

УДК 57.017.3.014.43.612.112.084.017.6

В.В. Ломако

Зміни лейкоцитарного складу крові у щурів різного віку після тривалої холодової адаптації

UDC 57.017.3.014.43.612.112.084.017.6

V.V. Lomako

Changes in Blood Leukocyte Composition in Rats of Different Ages after Long-term Cold Adaptation

Ключові слова: лейкоцити крові, холодова адаптація, вік.

Key words: blood leukocytes, cold adaptation, age.

Холод — один із головних екологічних адаптогенних факторів. Оскільки людина постійно поширює сферу своєї діяльності, освоює нові простори, робота в яких пов'язана з впливом низьких і наднизьких температур (Антарктика і Арктика, підводний світ і космос), проблема вивчення механізмів адаптації до холоду має велике практичне значення. Значний інтерес для дослідників становить і віковий аспект холодової адаптації. Відповідна реакція на вплив холоду розвивається стадійно і практично в усіх системах організму. Одним із критеріїв оцінки адаптаційних реакцій організму є визначення якісно-кількісного співвідношення типів лейкоцитів у крові. Тому метою дослідження було вивчення стану лейкоцитів крові за умов тривалої холодової адаптації у щурів різного віку.

Дизайн проведених експериментів схвалений комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Дослідження виконували на 1,5-, 6-, 12- та 24-місячних самцях білих безпородних щурів. Для тривалої холодової адаптації (ТХА) тварин утримували у холодному приміщенні за температури $(8,5 \pm 1,5)^\circ\text{C}$ протягом місяця, їжа і вода *ad libitum*. Якісно-кількісну оцінку

Cold is among the major environmental adaptive factors. Since people are constantly expanding the scope of their activities, exploring new spaces where the work involves exposure to low and ultra-low temperatures (the Arctic and Antarctic, undersea world and space), the task of studying the mechanisms of cold adaptation is of crucial practical importance. The age-related aspect of cold adaptation presents a significant interest for researchers as well. The response to cold is developing by stages and in almost all body systems. One of the criteria for assessing the body's adaptive reactions is to determine the qualitative and quantitative ratio of leukocyte types in the blood. Therefore, we here aimed to investigate the state of blood leukocytes after long-term cold adaptation in rats of different ages.

The design of the experiments was approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv) in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The study was performed in 1.5-, 6-, 12-, and 24-month-old white outbred male rats. For long-term cold adaptation (LTCA), the animals were kept in a cold room at a temperature of $(8.5 \pm 1.5)^\circ\text{C}$ for a month, with food and water

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

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

Автор для кореспонденції:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: victoria0regia@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: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 26.08. 2022
Прийнята до друку 08.11.2023

Received 26, August, 2022
Accepted 08, November, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

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.

типів лейкоцитів здійснювали на мазках крові, оброблених фіксатором Май-Грюнвальда («Міні-Мед», РФ) і забарвлених гематологічним барвником за Романовським («МініМед»). Загальну кількість лейкоцитів визначали у камері Горяєва. Розраховували інтегральні лейкоцитарні індекси (ЛІІ) [3, 4]. Забір крові одночасно з фрагментами тканин для інших досліджень проводили після декапітації тварин.

Щурів кожного віку розділили на групи: інтактний контроль та після ТХА.

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

Лейкоцитарні показники за умов фізіологічного старіння у 1,5-, 6-, 12-, 18- і 24-місячних щурів ми вивчали раніше [4]. Було встановлено, що з 12 місяців у тварин розвивається лейкоцитоз, з 18 місяців — нейтрофіліоз, еозино- і моноцитоз, а також лімфопенія. Зміни ЛІІ вказують на те, що з 18-місячного віку в організмі щурів нарастають інфекційна інтоксикація і запалення, активуються ефекторна і клітинна ланки імунної системи, процеси гіперчутливості уповільненого типу, у крові переважають клітини неспецифічного захисту (нейтрофіли) та їхні незрілі форми, знижуються імунореактивність і адаптація організму. У табл. 1 і 2 наведено показники контрольних груп інтактних щурів відповідного віку.

Тривала холодова адаптація порівняно з контрольними щурами відповідного віку призводила до лейкопенії (окрім 6-місячних), збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів (найменше у 1,5-місячних) і моноцитів (тільки у 1,5- і 24-місячних), зменшення відсотка паличкоядерних клітин (тільки у 12- і 24-місячних), лімфоцитів (найбільше у 24-місячних) та еозинофілів (тільки у 24-місячних, контрольний рівень у яких був найбільшим) (табл. 1). Крім того, у мазках крові 18-місячних інтактних щурів виявлялися поліхроматофільні та юні (міелоцити) клітини (1:100), а також плазматизація цитоплазми у деяких лейкоцитів (тільки у 24-місячних щурів) [4]. Поява незрілих форм лейкоцитів у крові обумовлена порушенням їхнього дозрівання у кровотворній тканині, підвищенням проникності кісткового бар'єра і/або посиленням їхньої продукції. Слід зазначити, що у мазках крові щурів будь-якого віку після ТХА незрілі форми лейкоцитів і плазматизація цитоплазми були відсутні.

Лейкопенії можуть визначатися збоями у лейкопоезі, руйнуванням лейкоцитів у судинах та

ad libitum. Leukocyte types were quantitatively and qualitatively assessed in blood smears fixed with May-Grunwald solution (MiniMed, Russia) and stained with haematological dye according to Romanowsky (MiniMed). The total leukocyte count was determined in Goryaev chamber. The integral leukocyte indices (ILIs) were calculated [3, 4]. Blood was taken simultaneously with tissue fragments for other studies after decapitation of animals.

Rats of each age were divided into the groups: intact control and after LTCA.

Results were statistically processed using the Kruskal-Wallis nonparametric statistic method with Statistica 6.0 software (MatStat Inc., USA).

Leukocyte counts under physiological ageing in 1.5-, 6-, 12-, 18-, and 24-month-old rats have been studied previously [4]. After 12-month age, the animals were found to develop leukocytosis, and since 18 months – neutrophilosis, eosino- and monocytosis, and lymphopenia. Changes in ILIs showed an increase in infectious intoxication and inflammation, the activation of effector and cellular components of the immune system, and delayed-type hypersensitivity, the predomination of nonspecific defense cells (neutrophils) and their immature forms in the blood, a decrease in immune reactivity and body adaptation in rats from the age of 18 months. Tables 1 and 2 show the indices of control groups of intact rats of the corresponding age.

Long-term cold adaptation compared to the control rats of the corresponding age resulted in leukopenia (except for 6-month-old rats), an increase in the number of segmented neutrophils (least in 1.5-month-old rats) and monocytes (only in 1.5- and 24-month-olds), a decrease in the percentage of band cells (only in 12- and 24-month-olds), lymphocytes (most of all in 24-month-olds) and eosinophils (only in 24-month-olds, whose control level was the highest) (Table 1). In addition, the blood smears of 18-month-old intact rats showed polychromatophilic and young (myelocytes) cells (1:100), as well as the cytoplasm plasmation in some leukocytes (only in 24-month-old rats) [4]. The appearance of immature leukocytes in blood is due to a disorder in their maturation in haematopoietic tissue, increased permeability of bone barrier and/or enhanced production. Notably, that no immature leukocytes and cytoplasm plasmation were seen in blood smears of rats of any age after LTCA.

Leukopenia can be determined by disruptions in leukopoiesis, leukocyte destruction in blood vessels



Таблиця 1. Співвідношення типів лейкоцитів у крові щурів різного віку після тривалої холодової адаптації ($M \pm SE$)
Title 1. Ratio of leukocyte types in blood of rats of different ages after long-term cold adaptation ($M \pm SE$)

Контроль Control				Тривала холодова адаптація Long-term cold adaptation			
Вік, місяць Age, months							
1,5 (n = 6)	6 (n = 15)	12 (n = 6)	24 (n = 6)	1,5 (n = 6)	6 (n = 12)	12 (n = 6)	24 (n = 12)
Загальна кількість лейкоцитів, $10^9/л$ Total leukocyte count, $10^9/l$							
5,8 ± 0,2	6,5 ± 0,1	7,3 ± 0,4	8,5 ± 0,8	4,3 ± 0,2*	7,1 ± 0,6	4,5 ± 0,1*	4,3 ± 0,3*
Паличкоядерні нейтрофіли, % Band neutrophils, %							
2,0 ± 0,4	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,8	2,4 ± 0,6	1,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,4
Сегментноядерні нейтрофіли, % Segmented neutrophils, %							
28,5 ± 0,9	27,1 ± 1,5	26,5 ± 1,4	32,8 ± 1,8	33,7 ± 2,8	40,7 ± 1,8*	56,8 ± 1,8*	58,6 ± 2,8*
Еозинофіли, % Eosinophils, %							
1,0 ± 0,3	3,5 ± 0,7	1,7 ± 0,3	8,2 ± 2,1	0,7 ± 0,3	2,6 ± 0,5	2,5 ± 0,7	2,4 ± 0,8*
Лімфоцити, % Lymphocytes, %							
67,2 ± 1,0	65,5 ± 1,3	69,5 ± 1,1	54,2 ± 3,0	60,3 ± 2,9*	54,0 ± 2,1*	37,8 ± 2,3*	31,7 ± 4,3*
Моноцити, % Monocytes, %							
1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,3*	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,4*

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контролем відповідного віку, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant compared to the control of corresponding age, $p < 0.05$.

їхньою утилізацією або перерозподільними нейтропеніями, при яких порушується співвідношення пристінкового пулу та циркулюючих клітин або групуванням всіх нейтрофілів в одній проблемній зоні. Як показано Н.В. Carey [2], у гібернаторів лейкопенія може знижувати ризик запальної інфільтрації у ЦНС під час виходу зі сплячки; протягом сплячки умови циркуляції змінюються, оскільки частина лейкоцитів із судин мігрує у тканини селезінки, легеней,

and their disposal, or redistributive neutropenia, in which the ratio of the wall pool to circulating cells is disturbed, or when all the neutrophils are clustered in one problem area. H.V. Carey [2] has found that leukopenia in hibernators may reduce the risk of inflammatory infiltration in the CNS during arousal from hibernation; the circulation conditions during hibernation are changed since some leukocytes migrate from blood vessels to tissues of spleen, lungs, bone marrow, and



кісткового мозку, слизової шлунково-кишкового тракту, в яких вони депонуються.

Збільшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів у крові щурів усіх вікових груп після ТХА і на тлі зменшення кількості лімфоцитів може бути наслідком фізіологічних змін, пов'язаних із перенапруженням задіяних функціональних систем і стресом. Зменшення відсотка паличкоядерних (незрілих) нейтрофілів може обумовлюватися прискоренням їхнього дозрівання або зниженням лейкопоетичної активності кісткового мозку під впливом біологічно активних речовин та/або фізичних факторів. Зменшення кількості еозинофілів у крові часто спостерігається на початку запалення [1]. Лімфопенія може бути пов'язана з переміщенням цих клітин із крові безпосередньо до осередків запалення. Моноцити здатні знищувати загиблі клітини в осередках запалення, сприяючи регенерації тканин у місці пошкодження, та беруть участь, зокрема, у формуванні «іммунної» пам'яті та специфічного імунітету. Збільшення кількості моноцитів у крові може свідчити про активацію механізмів протидії розвитку патологічних процесів та/або змін, супутніх фізіологічному старінню [1].

На підставі виявлених співвідношень типів лейкоцитів розраховувалися ІЛІ [3, 4]. Так, з дванадцяти вивчених індексів вісім змінювалися односпрямовано: індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів, індекс зсуву лейкоцитів і лейкоцитарний індекс інтоксикації зростали, а лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс, індекси алергізації та адаптації Гаркаві, лімфоцитарний індекс та індекс імунореактивності (у 24-місячних щурів тенденція) знижувалися (табл. 2).

Такі зміни означених ІЛІ можуть свідчити про переважання клітин неспецифічного захисту (нейтрофілів), активний запальний процес, порушення імунореактивності, ендогенну інтоксикацію, зниження рівня алергізації та адаптації організму, активацію клітинної ланки імунної системи і зниження імунореактивності. Крім того, індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів у 1,5-місячних тварин зменшувався, а у 12- і 24-місячних, навпаки, збільшувався, що свідчить про активацію макро- або мікрофагальної систем відповідно, у 6-місячних щурів цей показник не змінювався. Індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів знижувався у щурів всіх вікових груп, окрім 24-місячних, тобто посилювалася ефektorна ланка імунологічного процесу. У 12- і 24-місячних тварин індекс ядерного зсуву зменшувався, що вказує на переважання у крові зрілих форм нейтрофілів. Індекс співвід-

gastrointestinal mucosa, where they are deposited.

An increased content of segmented neutrophils in blood of rats of all age groups after LTCA and against a decrease in lymphocyte count may result from physiological changes associated with overstrain of the involved functional systems and stress. A reduction in the percentage of band (immature) neutrophils may be due to their accelerated maturation or a decrease in leukopoietic activity of bone marrow under the effect of biologically active substances and/or physical factors. A decrease in eosinophil number in blood is often observed at the onset of inflammation [1]. Lymphopenia may be associated with the movement of these cells from blood directly to the inflammatory foci. Monocytes are capable of destroying dead cells in the inflammatory foci, by promoting the tissue regeneration at the site of injury, and are involved in the formation of 'immune' memory and specific immunity. An increased number of monocytes in blood may suggest the activation of mechanisms that resist the development of pathological processes and/or changes associated with physiological ageing [1].

Proceeding from the found ratios of leukocyte types, the ILIs were calculated [3, 4]. For example, eight of the twelve indices under study changed unidirectionally: the index of neutrophil to lymphocyte ratio, leukocyte shift index, and leukocyte index of intoxication increased, while the lymphocyte-granulocyte index, indices of allergization and adaptation by Garkavi, lymphocyte index, and that of immune reactivity (tendency in 24-month-old rats) decreased (Table 2).

These changes in the above-mentioned ILIs testify to the predominance of cells of nonspecific defense (neutrophils), an active inflammatory process, impaired immune reactivity, endogenous intoxication, a decreased level of allergization and adaptation of the body, activation of the cellular component of the immune system and a reduction of immune reactivity. In addition, the index of neutrophil to monocyte ratio was declining in 1.5-month-old animals, and, on the contrary, rising in 12- and 24-month-old ones, thus evidencing the activation of macro- or microphage systems, respectively; in 6-month-old rats, this index remained unchanged. The index of lymphocyte to monocyte ratio decreased in rats of all age groups, except 24-month-old animals, *i. e.*, the effector component of immunological process was enhanced. In 12- and 24-month-old animals, the nuclear shift index decreased, indicating the predominance of mature neutrophil forms in their blood. The index



Таблиця 2. Інтегральні лейкоцитарні індекси у щурів різного віку після тривалої холодової адаптації ($M \pm SE$)
Title 2. Integral leukocyte indices in rats of different ages after long-term cold adaptation ($M \pm SE$)

Контроль Control				Тривала холодова адаптація Long-term cold adaptation			
Вік, місяць Age, months							
1,5 (n = 6)	6 (n = 15)	12 (n = 6)	24 (n = 6)	1,5 (n = 6)	6 (n = 12)	12 (n = 6)	24 (n = 12)
Індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів Index of neutrophil to monocyte ratio							
28,0 ± 2,8	23,6 ± 2,4	25,7 ± 3,0	20,7 ± 3,1	14,4 ± 1,8*	28,9 ± 3,1	43,4 ± 6,4*	30,8 ± 3,9*
Індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів Index of lymphocyte to monocyte ratio							
61,6 ± 6,7	54,2 ± 2,0	63,4 ± 5,5	32,2 ± 5,9	24,2 ± 3,7*	38,3 ± 5,2*	28,7 ± 5,1*	23,0 ± 6,1
Індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів Index of neutrophil to lymphocyte ratio							
0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1*	0,8 ± 0,1*	1,6 ± 0,1*	2,0 ± 0,3*
Лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс Lymphocyte-granulocyte index							
21,5 ± 1,1	20,9 ± 1,3	24,0 ± 1,4	12,8 ± 1,4	17,3 ± 2,5	12,6 ± 1,4*	6,3 ± 0,6*	6,4 ± 1,1*
Індекс алергізації Index of allergization							
2,8 ± 0,1	3,9 ± 0,4	3,4 ± 0,3	4,0 ± 0,6	2,1 ± 0,4*	2,1 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*
Індекс ядерного зсуву Nuclear shift index							
0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0*	0,1 ± 0,0*
Індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів Index of lymphocyte to eosinophil ratio							
46,2 ± 12,0	17,8 ± 2,9	49,9 ± 8,6	20,1 ± 4,6	17,7 ± 10,1*	24,6 ± 6,2	26,2 ± 10,7*	21,3 ± 5,8
Індекс зсуву лейкоцитів Leukocyte shift index							
0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1*	0,8 ± 0,1*	1,6 ± 0,2*	1,9 ± 0,2*
Індекс адаптації Гаркаві Index of adaptation by Garkavi							
2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2*	1,4 ± 0,1*	1,7 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
Лейкоцитарний індекс Leukocyte index							
2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2*	1,3 ± 0,1*	0,7 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
Лейкоцитарний індекс інтоксикації Кальф-Каліфа Leukocyte index of intoxication by Kalf-Kaliph							
0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,2 ± 0,0*	0,5 ± 0,1*	0,9 ± 0,1*
Індекс імунореактивності Index of immune reactivity							
62,5 ± 5,8	59,5 ± 5,8	65,0 ± 5,7	35,7 ± 5,7	24,9 ± 3,6*	40,0 ± 5,2*	47,4 ± 8,0*	24,0 ± 6,0

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контролем відповідного віку, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant compared to the control of corresponding age, $p < 0.05$.

ношення лімфоцитів і еозинофілів знижувався тільки у щурів 1,5- і 12-місячного віку, тобто у них переважали процеси гіперчутливості уповільненого типу (табл. 2).

S. Ponnappan та співавт. [5] відзначають, що як за старіння, так і у відповідь на будь-які впливи нормальне функціонування імунної системи може змінюватися у різних напрямках: пригнічення/активація або розкоординація різних її ланок та структурних складових.

Встановлено, що тривала холодова адаптація протягом 30 діб щурів різних вікових груп за температури близько 10°C призводить як до односпрямованих, так і залежних від віку змін якісно-кількісних співвідношень типів лейкоцитів крові і різних ланок імунологічного процесу (за показниками ІЛІ), що відображають істотні перебудови задіяних функціональних систем.

Після ТХА у щурів всіх вікових груп спостерігається лейкопенія на тлі збільшення пулу сегментоядерних нейтрофілів і зменшення кількості лімфоцитів, а також відзначається зниження імунореактивності, рівня адаптації та алергізації, активація запального процесу, інтоксикації, клітинної та ефекторної ланок імунітету. Вміст паличкоядерних клітин, еозинофілів і моноцитів та активація макро- або мікрофагальної системи і процесів гіперчутливості уповільненого типу залежить від віку тварин.

of lymphocyte to eosinophil ratio was reduced only in 1.5- and 12-month old rats, *i. e.* the delayed-type hypersensitivity was predominant in them (Table 2).

S. Ponnappan *et al.* [5] emphasize that both during ageing and in response to any impact, the normal functioning of the immune system can be changed in different directions: inhibition/activation or discoordination of its various links and structural components.

It was found that the long-term 30-day cold adaptation of rats from different age groups at a temperature of about 10°C resulted in both unidirectional and age-dependent changes in quantitative and qualitative ratios of blood leukocyte types and various components of immunological process (according to the ILIs), reflecting significant rearrangements of the functional systems involved.

After LTCA, the leukopenia was observed in rats of all age groups against the background of an increased pool of segmented neutrophils and a decreased number of lymphocytes, as well as the reduction of immune reactivity, level of adaptation and allergization, activation of inflammatory process, intoxication, cellular and effector immunity. The content of band cells, eosinophils and monocytes and activation of macro- or microphage system and delayed-type hypersensitivity depend on the age of animals.

Література

1. Абдулкадыров КМ, редактор. Гематология, новейший справочник. Москва: ЭКСМО; 2004. 928 с.
2. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1153–81.
3. Dong CH, Wang ZM, Chen SY. Neutrophil to lymphocyte ratio predict mortality and major adverse cardiac events in acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem.* 2018; 52: 131–6.
4. Lomako VV. Blood leukocyte indices in male rats of different ages. *Advances in Gerontology.* 2020; 10(2): 135–41.
5. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(8): 1551–85.

References

1. Abdulkadyrov KM, editor. [Hematology, the newest guidance]. Moscow: EKSMO; 2004: 928 p. Russian.
2. Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev.* 2003; 83: 1153–81.
3. Dong CH, Wang ZM, Chen SY. Neutrophil to lymphocyte ratio predict mortality and major adverse cardiac events in acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem.* 2018; 52: 131–6.
4. Lomako VV. Blood leukocyte indices in male rats of different ages. *Advances in Gerontology.* 2020; 10(2): 135–41.
5. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(8): 1551–85.

