения у больных онихомикозами обнаружены со стороны показателей адаптивного иммунитета. Лимфопения у данных больных реализуется за счет снижения количества незрелых и зрелых В-клеток, на фоне повышения содержания Т-лимфоцитов. Причем если содержание незрелых В-клеток снижается уже у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет, то изменение количества зрелых Т- и В-лимфоцитов выявляется при продолжительности заболевания 3–10 и более 10 лет. Данные изменения в содержании Т- и В-лимфоцитов отражают иммунопатогенетические процессы и определяют значимость Т- и В-клеточного иммунитета при онихомикозах. В целом, метод Nematoflow является информативным в оценке нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета и он позволяет оценивать степень тяжести иммунопатологического процесса, механизм и уровень повреждения иммунной системы; можно рекомендовать его применение для персонализированного подхода к назначению иммуноотропного лечения.



## Список литературы/References

1. Борисов А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 1. С. 45–50. [Borisov A.G. Clinical characteristics of the dysfunction of the immune system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 45–50. doi: 10.15789/1563-0625-2013-1-45-50 (In Russ.)]
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал. 2008. Т. 23, № 3. С.13–18. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Smirnova S.V. On the classification of violations of the functional state of the immune system. *Sibirskii meditsinskii zhurnal = Siberian Medical Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 13–18. (In Russ.)]
3. Васенова В.Ю., Пичугин А.В., Бутов Ю.С., Атауллаханов Р.И. Влияние комплексной терапии онихомикоза на клинико-иммунологические параметры. Сообщение 3 // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2008. № 2. С. 48–51. [Vasenova V.Ju., Pichugin A.V., Butov Ju.S., Ataullahanov R.I. Influence of complex therapy for onychomycosis clinical and immunological parameters. Message 3. *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2008, no. 2, pp. 48–51. (In Russ.)]
4. Васенова В.Ю., Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Бутов Ю.С. Особенности иммунного статуса больных онихомикозом. Сообщение 1 // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2007. № 4. С. 63–66. [Vasenova V.Ju., Ataullahanov R.I., Pichugin A.V., Butov Ju.S. Features of the immune status of patients with onychomycosis. Message 1. *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2007, no. 4, pp. 63–66. (In Russ.)]
5. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 305–312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudryavtsev I.V., Grigor'ev E.V., Velikanova E.A., Bajrakova Ju.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 305–312. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-305-312 (In Russ.)]
6. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: Редакционно-издательский отдел Уральского отделения РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Hajdukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. *Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii* [Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: Publishing department of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2013. 552 p.]
7. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н., Шадривова О.В., Борзова Ю.В., Васильева Н.В. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели Life program // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16, № 1. С. 3–8. [Klimko N.N., Kozlova Ja.I., Hostelidi S.N., Shadrivova O.V., Borzova Ju.V., Vasil'eva N.V. The incidence of severe and chronic mycotic diseases in the Russian Federation on the model of Life program. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 3–8. (In Russ.)]
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 141–150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. The phenotypic composition and chemiluminescent activity of monocytes in patients with renal cell cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150 (In Russ.)]
9. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ НК- и НКТ-клеток у больных почечноклеточным раком // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1012–1018. [Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V., Tonacheva O.G., Borisov A.G. The cytometric analysis NK- and NKT-cells in patients with renal cell cancer. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8 (17), no. 4, pp. 1012–1018. (In Russ.)]
10. Сергеев Ю.В., Касихина Е.И. Онихомикозы: современные подходы к лечению // Вестник дерматологии и венерологии. 2009. № 5. С. 117–119. [Sergeev Ju.V., Kasikhina E.I. Onychomycosis: modern approaches to treatment. *Vestnik dermatologii i venerologii = Journal of Dermatology and Venereology*, 2009, no. 5, pp. 117–119. (In Russ.)]
11. Ameen M., Lear J.T., Madan V., Mohd Mustapa M.F., Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *Br. J. Dermatol.*, 2014, vol. 171, no. 5, pp. 937–958. doi: 10.1111/bjd.13358
12. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, vol. 152, no. 1, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.004
13. Baraldi A., Jones S.A., Guesné S., Traynor M.J., McAuley W.J., Brown M.B., Murdan S. Human nail plate modifications induced by onychomycosis: implications for topical therapy. *Pharm. Res.*, 2015, vol. 32, no. 5, pp. 1626–1633. doi: 10.1007/s11095-014-1562-5
14. Bhatnagar N., Ahmad F., Hong H.S., Eberhard J., Lu I.N., Ballmaier M., Schmidt R.E., Jacobs R., Meyer-Olson D. FcγRIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcγRII (CD32). *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 11, pp. 3368–3379. doi: 10.1002/eji.201444515
15. Brasch J., Köppl G. Persisting onychomycosis caused by *Fusarium solani* in an immunocompetent patient. *Mycoses*, 2009, vol. 52, no. 3, pp. 285–286. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01591.x
16. Bruserud O. Bidirectional crosstalk between platelets and monocytes initiated by Toll-like receptor: an important step in the early defense against fungal infections? *Platelets*, 2013, vol. 24, no. 2, pp. 85–97. doi: 10.3109/09537104.2012.678426
17. Bunyaratavej S., Pattanaprichakul P., Leeyaphan C., Chayangsu O., Bunyaratavej S., Kulthanan K. Onychomycosis: a study of self-recognition by patients and quality of life. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2015, vol. 81, no. 3, pp. 270–274. doi: 10.4103/0378-6323.154796
18. Burbano C., Vasquez G., Rojas M. Modulatory effects of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes on CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes: a possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, vol. 66, no. 12, pp. 3371–3381. doi: 10.1002/art.38860

19. Döbel T., Kunze A., Babatz J., Tränkner K., Ludwig A., Schmitz M., Enk A., Schäkel K. FcγRIII (CD16) equips immature 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells (slanDCs) with a unique capacity to handle IgG-complexed antigens. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 18, pp. 3609–3618. doi: 10.1182/blood-2012-08-447045
20. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*. 2012, vol. 381, no. 1–2, pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.003
21. Jo Y., Kim S.H., Koh K., Park J., Shim Y.B., Lim J., Kim Y., Park Y.J., Han K. Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method. *Korean J. Lab. Med.*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 131–137. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.3.131
22. Kahng J., Kim Y., Kim M., Oh E.J., Park Y.J., Han K. Flow cytometric white blood cell differential using CytoDiff is excellent for counting blasts. *Ann. Lab. Med.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 28–34. doi: 10.3343/alm.2015.35.1.28
23. Kaya T.I., Eskandari G., Guvenc U., Gunes G., Tursen U., Burak Cimen M.Y., Ikizoglu G. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells in patients with toenail onychomycosis. *Arch. Dermatol. Res.*, 2009, vol. 301, no. 10, pp. 725–729. doi: 10.1007/s00403-009-0941-y
24. Kim A.H., Lee W., Kim M., Kim Y., Han K. White blood cell differential counts in severely leukopenic samples: a comparative analysis of different solutions available in modern laboratory hematology. *Blood Res.*, 2014, vol. 49, no. 2, pp. 120–126. doi: 10.5045/br.2014.49.2.120
25. Leelavathi M., Noorlaili M. Onychomycosis nailed. *Malays Fam. Physician.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 2–7.
26. Lipner S.R., Scher R.K. Onychomycosis: current and investigational therapies. *Cutis*, 2014, vol. 94, no. 6, pp. 21–24.
27. Rosen T., Friedlander S.F., Kircik L., Zirwas M.J., Stein Gold L., Bhatia N., Gupta A.K. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. *J. Drugs Dermatol.*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 223–233.
28. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 67, no. 2, pp. 152–159. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
29. Trzeciak-Ryzek A., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. Antifungal immunity in selected fungal infections. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2015, vol. 69, pp. 469–474 doi: 10.5604/17322693.1148747
30. Wüthrich M., Brandhorst T.T., Sullivan T.D., Filutowicz H., Sterkel A., Stewart D., Li M., Lerksuthirat T., LeBert V., Shen Z.T., Ostroff G., Deepe G.S. Jr, Hung C.Y., Cole G., Walter J.A., Jenkins M.K., Klein B. Calnexin induces expansion of antigen-specific CD4(+) T cells that confer immunity to fungal ascomycetes via conserved epitopes. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, no. 4, pp. 452–465. doi: 10.1016/j.chom.2015.02.009
31. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 16, pp. 74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

**Авторы:**

**Савченко А.А.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Борисов А.Г.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Анисимова Е.Н.**, к.м.н., зав. кафедрой ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;  
**Беленюк В.Д.**, аспирант ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; старший научный сотрудник кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия;  
**Решетников И.В.**, биолог иммунологической лаборатории ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Квятковская С.В.**, к.м.н., зав. лабораторией ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Цейликман В.Э.**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Зорин А.Н.**, клинический миколог КГБУЗ Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Anisimova E.N.**, PhD (Medicine), Head of the Department, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Belenyuk V.D.**, PhD Candidate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Senior Researcher, Department of Fundamental Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation;  
**Reshetnikov I.V.**, Biologist of the Immunology Laboratory, South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Kvjatkovskaja S.V.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory, South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Cejlikman V.Je.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Zorin A.N.**, Clinical Mycologist, Krasnoyarsk Regional Sexually Transmitted Infection Clinic No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation.