

УДК 612.112-084«46»:612.592

В.В. Ломако^{1*}, Л.М. Піроженко²

Лейкоцити крові молодих і старих щурів після загальної кріостимуляції (–120°C)

UDC 612.112-084«46»:612.592

V.V. Lomako^{1*}, L.M. Pirozhenko²

Blood Leukocytes in Young and Aged Rats After Whole Body Cryostimulation (–120°C)

Реферат: Загальна кріостимуляція (ЗКС) (–120°C) викликає значні зміни лейкоцитарних показників крові у молодих і старих щурів (загальної кількості лейкоцитів (лейкоцитоз або лейкопенія), кількісно-якісного співвідношення їх типів і напрям зсуву лейкоцитарної формули); появу юних, плазматичних і поліхроматофільних клітини, плазматизацію цитоплазми у деяких лейкоцитів, а також інтегральних лейкоцитарних індексів. Спрямованість і вираженість цих змін залежить від віку тварин (6–7 або 18–20-місячні), кількості проведених сеансів ЗКС (1, 2 чи 3), а також термінів спостереження (через добу і тиждень) і свідчить про фізіологічні перебудови в організмі, які можуть бути пов'язані з перенапруженням задіяних функціональних систем і стресом. Через 24 години після 2-го сеансу ЗКС лише у старих щурів відсоток лімфоцитів відповідає нижньому значенню контролю, що указує на формування реакції тренування на цьому етапі. Інтегральні лейкоцитарні індекси у старих щурів змінюються на відміну від молодих значно менше, особливо через добу та тиждень після ЗКС. Індекс адаптації Гаркаві збільшується лише у старих щурів і тільки через 24 години після 3-го сеансу ЗКС.

Ключові слова: кріостимуляція, лейкоцити, інтегральні лейкоцитарні індекси, вік, щури.

Abstract: The whole body cryostimulation (WBC) (–120°C) induces significant changes in blood leukocyte parameters in young and aged rats (total leukocyte number (leukocytosis or leukopenia); quantitative and qualitative correlation of their types, and shift direction in leukocyte formula); appearance of immature, plasm and polychromatophilic cells, cytoplasm plasmatisation in some leukocytes, and changes in the integral leukocyte indices. The direction and severity of these changes depend on animals age (6–7 or 18–20 months old), number of the WBC sessions (1, 2 or 3), terms of observation (day and week) and mainly indicates physiological alterations in a body, that may be associated with the strain of involved functional systems and stress. In aged rats only, 24 hrs after the 2nd WBC session the lymphocyte percentage corresponded to a lower control value, thus indicating the training response formation at this stage. The integral leukocyte indices of aged rats underwent considerably smaller changes if compared with the young ones, especially in 24 hrs and a week after the WBC; the Garkavi adaptation index increased only in aged rats and just 24 hrs after the 3rd WBC session.

Key words: whole body cryostimulation, leukocytes, integral leukocyte indices, age, rats.

В останні роки в медицині, зокрема спортивній і відновлювальній, широкого розповсюдження набувають методи кріостимуляції/кріотерапії [15–21, 23, 25, 29], крім того з'являються дослідження, присвячені їх використанню й у ветеринарії [24]. Було підтверджено проти-запальні, протибольові та антиоксидантні ефекти кріостимуляції організму, визначено основні фізіологічні реакції та продемонстровано її профілактичну стратегію за умов фізичного перевантаження. Припускають, що загальна кріостимуляція (ЗКС) може модифікувати імунологічні реакції, впливати на мобілізацію лейкоцитів та вміст цитокінів [20]. Однак досі не визначено

Recently, the cryostimulation / cryotherapy have become widespread in medicine, in particular in sports and rehabilitation [4, 9, 10, 12–15, 19, 23, 29], moreover there are the reports about their use in veterinary medicine [20]. There have been confirmed the anti-inflammatory, anesthetic and antioxidant effects of body's cryostimulation, determined the main physiological responses and shown its preventive strategy under high intensity training. The whole body cryostimulation (WBC) is suggested as able to modify the immunological responses, and affect the leukocytes mobilization and cytokine content [14]. However, the optimal temperature, number and periodicity of the WBC sessions have

¹Відділ кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

²КНП «Люботинська городська лікарня» ЛГХО, м. Люботин, Україна

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Municipal Nonprofit Organization 'Lyubotyn Town Hospital' of Lyubotyn Town Council of Kharkiv Region, Lyubotyn, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: probl.cryobiol.cryomed@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: probl.cryobiol.cryomed@gmail.com

Надійшла 24.01.2019

Прийнята до друку 08.02.2021

Received January, 24, 2019

Accepted February, 08, 2021

© 2021 V.V. Lomako, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

оптимальну температуру, кількість і періодичність сеансів ЗКС. Зазвичай короточасні кріовпливи здійснюються у спеціальній кріокамері, у якій температура повітря підтримується у діапазоні $-60...-160^{\circ}\text{C}$, один сеанс триває 2–3 хв, а повний курс складається з 3–20 процедур ЗКС. Слід зазначити, що після порівняльного вивчення впливів кріостимуляції, холодної води і плацебо деякі дослідники ставлять під сумнів перевагу використання ЗКС у якості стратегії відновлення після напружених тренувань [27, 28], а С. Mawhinney та співавт. [22] показують, що занурення у холодну воду має зрівняний зі ЗКС ефект. Крім того, багато з відповідних реакцій функціональних систем організму на вплив ЗКС залишаються ще невивченими.

Зміною стану системи крові та її високо-спеціалізованих клітин (еритроцитів, лейкоцитів тощо) обумовлюються ступінь резистентності, вираженість патологічних порушень та здатність організму до адаптації. Між вмістом окремих типів лейкоцитів у крові існують певні співвідношення, аналіз яких за лейкоцитарною формулою є надійним лабораторним маркером, що має істотне діагностично-прогностичне значення. Характер таких змін залежить від індивідуальних параметрів, статі, віку і умов проживання людини, впливу ендо- і екзогенних факторів тощо [1, 7, 8, 14]. Раніше було показано, що вираженість і спрямованість коливань співвідношення різних типів лейкоцитів та інтегральних лейкоцитарних індексів у молодих щурів певною мірою визначається видом та інтенсивністю холодового впливу, температурою тіла, хоча такі коливання можуть бути подібними або відрізнятися [10].

Мета роботи – вивчення впливу загальної кріостимуляції тіла (-120°C) на співвідношення різних типів лейкоцитів крові молодих і старих щурів та інтегральні лейкоцитарні індекси.

Матеріали і методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, погоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Роботу виконували в осінньо-зимовий період на молодих (6–7-місячних) і старих (18–20-місячних) самцях білих безпородних щурів, яких до початку експерименту утримували в умовах віварію за природного світлового режиму та на стандартному раціоні *ad libitum*.

not been determined yet. Usually, the short-term cryoexposures are performed in a special cryochamber, where the air temperature is maintained within the range of $-60...-160^{\circ}\text{C}$, one session lasts 2–3 min, and a complete course comprises 3–20 WBC procedures. Notably, that after comparative study of cryostimulation, cold water and placebo effects, some researchers have disputed the advantage of using the WBC as the recovery strategy after intense training [26, 27], and С. Mawhinney *et al.* [16] have shown the immersion into cold water to have an effect equivalent to the WBC. In addition, many of the relevant responses of body's functional systems to the WBC effect are still poorly studied.

Changes in state of blood system and its highly specialized cells (erythrocytes, leukocytes, *etc.*) stipulate the resistance degree, the severity of pathological disorders and a body's ability of adaptation. There are the certain ratios between the content of specific types of leukocytes in blood, the analysis of which using the leukocyte formula is a reliable laboratory marker of significant diagnostic and prognostic value. The nature of these changes depends on individual parameters, sex, age and living conditions of individual, the impact of endogenous and exogenous factors, *etc.* [1, 5, 6, 21]. Previously, the severity and direction of ratio fluctuations in different types of leukocytes and the integral leukocyte indices in young rats were shown as somewhat determined by the type and intensity of cold exposure, body temperature, although such fluctuations might be similar or differ [11].

Here, we aimed to study the impact of the whole body cryostimulation (-120°C) on ratio of different types of blood leukocytes in young and aged rats, as well as the integral leukocyte indices.

Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, in accordance with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986). The research was conducted in the autumn-winter period in young (6–7-month-old) and aged (18–20-month-old) white outbred male rats, prior to experiment housed in animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum*.



Загальну кріостимуляцію здійснювали в кріокамері для охолодження дрібних лабораторних тварин [3]. Тривалість холодового впливу за температури -120°C становила 90 с із 24-годинним інтервалом, загалом було проведено три сеанси (раз на добу). Забір крові, як і фрагментів інших тканин для біохімічних і морфологічних досліджень, проводили після декапітації тварин. Щури кожного віку були розділені на 9 груп (по 5 тварин у кожній): 1 – контроль; 2–4 – після 1–3-го сеансів ЗКС відповідно, 5–7 – через 24 години після 1–3-го сеансів ЗКС відповідно, 8–9 – через тиждень після 1 та 3-го сеансів ЗКС відповідно.

Кількісно-якісну оцінку типів лейкоцитів здійснювали в мазках крові, оброблених фіксатором Май-Грюнвальда («МініМед», Росія) і забарвлених гематологічним барвником за Романовським («МініМед»), рахували по 100–200 клітин у кожному зразку. Загальну кількість лейкоцитів визначали в камері Горяєва. Розраховували наступні інтегральні лейкоцитарні індекси (ЛІ) [10–13]: індекс ядерного зсуву ($\text{ІЯЗ} = (\text{Мі} + \text{Ю} + \text{П})/\text{С}$); лейкоцитарний індекс ($\text{ЛІ} = \text{Л}/\text{Н}$); лейкоцитарний індекс інтоксикації Кальф-Каліфа ($\text{ЛІІ} = (4\text{Мі} + 3\text{Ю} + 2\text{П} + \text{С}) \times (\text{ПК} + 1)/(\text{Л} + \text{М}) \times (\text{Е} + 1)$); індекс зсуву лейкоцитів ($\text{ІЗЛ} = (\text{Е} + \text{Б} + \text{С} + \text{П})/\text{Л} + \text{М}$); лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс ($\text{ЛІГІ} = 10\text{Л} / (\text{Мі} + \text{Ю} + \text{П} + \text{С} + \text{Е} + \text{Б})$); індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів ($\text{ІСНЛ} = \text{П} + \text{С}/\text{Л}$); індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів ($\text{ІСЛЕ} = \text{Л}/\text{Е}$); індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів ($\text{ІСНМ} = \text{Н}/\text{М}$); індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів ($\text{ІСЛМ} = \text{Л}/\text{М}$); індекси алергізації ($\text{ІА} = \text{Л} + 1 - (\text{Е} + 1)/\text{П} + \text{С} + \text{М}$) та адаптації Гаркаві ($\text{ІАГ} = \text{Л}/\text{С}$).

Скорочення у наданих формулах означають типи клітин: П – паличко- та С – сегментоядерні лейкоцити; Л – лімфоцити; М – моноцити; Н – нейтрофіли; Е – еозинофіли; Б – базофіли; Мі – мієлоцити; Ю – юні форми (метамієлоцити), ПК – плазматичні клітини (вміст у відсотках).

Статистичну обробку результатів проводили за методом непараметричної статистики Крускала-Уолліса з використанням програмного забезпечення «Statistica 6.0» («MatStat Inc.», США).

Результати та обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що загальна кількість лейкоцитів у крові молодих щурів декілька збільшувалася відразу після 2-го сеансу ЗКС та через тиждень спостереження, зменшувалася (лейкопенія) після 3-го та через 24 години після 1-го сеансів. У старих щурів спостерігали зниження цього показника після 1-го сеансу та значне підвищення (лейкоцитоз)

The whole body cryostimulation procedure was performed in a cryochamber designated for the cooling of small laboratory animals [3]. The duration of cold exposure at -120°C was 90s with a 24-hours interval, a total of three sessions (once a day). The blood as well as others tissue samples for biochemical and morphological investigation were collected after animals decapitation. Rats of each age were divided into 9 groups (5 animals in each): group 1 was the control; groups 2–4 comprised the animals after 1–3 sessions of the WBC respectively; groups 5–7 were those in 24 hrs after 1–3 sessions of the WBC respectively; groups 8–9 consisted of animals a week after the 1st and 3rd WBC sessions respectively.

The leukocyte types were quantitatively and qualitatively assessed in blood smears fixed with May-Grunwald (MiniMed, Russia) and stained with hematological dye according to Romanowsky (MiniMed), by counting 100–200 cells in each sample. The total leukocyte number was determined in Goryaev chamber. There were calculated the following integral leukocyte indices (ILIs) [11, 17, 18, 22] such as: the nuclear shift index ($\text{NSI} = (\text{MCs} + \text{MMCs} + \text{BLs})/\text{SLs}$); the leukocyte index ($\text{LI} = \text{L}/\text{N}$); the leukocyte index of intoxication by Kalf-Kalif ($\text{LII} = (4\text{MCs} + 3\text{MMCs} + 2\text{BLs} + \text{SLs}) \times (\text{PCs} + 1)/(\text{L} + \text{M}) \times (\text{E} + 1)$); the leukocyte shift index ($\text{LSI} = (\text{E} + \text{B} + \text{SLs} + \text{BLs})/\text{L} + \text{M}$); the lymphocyte-granulocyte index ($\text{LGI} = 10\text{L}/(\text{MCs} + \text{MMCs} + \text{BLs} + \text{SLs} + \text{E} + \text{B})$); the index of neutrophil to lymphocyte ratio ($\text{INLR} = \text{BLs} + \text{SLs}/\text{L}$); the index of lymphocytes to eosinophil ratio ($\text{ILER} = \text{L}/\text{E}$); the index of neutrophil to monocytes ratio ($\text{INMR} = \text{N}/\text{M}$); the index of lymphocyte to monocyte ratio ($\text{ILMR} = \text{L}/\text{M}$); the indices of allergization ($\text{IA} = \text{L} + 1 - (\text{E} + 1)/\text{BLs} + \text{SLs} + \text{M}$) and Garkavi adaptation index ($\text{GAI} = \text{L}/\text{SLs}$)

The abbreviations in the above formulae mean the cell types such as: BLs – band and SLs – segmental leukocytes; L – lymphocytes; M – monocytes; N – neutrophils; E – eosinophils; B – basophils; MCs – myelocytes; MMCs – metamyelocytes (immature cells), PCs – plasm cells (expressed in percentage).

The obtained results were statistically processed using the non-parametric Kruskal-Wallis statistic method with Statistica 6.0 software (MatStat Inc., USA).

Results and discussion

The analysis of findings revealed the total leukocyte number in blood of young rats to be slightly increased immediately after the 2nd WBC session and in a week of observation, and decreased (leukopenia) after the 3rd session and 24 hrs after

одразу після 2-го сеансу кріопливи (майже вдвічі), через 24 години та тиждень після 3-го сеансу. Контрольні значення у щурів різного віку не відрізнялися (табл. 1).

Лейкопенії можуть обумовлюватися збоєм утворення лейкоцитів або їх виходом у кров із кісткового мозку. Вони пов'язані з руйнуванням і утилізацією лейкоцитів, а також із їх перерозподілом (перерозподільні нейтропенії), коли порушуються співвідношення циркулюючих, пристінкових і тканинних нейтрофілів. Тканинні нейтрофіли здатні запускати транскрипційну програму, приводячи до генерації ряду хемокінів, які залучають до осередків запалення і пошкодження тканин інші види запальних клітин (макрофаги і Т-лімфоцити), які, у свою чергу, створюють із нейтрофілами функціональні асоціації [1, 7, 8]. Відзначають й іншу, крім фагоцитозу, важливу антимікробну функцію нейтрофілів: здатність «ловити» мікроорганізми в екстрацелюлярну пастку NET (Neutrophil Extracellular Trap) [9].

Лейкоцитоз – це відповідна захисна реакція на подразнення. У поєднанні зі зсувом лейкоцитарної формули вліво підвищення загальної кількості лейкоцитів у крові є нормальною реакцією кісткового мозку на подразнення і вказує на підвищену його активність [1, 14]. Фізіологічний перерозподільний лейкоцитоз може спостерігатися після фізичного або емоційного напруження, впливу холоду або тепла. Крім того, доведено, що лейкоцитоз – такий же незалежний фактор ризику розвитку ішемічної хвороби серця, як й підвищення вмісту загального холестерину, артеріальна гіпертензія, куріння та цукровий діабет [5].

Лейкоцитоз на тлі збільшення відсотка паличкоядерних нейтрофілів і появи юних форм лейкоцитів (Мі та МетаМі) характеризує регенеративний зсув лейкоцитарної формули, який вказує на її збалансованість та стимуляцію мієлопоезу, що є позитивною прогностичною ознакою та відображає підвищений рівень резистентності організму [1, 8]. Такий зсув спостерігали у крові старих щурів одразу після 2-го та через 24 години після 3-го сеансів ЗКС: збільшення відсотка паличкоядерних клітин на 128 і 108% відповідно (табл. 1) і поява юних клітин та мієлоцитів (1:100). Це може свідчити про стимуляцію утворення нейтрофілів. Дегенеративний зсув управо (збільшення відсотка тільки паличкоядерних нейтрофілів), який вказує на пригнічення лейкопоетичної функції кісткового мозку, відзначали у молодих щурів через 24 години після 2-го та тиждень після 1 і 3-го сеансів ЗКС

the 1st one. In aged rats, this index was reduced after the 1st session and significantly augmented (leukocytosis) immediately after the 2nd cryoexposure (almost twice), 24 hrs and a week after the 3rd one. No differences in the control values in rats of different ages were observed (Table 1).

Leukopeniae may be stipulated either by a failure in leukocytes' formation or their release into blood out of bone marrow. They are associated with the leukocytes' destruction and utilization, as well as with their redistribution (redistributive neutropenia), when the ratio of circulating, parietal and tissue neutrophils is disturbed. The tissue neutrophils are able to trigger a transcription program, resulting in generation of some chemokines. The latter can involve the other types of inflammatory cells (macrophages and T-lymphocytes) to the site of inflammation and tissue damage, which, in turn, can form with neutrophils the functional associations [1, 5, 6]. Besides phagocytosis, another important antimicrobial function of neutrophils, *i. e.* the capacity to 'catch' microorganisms into the NET (Neutrophil Extracellular Trap), has been revealed [28].

Leukocytosis is a protective response to stimuli, and together with a shift of leukocyte formula to the left, an increase in the total number of leukocytes in blood is a normal response of bone marrow to stimulus, suggesting its increased activity [1, 21]. Physiological redistributive leukocytosis may be observed after physical or emotional stress, as well as cold or heat effects. In addition, leukocytosis was proven to be such an independent risk factor for coronary heart disease development as elevated total cholesterol, hypertension, smoking, and *Diabetes mellitus* [7].

Leukocytosis together with an increased concentration of band neutrophils and the appearance of immature forms of leukocytes (MCs and MMCs) designates a regenerative shift of leukocyte formula, suggesting its balance and myelopoiesis stimulation, being a positive prognostic sign and reflecting a high level of body resistance [1, 6]. This shift was observed in blood of aged rats immediately after the 2nd WBC session and 24 hrs after the 3rd one, *i. e.* an increase in band cells by 128 and 108%, respectively (Table 1) and appearance of immature cells and myelocytes (1: 100). This fact may testify to the stimulation of neutrophil production. Degenerative right shift (an increase in band neutrophils only), indicating the suppression of leukopoietic bone marrow function, was observed in young rats 24 hrs after the 2nd WBC session and a week after the 1st and 3rd ones (by 63.1; 100 and 47.4%, respectively). Notably, that the percentage



(на 63,1; 100 та 47,4% відповідно). Слід зазначити, що відсоток паличкоядерних нейтрофілів зменшувався тільки у старих тварин і тільки відразу після 3-го сеансу кріовпливу (табл. 1). Паличкоядерні лейкоцити – це незрілі нейтрофіли, тому якщо їх кількість у крові зменшується, то погіршується робота імунної системи та опірність до інфекційних захворювань або знижується лейкопоетична активність кісткового мозку під впливом біологічно активних речовин та/або фізичних факторів [1, 8].

Відсоток сегментоядерних нейтрофілів підвищувався на тлі зменшення кількості лімфоцитів (лімфопенія) як у молодих (на всіх етапах спостереження після ЗКС), так й у старих щурів (порівняно з молодими тваринами контрольної групи і тільки відразу після 1 і 2-го сеансів ЗКС) (табл. 1). Цей факт може вказувати на фізіологічні зміни, пов'язані з перенапруженням задіяних функціональних систем і стресом. Оскільки щури (як і деякі інші види гризунів) мають лімфоцитарний профіль кровотворення, тому абсолютна кількість лімфоцитів у їх крові є високою. Крім того, лімфоцити розділяють на підтипи: з коротким (здатні до репродукції) та довгим (зберігають імунологічну «пам'ять») терміном життя. Лімфопенії за умов ЗКС (у молодих щурів на всіх етапах спостереження та у старих – відразу після 1 і 2-го сеансів) можуть обумовлюватися віком, фізіологічними реакціями, спрямованими на підвищене витрачання лімфоцитів та їх руйнування. Крім того, зменшення/збільшення пулу лімфоцитів може відбуватися за рахунок зменшення їх утворення та міграції у тканини, оскільки вони здатні до рециркуляції, на відміну від нейтрофілів, які не повертаються з тканин у кров'яне русло [1, 8].

Відомо, що моноцити беруть участь у регуляції процесів кровотворення та формуванні специфічного імунітету; забезпечують протипухлинний ефект і продукування інтерферону; відіграють значну роль у знищенні загиблих клітин у місцях запалення, що забезпечує можливість регенерації тканин. Збільшення кількості моноцитів відзначали у молодих тварин лише відразу після 3-го та через 24 години після 1-го сеансів ЗКС, а також через тиждень після 1-го сеансу; у старих щурів порівняно з молодими – у контролі, а також одразу і через 24 години після 2-го та тиждень після 1-го сеансів. Зменшення кількості моноцитів спостерігали лише у старих щурів і тільки відразу після 3-го сеансу ЗКС (табл. 1).

Після проведення ЗКС у старих щурів (окрім всіх етапів спостереження після 1-го сеансу) відсоток еозинофілів зменшувався на порядок

of band neutrophils decreased merely in aged animals and only immediately after the 3rd session of cryoexposure (Table 1). Band leukocytes are the immature neutrophils, so if their number in blood decreases, the functioning of immune system and resistance to infectious diseases are worsened, or a leukopoietic activity of the bone marrow is reduced under the effect of biologically active substances and / or physical factors [1, 6].

The percentage of segmented neurotrophils augmented together with a decrease in lymphocyte number (lymphopenia) in both young (at all the stages of observation after the WBC) and aged rats (compared with young animals in the control group and only immediately after the 1st and 2nd WBC sessions) (Table 1). This fact may suggest the physiological changes, associated with the overstrain of involved functional systems and stress. Since the rats (along with some other rodent species) have a lymphoid hematopoiesis, the absolute lymphocyte number in their blood is high. In addition, the lymphocytes are divided into subtypes, *i. e.* short-lived (capable of reproduction) and long-lived ones (retaining immunological 'memory'). Lymphopeniae under the WBC (at all observation stages in young rats and right after the 1st and 2nd sessions in aged ones) may be stipulated by age, physiological responses, targeted at an increased lymphocytes' consumption and their destruction. In addition, a decrease/increase in lymphocytes' pool may occur through reducing their generation and migration into the tissues, since they are able of recirculation, in contrast to neutrophils, not coming back to the bloodstream from tissues [1, 6].

Monocytes are known to be involved into regulating the hematopoiesis and specific immunity formation; to provide an antitumor effect and interferon production; to play a key role in eliminating dead cells in the inflammation sites, ensuring thereby tissue regeneration. An increase in monocyte number was observed in young animals only immediately after the 3rd WBC session and 24 hrs after the 1st one, as well as a week after the 1st session; in aged rats, if compared with the young animals, it was noted in the control, as well as at once and 24 hrs after the 2nd session and a week after the 1st one. A decrease in monocyte number was only found in aged rats and just after the 3rd WBC session (Table 1).

After performing the WBC in aged rats (except all the observation stages after the 1st session), the percentage of eosinophils reduced by an order (eosinopenia) as compared with the corresponding control, especially after the 2nd one (Table 1). Eosinopenia may suggest a decrease in body's resistance to endogenous and exogenous factors, as well as

Таблиця 1. Вплив загальної кріостимуляції (-120°C) на співвідношення типів лейкоцитів у крові старих і молодих щурів ($M \pm SE$)

Table 1. Impact of whole body cryostimulation (-120°C) on ratio of leukocyte types in blood of young and aged rats ($M \pm SE$)

Групи тварин Groups of animals	Загальна кількість, $\times 10^9/\text{л}$ Total number, $\times 10^9/\text{l}$	Типи лейкоцитів, % Leukocyte type, %				
		Паличкоядерні Band	Сегментоядерні Segmented	Лімфоцити Lymphocytes	Моноцити Monocytes	Еозінофіли Eosinophils
Контроль Control						
Молоді Young	6,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,4	27,1 \pm 1,5	65,5 \pm 1,3	1,3 \pm 0,2	3,5 \pm 0,7
Старі Aged	6,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,5	32,6 \pm 2,0 #	56,2 \pm 4,8 #	2,4 \pm 0,4 #	6,9 \pm 0,7 #
Після 1-го сеансу After 1 st session						
Молоді Young	6,6 \pm 0,1	2,0 \pm 0,6	39,0 \pm 2,4*	55,3 \pm 1,2*	1 \pm 0	2,8 \pm 1,0
Старі Aged	5,0 \pm 0,3*#	3,0 \pm 0,4	42,5 \pm 1,4*	46,0 \pm 2,1*#	3,0 \pm 0,4*#	5,5 \pm 0,6*#
Після 2-го сеансу After 2 nd session						
Молоді Young	7,7 \pm 0,5*	2,4 \pm 0,5	34,1 \pm 2,4*	53,4 \pm 3,0*	1 \pm 0,2	8,6 \pm 1,3*
Старі Aged	12,0 \pm 0,6*#	5,7 \pm 1,1*#	57,5 \pm 4,9*#	33,5 \pm 2,7*#	5,7 \pm 1,1*#	0,7 \pm 0,5*#
Після 3-го сеансу After 3 rd session						
Молоді Young	5,7 \pm 0,4*	2,0 \pm 0	37,8 \pm 2,8*	51,8 \pm 2,8*	2,8 \pm 0,2*	5,8 \pm 0,2*
Старі Aged	7,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3*	36,75 \pm 1,9	56,7 \pm 2,6	1,5 \pm 0,3*	4,0 \pm 0,7*
Через 24 години після 1-го сеансу 24 hrs after 1 st session						
Молоді Young	5,4 \pm 0,7*	3,1 \pm 0,3*	32,6 \pm 2,6*	52,4 \pm 3,9*	2,4 \pm 0,4*	8,3 \pm 1,9*
Старі Aged	6,0 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	33,0 \pm 2,04#	56,2 \pm 3,06	2,75 \pm 0,2	4,2 \pm 0,7*
Після 2-го сеансу After 2 nd session						
Молоді Young	6,7 \pm 0,1	2,3 \pm 0,9	36,3 \pm 2,1*	54,8 \pm 1,7*	1,8 \pm 0,5	5,0 \pm 1,5
Старі Aged	6,7 \pm 0,1	4,5 \pm 1,2*	37,5 \pm 2,4*	52,0 \pm 0,7	4,5 \pm 1,2*#	5,0 \pm 0,8*
Після 3-го сеансу After 3 rd session						
Молоді Young	7,0 \pm 0,9	2,3 \pm 0,7	36,5 \pm 1,2*	53,8 \pm 1,9*	1,8 \pm 0,5	5,8 \pm 0,7*
Старі Aged	10,0 \pm 0,3*#	5,2 \pm 1,6*#	29,2 \pm 3,4#	58,0 \pm 6,1	4,7 \pm 1,0*#	6,0 \pm 1,3
Через тиждень після 1-го сеансу A week after 1 st session						
Молоді Young	7,5 \pm 0,3*	3,8 \pm 0,5*	38,0 \pm 4,0*	50,8 \pm 5,4*	5,0 \pm 1,5*	2,0 \pm 0*
Старі Aged	7,0 \pm 0,3	3,3 \pm 0,5	42,7 \pm 7,8	48,0 \pm 7,9	3,2 \pm 0,5#	2,7 \pm 0,5*
Після 3-го сеансу After 3 rd session						
Молоді Young	7,8 \pm 0,1*	2,8 \pm 0,2*	34,8 \pm 4,5*	57,8 \pm 4,0*	1,8 \pm 0,5	3,0 \pm 0,4
Старі Aged	7,4 \pm 0,1*#	4,5 \pm 0,6*#	33,0 \pm 2,1#	54,5 \pm 1,7	4,7 \pm 0,7*#	3,0 \pm 0,7*

Примітки: відмінності значущі порівняно з контролем (*) та молодими щурами (#); $p < 0,05$.

Notes: differences are significant as compared with the control (*) and with young rats (#); $p < 0.05$.

(еозінопенія) порівняно з відповідним контролем, особливо після 2-го сеансу (табл. 1). Еозінопенія може вказувати на зниження опірності організму до дії ендо- і екзогенних факторів, а також на фізичне перенапруження. Слід зазначити, що в контролі кількість еозінофілів була значно вищою у старих тварин (майже вдвічі), ніж у молодих. Отже можна припустити, що ЗКС сприяла нормалізації кількості еозінофілів у крові старих тварин, яка через тиждень спостереження досягала контрольного рівня молодих щурів (табл. 1). Еозінопенія гормонального походження виникає внаслідок подразнення нервової системи, наприклад за умов стресу (можливо, за рахунок впливу ЗКС), коли підвищення рівня гормонів, зокрема глюкокортикоїдів, активно впливає на процеси кровотворення та стан периферичної крові.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників [15–18, 26, 29]: зміни загальної кількості лейкоцитів, відсоток гранулоцитів і лімфоцитів у крові здорових людей (спортсменів і військових) різноспрямовані та залежать від кількості сеансів ЗКС, індивідуальних антропологічних параметрів, витривалості організму, статі та виду спорту. Збільшення кількості лейкоцитів за умов ЗКС завжди залишається у межах фізіологічного діапазону, що, можливо, обумовлюється мобілізацією лейкоцитів із кісткового мозку та їх міграцією із тканин резидентних органів, але досі пояснення цьому феномену немає [19]. У роботі Н. Pournot та співавт. [23] висловлюється припущення, що збільшення пулу циркулюючих нейтрофілів стимулює ангіогенез через експресію фактора росту ендотелію судин (VEGF), завдяки чому покращується перфузія і прискорюється відновлення тканин.

У мазках крові молодих щурів одразу після 2-го сеансу ЗКС, а також у тварин обох вікових груп через тиждень після 3-го сеансу відзначали плазматичні клітини (ПК) (1:100), у крові старих тварин після 2-го впливу – поліхроматофільні клітини. Плазматизацію цитоплазми деяких лейкоцитів також виявлено у щурів обох вікових груп одразу після 2-го та через тиждень після 3-го сеансів, у крові старих щурів – через 24 години після 2 і 3-го сеансів ЗКС. Відомо, що ПК є похідними В-лімфоцитів. Вони надходять у циркулюючу кров за умов подразнення лімфоцитарної ланки імунітету. У нормі майже всі ПК містяться у периферичних імунних органах (лімфатичних вузлах, селезінці та червоному кістковому мозку). Різке збільшення їх кількості свідчить про виражену гуморальну імунну відповідь, тобто про імунореактивність організму. Плаз-

to physical overstrain. It should be emphasized that in the control, the number of eosinophils was significantly higher in aged animals (almost twice) vs. the young ones. So, the WBC was likely to ensure the normalization of eosinophil number in blood of aged animals, which, a week after observation, reached the control in young rats (Table 1). Eosinopenia of hormonal origin is the result of stimuli of nervous system, for example, under stress conditions, (perhaps due to the WBC effect), when an increase in hormone level, especially the glucocorticoids, actively affect the hematopoiesis and the peripheral blood state.

Our findings are consistent with the reported data of other researchers [4, 9, 10, 12, 24, 29], *i. e.* the total number of leukocytes, the percentage of granulocytes and lymphocytes in blood of healthy people (athletes and military men) vary differently and depend on a number of the WBC sessions, individual anthropological parameters, body's endurance, gender and sports. An increase in leukocytes number under the WBC remains always within the physiological range, likely due to the leukocytes' mobilization from the bone marrow and their migration from tissues of resident organs, but so far, this phenomenon has still remained unknown [13]. Н. Pournot *et al.* [19] suggested an increase in the pool of circulating neutrophils to stimulate angiogenesis through the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), thus improving the perfusion and accelerating the tissue restoration.

The plasm cells (PCs) (1:100) were observed in blood smears of young rats right after the 2nd WBC session, as well as in animals of both age groups one week after the 3rd session, and the polychromatophilic ones were found in blood of aged animals after the 2nd exposure. The cytoplasm plasmation of some leukocytes was also revealed in rats of both age groups immediately after the 2nd session and a week after the 3rd one, and in blood of aged animals it was done 24 hrs after the 2nd and 3rd WBC sessions. The PCs are known to be derived from B lymphocytes. They enter the blood stream when a lymphocyte component of immune system is excited. Normally, almost all the PCs reside in peripheral immune organs (lymph nodes, spleen and red bone marrow). A sharp increase in their number testifies to a pronounced humoral immune response, *i. e.* body's immune reactivity. The cytoplasm plasmation is the feature of immature lymphocytes (large 'atypical' lymphocytes), and the result of immune system failure. These cells are unable to produce the antibodies, their release out of lymph nodes into the blood is determined by the immune system reactivity to stress. The poly-

матизація цитоплазми – це ознака незрілих лейкоцитів і наслідок збою в роботі імунної системи. Такі клітини не спроможні виробляти антитіла, їх вихід із лімфовузлів у кров визначається реактивною реакцією імунної системи на стрес. Поліхроматофілія, яку спостерігали у старих тварин після 2-го сеансу ЗКС, притаманна незрілим еритроїдним клітинам за умов одночасної присутності слабколужного гемоглобіну і кислій субстанції, що спостерігається при інтенсивному виході у кров молодих форм еритроцитів і вказує на високу регенеративну та гемопоетичну спроможність кісткового мозку [1, 14].

Далі на підставі визначених змін кількісно-якісного співвідношення типів лейкоцитів крові щурів проведено розрахунок інтегральних лейкоцитарних індексів, за допомогою яких без додаткових спеціальних досліджень можна визначити стан певних ланок імунітету та ступінь неспецифічної резистентності організму [10–13].

Так, ІСНМ (співвідношення нейтрофілів і моноцитів), за зміною якого можна оцінити баланс між мікро- та макрофагальними компонентами імунної системи, після ЗКС збільшувався у молодих щурів тільки після 1-го, у старих тварин – одразу та через 24 години після 2 і 3-го сеансів. Таким чином, на цих етапах визначалося переважання мікрофагальних компонентів. Зниження ІСНМ (переважання макрофагальних компонентів) спостерігалось тільки у молодих тварин після 3-го та через тиждень після 1-го (більш ніж удвічі) сеансів. У старих щурів порівняно з молодими ІСНМ підвищувався після 3-го сеансу, через 24 години після 1 і 2-го та тиждень після 1-го кровопливу (переважання мікрофагальних компонентів), а знижувався відразу після 1-го сеансу і через тиждень після 3-го сеансу (переважання макрофагальних компонентів). У молодих і старих тварин через 24 години після 3-го сеансу ЗКС, а також у контролі за віком значення ІСНМ не відрізнялися (табл. 2, 3).

Динаміка ІСЛМ, який відображає взаємовідношення афекторної та ефекторної ланок імунного процесу, була такою. У молодих щурів індекс знижувався практично на всіх етапах експерименту (особливо відразу після 3-го і через тиждень після 1-го сеансів – майже втричі), не змінюючись після 1 і 2-го сеансів ЗКС. У старих щурів ІСЛМ зменшувався тільки відразу і через тиждень після 1-го сеансу, що вказує на активацію ефекторної ланки на цих етапах, а підвищувався після 3-го сеансу та через 24 години після 1, 2 та 3-го сеансів ЗКС (переважання афекторної ланки). Контрольне значення ІСЛМ

chromatophilia, we observed in aged animals after the 2nd WBC session was inherent to immature erythroid cells under simultaneous presence of weakly alkaline hemoglobin and acidic substance, that was found during intensive immature erythrocytes release into the blood and suggested a high regenerative and hematopoietic ability of bone marrow [1, 21].

Then, based on the revealed changes in quantitative and qualitative ratio of leukocyte types in rat blood, there were calculated the integral leukocyte indices, allowing to assess the state of certain components of immune system and a degree of body's nonspecific resistance without using additional special research methods [11, 17, 18, 22].

For example, the INMR (index of neutrophil to monocyte ratio), by the change in which we can estimate the balance between micro- and macrophage components of the immune system, after the WBS was increased in young rats after the 1st session only, but in aged animals it occurred at once and 24 hrs after the 2nd and 3rd ones. Thus, at these stages, the predominance of microphage components was determined. Reduced the INMR (predominant macrophage components) was observed only in young animals after the 3rd session and a week after the 1st one (more than twice). In aged rats if compared with the young ones, the INMR augmented after the 3rd session, 24 hrs after the 1st and 2nd ones and a week after the 1st cryoexposure (predominant microphage components), and reduced immediately after the 1st session and a week after the 3rd one (predominant macrophage components). In young and aged animals, 24 hrs after the 3rd WBC session, as well as in the control by age, the INMR values did not differ (Tables 2, 3).

The dynamics of the ILMR, reflecting the relationship between the affector and effector immunological components, was as follows. In young rats, this index was decreased virtually at all the stages of experiment (it was almost three-fold especially right after the 3rd session and a week after the 1st one), remaining unchanged after the 1st and 2nd WBC sessions. In aged rats, the ILMR reduced only at once and a week after the 1st session, thus indicating the activation of effector component at these stages, but it augmented after the 3rd WBC session and 24 hrs after the 1st, 2nd and 3rd ones (predominant affector link). The control value of the ILMR was twice higher in young rats vs. the aged ones (Tables 2, 3).

Further analysis of dynamics of the ILIs showed a one-way change in the LGI (level of auto- and infectious intoxication), LI (ratio of humoral and cellular components of immune system),



у молодих щурів було удвічі більше, ніж у старих (табл. 2, 3).

Подальший аналіз динаміки лейкоцитарних індексів показав, що ЛГІ (рівень ауто- та інфекційної інтоксикації), ЛІ (взаємовідношення гуморальної та клітинної ланок імунної системи), ІА (крім після 2-го і через 24 години після 1-го сеансів) та ІАГ у молодих тварин змінювалися односпрямовано, знижуючися на всіх етапах, що вказувало на посилення інфекційної інтоксикації, активацію клітинної ланки імунітету, зниження алергізації та адаптивних можливостей організму після ЗКС (див. табл. 2). У старих щурів після кріостимуляції організму ЛГІ та ІАГ знижувалися відразу після 1 і 2-го сеансів, ЛІ – після 1 і 2-го та через 24 години після 2-го. Зниження індексу алергізації відзначали відразу та через 24 години після 2-го і тиждень після 1-го сеансів; а підвищення – одразу після 1-го сеансу. Індекс адаптації Гаркаві збільшувався тільки у старих тварин порівняно з молодими через 24 години після 3-го сеансу ЗКС. Контрольні

ІА (except after the 2nd session WBC and 24 hrs after the 1st one) and GIA in young animals, reducing at all the stages, that revealed an enhanced infectious intoxication, activation of cellular component of immune system, decreasing in allergization and body's adaptive capacity after the WBC (see Table 2). In aged rats, after body's cryostimulation, the LGI and GAI decreased immediately after the 1st and 2nd sessions, the LI did after the 1st and 2nd cryoexposures and 24 hrs after the 2nd one. A reduced index of allergization was noted at once and 24 hrs after the 2nd session and a week after the 1st one; whereas an increase was observed immediately after the 1st session. The Garkavi adaptation index was raised only in aged animals if compared with the young ones 24 hrs after the 3rd WBC session. There were no differences in the control values of LGI, IA, GAI and LI in age groups (see Tables 2, 3).

In young rats, the INLR, LII (only a week after the WBC), the indices of nuclear (only 24 hrs after the 1st and 3rd sessions and after a week) and the

Таблиця 2. Інтегральні лейкоцитарні індекси у молодих щурів після загальної кріостимуляції (-120°C) ($M \pm SE$)
Table 2. Integral leukocyte indices in young rats after whole body cryostimulation (-120°C) ($M \pm SE$)

Індекси Indices	Контроль Control	Одразу після сеансів ЗКС Immediately after WBC sessions			Через 24 години After 24 hrs			Через тиждень After a week	
		1-го 1 st	2-го 2 nd	3-го 3 rd	1-го 1 st	2-го 2 nd	3-го 3 rd	1-го 1 st	3-го 3 rd
ІСНМ INMR	23,6 ± 2,4	41,0 ± 2,1*	30,9 ± 4,0	15,0 ± 2,3*	19,4 ± 4,5	26,7 ± 6,0	27,3 ± 6,5	10,5 ± 2,4*	28,7 ± 9,3
ІСЛМ ILMR	54,2 ± 4,8	55,2 ± 1,2	46,9 ± 6,6	19,3 ± 1,9*	29,2 ± 6,1*	38,9 ± 9,7*	38,7 ± 10,3*	15,3 ± 6,2*	39,1 ± 7,2*
ЛГІ LGI	20,9 ± 1,3	12,7 ± 0,6*	12,5 ± 1,6*	11,6 ± 1,4*	13,4 ± 2,5*	12,7 ± 0,9*	12,2 ± 0,8*	12,3 ± 2,4*	15,1 ± 2,7*
ІСНЛ INLR	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0*	0,7 ± 0,1*	0,8 ± 0,1*	0,7 ± 0,1*	0,7 ± 0,0*	0,7 ± 0,0*	0,9 ± 0,2*	0,7 ± 0,1*
ІА IA	3,9 ± 0,4	2,3 ± 0,4*	4,0 ± 0,3	2,7 ± 0,3*	3,9 ± 0,5	2,9 ± 0,5*	3,0 ± 0,2*	1,7 ± 0,4*	2,6 ± 0,3*
ІАЗ NSI	0,09 ± 0,0	0,08 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,17 ± 0,02*	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,38 ± 0,17*	0,2 ± 0,04*
ІСЛЕ ILER	31,07 ± 6,4	33,16 ± 11,3	7,3 ± 1,13*	9,06 ± 0,7*	14,95 ± 6,1*	15,12 ± 4,9*	9,98 ± 1,62*	25,4 ± 2,7*	20,8 ± 4,1*
ІЗЛ LSI	0,5 ± 0,03	0,8 ± 0,04*	0,9 ± 0,09*	0,8 ± 0,09*	0,8 ± 0,11*	0,8 ± 0,05*	0,8 ± 0,06*	0,98 ± 0,3*	0,7 ± 0,1
ІАГ GAI	2,6 ± 0,2	1,4 ± 0,3*	1,7 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*	1,8 ± 0,3*	1,5 ± 0,13*	1,5 ± 0,08*	1,5 ± 0,4*	1,8 ± 0,3*
ЛІ LI	2,5 ± 0,2	1,4 ± 0,3*	1,5 ± 0,2*	1,3 ± 0,18*	1,6 ± 0,3*	1,4 ± 0,12*	1,4 ± 0,09*	1,2 ± 0,3*	1,6 ± 0,3*
ЛІІ LII	0,15 ± 0,02	0,27 ± 0,09*	0,1 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,39 ± 0,15*	0,3 ± 0,08*

Примітки: ¹ – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Notes: ¹ – differences are significant as compared with the control, $p < 0.05$.

Таблиця 3. Інтегральні лейкоцитарні індекси у старих щурів після загальної кріостимуляції (-120°C) ($M \pm SE$)
Table 3. Integral leukocyte indices in aged rats after the whole body cryostimulation (-120°C) ($M \pm SE$)

Індекси Indices	Контроль Control	Оразу після сеансів ЗКС Immediately after WBC sessions			Через 24 години після сеансів ЗКС 24 hrs later WBC sessions			Через тиждень після сеансів ЗКС One week later WBC sessions	
		1-го 1 st	2-го 2 nd	3-го 3 rd	1-го 1 st	2-го 2 nd	3-го 3 rd	1-го 1 st	3-го 3 rd
ІСНМ INMR	20,6 ± 5,7	15,9 ± 1,9 [#]	43,3 ± 15,5 ^{*,#}	38,2 ± 1,9 ^{*,#}	31,62 ± 5,4 ^{*,#}	42,0 ± 1,2 ^{*,#}	34,5 ± 5,0 [*]	18,5 ± 4,3 [#]	14,4 ± 2,8 [#]
ІСЛМ ILMR	28,5 ± 5,0 [#]	16,5 ± 3,0 ^{*,#}	20,0 ± 5,3 [#]	58,5 ± 2,6 ^{*,#}	48,5 ± 6,31 [#]	52,0 ± 0,7 ^{*,#}	58,0 ± 0,7 ^{*,#}	18,7 ± 4,1 [*]	20,7 ± 3,8 [#]
ЛГІ LGI	16,4 ± 3,7	9,1 ± 0,7 ^{*,#}	5,3 ± 0,7 ^{1,2}	13,7 ± 1,6	14,4 ± 1,3	11,9 ± 0,9	15,9 ± 3,9	11,5 ± 3,5	13,01 ± 1,2
ІСНЛ INLR	0,71 ± 0,15 [#]	1,0 ± 0,08 [#]	1,96 ± 0,3 ^{*,#}	0,68 ± 0,06	0,61 ± 0,05	0,81 ± 0,03	0,64 ± 0,15	1,13 ± 0,36	0,69 ± 0,05
ІА IA	4,41 ± 0,99	2,29 ± 0,15 ¹	0,8 ± 0,15 ^{*,#}	2,72 ± 0,04 [*]	3,18 ± 0,26	2,26 ± 0,27 ¹	3,8 ± 0,5	2,07 ± 0,47 [*]	2,8 ± 0,4 [*]
ІЯЗ NSI	0,20 ± 0,06 [#]	0,14 ± 0,01 [#]	0,15 ± 0,04	0,06 ± 0,01 ^{*,#}	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,20 ± 0,03 [#]	0,16 ± 0,05 [#]	0,23 ± 0,03
ІСЛЕ ILER	9,2 ± 1,2 [#]	8,79 ± 1,23 [#]	14,37 ± 9,3 [#]	16,86 ± 5,11	11,74 ± 3,03	11,4 ± 2,1	11,3 ± 2,7	16,6 ± 5,1	14,4 ± 5,2
ІЗЛ LSI	0,79 ± 0,15 [#]	1,05 ± 0,08 [*]	1,9 ± 0,3 ^{1,#}	0,74 ± 0,08	0,74 ± 0,07	0,88 ± 0,03	0,81 ± 0,06	1,13 ± 0,34	0,75 ± 0,07
ІАГ GAI	2,44 ± 0,75	1,09 ± 0,09 [*]	0,61 ± 0,09 ^{1,#}	1,57 ± 0,16	1,73 ± 0,16	1,41 ± 0,11 [*]	2,14 ± 0,45 [#]	1,36 ± 0,44	1,68 ± 0,14
ЛІ LI	2,37 ± 0,6	1,02 ± 0,07 ^{*,#}	0,54 ± 0,07 ^{1,2}	1,51 ± 0,09	1,54 ± 0,09	1,24 ± 0,05 [*]	1,86 ± 0,45	1,24 ± 0,38	1,46 ± 0,12
ЛІІ LII	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,02 [#]	1,57 ± 0,54 [*]	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,07	0,3 ± 0,08 ¹	0,23 ± 0,08

Примітки: * – відмінності значущі порівняно з контролем, # – порівняно з молодими щурами (див. табл. 2), $p < 0,05$.
Notes: * – differences are significant as compared with the control, # – as compared with young rats (See Table 2), $p < 0,05$.

значення ЛГІ, ІА, ІАГ та ЛІ у вікових групах не відрізнялися (табл. 2, 3).

У молодих щурів збільшувалися ІСНЛ, ЛІІ (тільки через тиждень після ЗКС), індекси ядерного (тільки через 24 години після 1 і 3-го сеансів та через тиждень) та лейкоцитарного зсувів (ІЯЗ і ІЗС відповідно). Підвищення ІЗЛ свідчить про активний запальний процес і порушення імунореактивності, а зміни ІСНЛ і ІЯЗ, які відображають співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту та процентного вмісту молодих і зрілих форм нейтрофілів відповідно, – про переважання клітин неспецифічного захисту та молодих форм нейтрофілів (див. табл. 2). У старих щурів після кріостимуляції підвищувалися ІСНЛ, ІЗЛ (тільки після 2-го сеансу) і ЛІІ, який вказує на інтоксикацію (тільки після 2-го сеансу та через тиждень після 1-го сеансу), при цьому ІЯЗ зменшувався тільки після 3-го сеансу (переважання зрілих форм нейтрофілів) (див. табл. 3).

leukocyte shifts (NSI and LSI, respectively) were increased. An elevated LSI testified to an active inflammatory process and damaged immune reactivity, but the changes in the INLP and NSI, reflecting the ratio of cells of nonspecific and specific protection and the percentage of immature and mature neutrophils, respectively, suggested the predominance of cells of nonspecific protection and immature neutrophils (see Table 2). In aged rats after cryostimulation, there were an increase in the INLR, LSI (only after the 2nd session) and LII, indicating the intoxication (only after the 2nd session and a week after the 1st one), while the NSI decreased merely after the 3rd session (predominance of mature neutrophils) (see Table 3).

Comparing the integral leukocyte indices in the control animals of all age groups showed the INLR and LSI to be higher in aged animals vs. the young ones after the 1st and 2nd sessions, the NSI was higher (predominant immature neutrophils) after the 1st session and lower after 3rd one and a week after

Порівняння лейкоцитарних індексів у контрольних тварин усіх вікових груп показало, що на відміну від молодих у старих тварин ІСНЛ та ІЗЛ були вищими після 1 і 2-го сеансів, ІЯЗ – вищим (переважання молодих форм нейтрофілів) після 1-го і нижчим після 3-го та через тиждень після 1-го (майже вдвічі) сеансів ЗКС (переважання зрілих форм нейтрофілів). Лейкоцитарний індекс інтоксикації був нижчим після 1-го і вищим після 2-го сеансів кріовпливів. У контролі ІСНЛ, ІЗЛ та ІЯЗ були вищими у старих тварин, інші індекси – практично не відрізнялися від значень у молодих щурів (див. табл. 2, 3).

Індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів, що відображає співвідношення процесів гіперчутливості негайного та уповільненого типів, після ЗКС змінювався тільки у молодих щурів і односпрямовано, зменшуючись практично на всіх етапах, крім одразу і через тиждень після 1-го сеансу. Така динаміка свідчить про активацію у цей час процесів гіперчутливості уповільненого типу (див. табл. 2). У контролі ІСЛЕ був майже утричі нижчим у старих щурів, ніж у молодих, тобто з віком істотно активувалися процеси гіперчутливості уповільненого типу (див. табл. 2, 3).

Таким чином, спрямованість і вираженість зміни лейкоцитарних показників після ЗКС (-120°C) у молодих і старих щурів (як загальної кількості лейкоцитів, співвідношення їхніх типів, так і значення ІЛІ) залежать від кількості сеансів кріовпливів, термінів спостереження та віку тварин. Слід зазначити, що молодих щурів після 1-го сеансу ЗКС за показниками ІСЛЕ, а старих щурів після 2 та 3-го сеансів та тиждень після 1-го сеансу за показниками ІСНМ і після 3-го за ІСЛЕ можна було розділити на дві підгрупи – з високими і відповідними до контрольних значеннями. Крім того, у старих щурів на відміну від молодих ІЛІ перетерплювали значно менших змін, особливо через 24 години та тиждень після сеансів ЗКС (див. табл. 2, 3).

A. Lubkowska та співавт. [21] показали, що після десяти сеансів ЗКС за -130°C збільшується кількість лейкоцитів, особливо лімфоцитів і моноцитів; після 1-го і останнього сеансів підвищується вміст інтерлейкіну-6 (IL-6) (після 10-го сеансу найбільш виражено), а антиоксидантний статус, навпаки, істотно знижується. Автори роблять висновок про мобілізуючий вплив ЗКС на імунну систему. У іншій роботі вони висловлюють припущення, що імуностимулюючий ефект ЗКС може бути пов'язаний із активацією норадренергічних процесів та паракринними впливами.

the 1st (almost twice) WBC sessions (predominant mature neutrophils). The LII was lower after the 1st cryoexposure session and higher after the 2nd one. In the control, the INLR, LSI and NSI were higher in aged animals, the other indices virtually did not differ from the values in young rats (see Tables 2, 3).

After the WBC, the index of lymphocyte to eosinophil ratio (ILER), expressing the ratio of immediate- and delayed-type hypersensitivity, changed only in young rats and in one way, by decreasing virtually at all the stages, except at once and a week after the 1st session. Such a dynamics suggested that at this time the processes of delayed-type hypersensitivity were activated (see Table 2). In the control, the ILER was almost threefold lower in aged rats vs. the young ones, *i. e.* the delayed-type hypersensitivity was significantly activated with age (see Tables 2, 3).

Thus, the direction and severity of changes in the integral leukocyte indices after the WBC (-120°C) in young and aged rats (both the total number of leukocytes, ratio of their types and the ILI value) depend on a number of cryoexposure sessions, observation terms and age of animals. Of note is, that the young rats after the 1st WBC session according to the ILER, and the aged ones after the 2nd and 3rd sessions and a week after the 1st one by the INMR and after the 3rd one by the ILER could be divided into the two subgroups: with high values and those corresponded to the control. In addition, in aged rats, in contrast to young ones, the ILI were significantly less changed, especially 24 hrs and a week after the WBC sessions (see Tables 2, 3).

A. Lubkowska *et al.* [15] after ten sessions of the WBC at -130°C showed an increase in leukocyte number, especially lymphocytes and monocytes; a rise in interleukin-6 (IL-6) content after the 1st and last sessions (most expressed after the 10th one), and inversely, a significant decrease in antioxidant status. The authors concluded about a mobilizing effect of the WBC on immune system. In another study, they suggested the immune stimulating effect of the WBC to be likely due to the activation of noradrenergic processes and paracrine effects. The findings on the WBC impact (-130°C) (5, 10 and 20 sessions of 3 min each) on the content of pro- and anti-inflammatory cytokines in blood of healthy people showed an increase in anti-inflammatory cytokine (IL-6 and IL-10) content, but a decrease in IL-1 α ; the effect after 20 sessions was stronger and longer [14].

In addition, G. Lombardi *et al.* [13] have noted the dependence of the WBC efficiency on fat mass and physical training level in individuals, *i. e.* the cryoexposure simulates the exercise, since it simi-

Результати вивчення впливу ЗКС (-130°C) (5, 10 та 20 сеансів тривалістю 3 хв кожний) на вміст про- та протизапальних цитокінів у крові здорових людей показали, що вміст протизапальних цитокінів (IL-6 та IL-10) підвищується, а вміст IL-1 α знижується, значнішим і тривалішим є ефект після 20-ти сеансів [20].

Крім того слід зазначити, що у роботі G. Lombardi та співавт. [19] відзначається залежність ефективності ЗКС від жирової маси та рівня фізичної підготовки людей: кріостимуляція імітує фізичне навантаження, оскільки подібним чином впливає на експресію міокінів. Такі припущення можуть слугувати для визначення стратегій терапії таких метаболічних захворювань, як ожиріння та діабет 2-го типу.

Відомо, що стресорна реакція як комплекс психосоматичних механізмів, які формуються в організмі у відповідь на ендогенний вплив певної інтенсивності, спрямована на збереження багаторівневого гомеостазу. У той самий час старіння організму пов'язане зі зниженням його опірності до дії негативних ендо- та екзогенних факторів. Клітини крові, які мають високу реактивність, швидко включаються в адаптаційні реакції. Чим складніша система, тим ефективніше вона протистоїть екзогенним пошкоджуючим факторам, однак тим небезпечнішими виявляються ендогенні «помилки» її функціонування [4]. Отже, реакція на дію стресових факторів є індивідуальною властивістю організму. Формування пристосувальних механізмів забезпечується через безперервний обмін інформацією між рівнями управління. Інформація, яка закладена, зокрема, у структурно-функціональній активності як еритроцитарної, так і лейкоцитарної ланок системи крові та кодується на рівні ЦНС, дозволяє оцінити стан регуляторних механізмів, які характеризують адаптаційні можливості організму, з урахуванням також й вікових змін. Старіння не є патологічним станом, оскільки це послідовний природний фізіологічний процес уповільнення адаптаційних реакцій і загальної життєздатності організму. Наслідком вікових змін в організмі часто є розвиток гострих і хронічних захворювань різних органів і систем. Виявлення та розрізнення фізіологічних і патологічних вікових змін – загальноприйнята тенденція сучасної геронтології, яка набуває науково-практичного значення [2]. Для фізіологічного старіння характерний опір змінам, хоча більшою мірою це пояснюється не нездатністю до пристосовуваності, а збільшенням толерантності систем організму.

Клінічними дослідженнями Л. Х. Гаркаві та співавт. [6] встановлено, що організм на будь-

larly affects the myokine expression. These assumptions may be applied to determine the treatment strategies in such metabolic diseases as obesity and type 2 diabetes.

It is known that the stress response as a complex of psychosomatic mechanisms, formed in a body as response to endogenous exposure of certain intensity, is directed to maintain a multilevel homeostasis. At the same time, the body's aging is associated with a decrease in its resistance to negative endogenous and exogenous factors. Blood cells with high reactivity are rapidly involved into adaptive responses. The more complex the system, the more efficient is its resistance to exogenous damaging factors, but the more dangerous are the endogenous 'errors' of its functioning [25]. Thus, the response to stress factors is the body's individual peculiarity. The formation of adaptive mechanisms is ensured through the continuous exchange of information between the levels of regulation. The information, included in particular, in structural and functional activity of both erythrocyte and leukocyte components of blood system and encoded at the CNS level, enables assessing the state of regulatory mechanisms. The latter characterizes the body's adaptive capacity, taking into account the age changes as well. Aging is not a pathological state, but rather a consistent natural physiological process of slowing down the bodily adaptive responses and general viability. The age-related body changes often entail the development of acute and chronic diseases of various organs and systems. A common trend in current gerontology, gaining scientific and practical importance, is to detect and distinguish the physiological and pathological age-related changes [2]. The resistance to changes is specific to physiological aging, although this is mostly explained not by the inability to adaptation, but an increased tolerance of body systems.

A group of the researchers headed by L. H. Garkavi [9] has found that the body responds to any effect with three adaptive responses (training, 'quiet' activation and 'heightened' activation), as well as the stress response. The latter occurs only if the body can not implement the first three ones. Each response is characterized with the certain number of lymphocytes in blood smears: the lower norm limit (training response) and the upper one ('quiet' activation response), as well as its increase simultaneously with decreasing the rate of segmented neutrophils ('heightened' activation response). In our experiments, no increase in lymphocyte count was observed. This index remained either unchanged or decreased (especially in aged rats after the 2nd WBC session). Only 24 hrs after the 2nd WBC session in aged rats, the lymphocyte count was at the level of



який вплив відповідає трьома адаптивними реакціями (тренування, спокійної активації та підвищеної активації), а також реакцією стресу. Остання формується тільки у випадку неспроможності організму реалізувати перші три. Для кожної реакції характерна певна кількість лімфоцитів у мазках крові: нижня (реакція тренування) та верхня (реакція спокійної активації) межі норми, а також її збільшення на тлі зменшення відсотка сегментоядерних нейтрофілів (реакція підвищеної активації). У наших експериментах збільшення відсотка лімфоцитів взагалі не спостерігалось. Цей показник або не змінювався, або знижувався (особливо у старих щурів після 2-го сеансу ЗКС). Тільки через 24 години після 2-го сеансу ЗКС у старих щурів відсоток лімфоцитів був на рівні нижнього значення контролю (див. табл. 1), що свідчить про формування на цьому етапі реакції тренування.

Висновки

Загальна кріостимуляція (-120°C) організму молодих і старих щурів викликає значні зміни лейкоцитарних показників крові: загальної кількості лейкоцитів (лейкоцитоз/лейкопенія); співвідношення типів лейкоцитів (лімоцитоз/лімопенія, еозінопенія/еозіноцитоз); напряду зсуву лейкоцитарної формули (регенеративний/дегенеративний); появу поліхроматофільних, юних або плазматичних клітин та плазматизації цитоплазми у окремих лейкоцитів. Зміни інтегральних лейкоцитарних індексів відображають стан і співвідношення певних ланок імунної системи (гуморальний та клітинний імунітет, клітини неспецифічного/специфічного захисту, компоненти мікро/макрофагальної системи, ступінь імунореактивності та резистентності) або переважання окремих імунологічних процесів (інтоксикації, запалення, афекторної/ефекторної ланок, гіперчутливості негайного або уповільненого типу), рівень алергізації та адаптації організму тощо. Спрямованість і вираженість цих змін залежить від віку тварин, кількості сеансів ЗКС (1, 2 або 3) і термінів спостереження (через добу або тижень).

Література

1. Абдулкадыров КМ, редактор. Гематология, новейший справочник. Москва: ЭКСМО; 2004. 928 с.
2. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. Санкт-Петербург: Наука; 2008; Т. 1: 481 с.
3. Бабійчук ГО, Козлов ОВ, Ломакін ІІ, Бабійчук ВГ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН

lower control value (see Table 1), suggesting the formation of training response at this stage.

Conclusions

The whole body cryostimulation (-120°C) of young and aged rats causes notable changes in blood leukocyte indices such as: total leukocyte number (leukocytosis / leukopenia); ratio of leukocyte types (lymphocytosis / lymphopenia, eosinopenia / eosinocytosis); shift direction of leukocyte formula (regenerative / degenerative); appearance of polychromatophilic, immature or plasm cells and cytoplasm plasmation in some leukocytes. Changes in the integral leukocyte indices reflect the state and ratio of certain components of immune system (humoral and cell mediated immunity, cells of nonspecific / specific defense, components of the micro / macrophage system, the degree of immune reactivity and resistance) or the predominance of certain immunological processes (intoxication, inflammation, effector/effector components, immediate or delayed hypersensitivity), the rate of allergization and adaptation of the body, *etc.* The direction and severity of these changes depend on the age of animals, number of the WBC sessions (1, 2 or 3) and observation terms (day or week later).

References

1. Abdulkadyrov KM, editor. [Hematology, the newest guidance]. Moscow: EKSMO; 2004: 928 p. Russian.
2. Anisimov VN. [Molecular and physiological mechanisms of aging]. St. Petersburg: Nauka; 2008; 1: 481 p. Russian.
3. Babiichuk VG, Kozlov AV, Lomakin II, Babiichuk GA, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [Cryochamber for experimental cooling of laboratory animals]. Ukraine patent № 40168. 2009 March 25. Ukrainian
4. Cuttell S, Hammond L, Langdon D, Costello J. Individualising the exposure of -110°C whole body cryotherapy: The effects of sex and body composition. *J Therm Biol.* 2017 Apr; 65: 41–7.
5. Dale MM, Foreman JC, editors. [Neutrophilic leukocytes. Textbook of immunopharmacology]. Moscow: Meditsina; 1998; 331 p. Russian.
6. Dolgushin II, Bukharin OV. [Neutrophils and homeostasis]. Ekaterinburg: UrO RAS Publishing 2001: 284 p. Russian
7. Gavrishcheva NA, Alekseyeva GV, Boyko AI, Panov AV. [Multiple role of leukocytes in coronary heart disease]. *Russ J Cardiol.* 2017; 151(11): 86–92. Russian.
8. Garkavi LKh, Kvakina EB, Ukolova MA. [Adaptive reactions and resistance of the organism]. Rostov-on-Don: Rostov University Publishing; 1990: 223 p. Russian.
9. Kepinska M, Gdula-Argasinska J, Dabrowski Z, et al. Fatty acids composition in erythrocyte membranes of athletes after one and after a series of whole body cryostimulation sessions. *Cryobiology.* 2017 Feb; 74(1): 121–5.



- України, патентовласник. Кріокамера для експериментального охолодження лабораторних тварин. Патент України № 40168. 25.03.2009.
4. Войтенко В. П., Писарук А. В. Системные предпосылки старения. Известия Российской Академии наук. Серия «Биологическая». 1992; (4): 629–31.
 5. Гавришева НА, Алексеева ГВ, Бойко АИ, Панов АВ. Множественная роль лейкоцитов при ишемической болезни сердца. Российский кардиологический журнал. 2017; 151(11): 86–92.
 6. Гаркави ЛХ, Квакина ЕБ, Уколова МА. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского университета; 1990. 223 с.
 7. Дейл ММ, Формен ДжК, редакторы. Нейтрофильные лейкоциты. Руководство по иммунофармакологии. Москва: Медицина; 1998. 331 с.
 8. Долгушин ИИ, Бухарин ОВ. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург: Издательство УрО РАН; 2001. 284 с.
 9. Зак КП. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных). Международный эндокринологический журнал. 2016. 74(2): 130–9.
 10. Ломоко В.В. Влияние разных режимов охлаждения (краниocereбральной и иммерсионной гипотермии, поверхностных ритмических и экстремальных холодовых воздействий) на лейкоцитарные показатели крови крыс. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(4): 293–310.
 11. Мустафина ЖГ, Крамаренко ЮС, Кобцева ВЮ. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией. Клиническая лабораторная диагностика. 1999; (5): 46–8.
 12. Олейник ГА. Лейкоцитарные индексы в прогнозировании течения и исходов холодовой травмы. Международный медицинский журнал. 2010; 16(2): 63–9.
 13. Сипливый ВА, Конь ЕВ, Евтушенко ДВ. Использование лейкоцитарных индексов для прогнозирования исхода перитонита. Клинічна хірургія. 2009; (9): 21–6.
 14. Шиффман ФДж. Патофизиология крови. Москва: Бином; 2009. 446 с.
 15. Cuttell S, Hammond L, Langdon D, Costello J. Individualising the exposure of -110°C whole body cryotherapy: The effects of sex and body composition. J Therm Biol. 2017 Apr; 65: 41–7.
 16. Kepinska M, Gdula-Argasinska J, Dabrowski Z, et al. Fatty acids composition in erythrocyte membranes of athletes after one and after a series of whole body cryostimulation sessions. Cryobiology. 2017; 74: 121–5.
 17. Kulis A, Misiorek A, Marchewka J, et al. Effect of whole-body cryotherapy on the rheological parameters of blood in older women with spondyloarthritis. Clin Hemorheol Microcirc. 2017; 66(3): 187–95.
 18. Lombardi G, Lanteri P, Porcelli S, et al. Hematological profile and martial status in rugby players during whole body cryostimulation. PLoS ONE [Internet]. 2013 Feb 1 [cited Dec 15 2017]; 8(2): e55803. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055803>
 19. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-Body Cryotherapy in Athletes: From Therapy to Stimulation. An Updated Review of the Literature. Front. Physiol. Front Physiol [Internet]. 2017 May 2; 8: 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>.
 20. Lubkowska A, Szygula Z, Chlubek D, Banfi G. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of sessions on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. Scand J Clin Lab Invest. 2011 Sep; 71(5): 419–25.
 21. Lubkowska A, Szygula Z, Klimek AJ, Torii M. Do sessions of cryostimulation have influence on white blood cell count, level of IL6 and total oxidative and antioxidative status in healthy men? Eur J Appl Physiol. 2010 May; 109(1): 67–72.
 22. Kulis A, Misiorek A, Marchewka J, et al. Effect of whole-body cryotherapy on the rheological parameters of blood in aged women with spondyloarthritis. Clin Hemorheol Microcirc. 2017; 66(3): 187–95.
 23. Lomako VV. Effect of different cooling regimens (craniocebral and immersion hypothermia, surface rhythmic cold exposures and whole body cryostimulation) on leukocyte indices of rat blood. Probl Cryobiol Cryomed. 2018; 28(4): 293–310.
 24. Lombardi G, Lanteri P, Porcelli S, et al. Hematological profile and martial status in rugby players during whole body cryostimulation. PLoS ONE [Internet]. 2013 Feb 1 [cited Dec 15 2017]; 8(2): e55803. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055803>
 25. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. Front Physiol [Internet]. 2017 May 2 [cited Dec 15 2017]; 8: 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>
 26. Lubkowska A, Szygula Z, Chlubek D, Banfi G. The effect of prolonged whole-body cryostimulation treatment with different amounts of sessions on chosen pro- and anti-inflammatory cytokines levels in healthy men. Scand J Clin Lab Invest. 2011 Sep; 71(5): 419–25.
 27. Lubkowska A, Szygula Z, Klimek AJ, Torii M. Do sessions of cryostimulation have influence on white blood cell count, level of IL6 and total oxidative and antioxidative status in healthy men? Eur J Appl Physiol. 2010 May; 109(1): 67–72.
 28. Mawhinney C, Low DA, Jones H, et al. Cold water mediates greater reductions in limb blood flow than whole body cryotherapy. Med Sci Sports Exerc. 2017; 49(6): 1252–60.
 29. Mustafina ZhG, Kramarenko YuS, Kobtseva VYu. [Integral hematological indices in the evaluation of the immunological reactivity of the organism in patients with ophthalmopathology]. Clinical Laboratory Diagnostics. 1999; (5): 46–8. Russian.
 30. Oleynik GA. [Leukocyte indices in prognosis of the course and outcome of cold injury]. International Medical Journal. 2010; 16(2): 63–9. Russian.
 31. Pourmot H, Bieuzen F, Louis J, et al. Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. PLoS ONE [Internet]. 2011 Jul 28 [cited Dec 15 2017]; 6(7): e22748. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022748>
 32. Roszkowska K, Witkowska-Pilaszewicz O, Przewozny M, Cywinska A. Whole body and partial body cryotherapies – lessons from human practice and possible application for horses. BMC Vet Res [Internet]. 2018 Dec 12; [cited Jan 10 2019]; 14(1): 394. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1679-6>
 33. Shiffman FJ. [Blood pathophysiology]. Moscow: Binom, 2009 446 p. Russian.
 34. Siplivy VA, Kon EV, Evtushenko DV. [Use of leukocyte indices for predicting the outcome of peritonitis]. Klinicheskaia Khirurgiia. 2009; (9): 21–6. Russian.
 35. Stanek A, Sieroń-Stołtny K, Romuk E, et al. Whole-body cryostimulation as an effective method of reducing oxidative stress in healthy men. Adv Clin Exp Med. 2016; 25(6): 1281–91.
 36. Szygula Z, Lubkowska A, Giemza C, et al. Hematological parameters, and hematopoietic growth factors: EPO and IL-3 in response to whole-body cryostimulation (WBC) in military academy students. PLoS ONE [Internet]. 2014 Apr 2 [cited Dec 15 2017]; 9(4): e93096. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093096>.
 37. Voitenko VP, Pисарук AV. [System prerequisites of aging]. Izvestiya Ros Akad Nauk. Series «Biologicheskaya». 1992; (4): 629–31. Russian.
 38. Wilson LJ, Cockburn E, Paice K, et al. Recovery following a marathon: a comparison of cold water immersion, whole body



22. Mawhinney C, Low DA, Jones H, et al. Cold water mediates greater reductions in limb blood flow than whole body cryotherapy. *Med Sci Sports Exerc.* 2017; 49(6): 1252–60.
23. Pournot H, Bieuzen F, Louis J, et al. Time-course of changes in inflammatory response after whole-body cryotherapy multi exposures following severe exercise. *PLoS ONE* [Internet]. 2011; 6(7): e22748. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022748>
24. Roszkowska K, Witkowska-Pilaszewicz O, Przewozny M, Cywinska A. Whole body and partial body cryotherapies – lessons from human practice and possible application for horses. *BMC Vet Res* [Internet]. 2018 Dec 12; [cited Jan 10 2019]; 14(1): 394. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1679-6>.
25. Stanek A, Sieroń-Stońny K, Romuk E, et al. Whole-Body Cryostimulation as an Effective Method of Reducing Oxidative Stress in Healthy Men. *Adv Clin Exp Med.* 2016; 25(6): 1281–91.
26. Szygula Z, Lubkowska A, Giemza C, et al. Hematological parameters, and hematopoietic growth factors: EPO and IL-3 in response to whole-body cryostimulation (WBC) in military academy students. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Apr 2 [cited Dec 15 2017]; 9(4): e93096. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093096>.
27. Wilson LJ, Cockburn E, Paice K, et al. Recovery following a marathon: a comparison of cold water immersion, whole body cryotherapy and a placebo control. *Eur J Appl Physiol.* 2018 Jan; 118(1): 153–63.
28. Wilson LJ, Dimitriou L, Hills FA, et al. Whole body cryotherapy, cold water immersion, or a placebo following resistance exercise: a case of mind over matter? *Eur J Appl Physiol.* 2019; 119 (1): 135–47.
29. Ziemann E, Olek RA, Kujach S, et al. Five-day whole-body cryostimulation, blood inflammatory markers, and performance in high-ranking professional tennis players. *J. Athl. Train.* 2012; 47(6): 664–72.
30. Ziemann E, Olek RA, Kujach S, et al. Five-day whole-body cryostimulation, blood inflammatory markers, and performance in high-ranking professional tennis players. *J Athl Train.* 2012; 47(6): 664–72.
31. Wilson LJ, Dimitriou L, Hills FA, et al. Whole body cryotherapy, cold water immersion, or a placebo following resistance exercise: a case of mind over matter? *Eur J Appl Physiol.* 2019; 119 (1): 135–47.
32. Zak KP. [The role of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of human type 1 diabetes (analytical review with the inclusion of our own data)]. *Int J Endocrinol.* 2016. 2(74): 130–9. Russian.