

УДК 57.086.13:612.111.085.2

В.В. Ломако\*, О.В. Шило, І.Ф. Коваленко

## Вплив загальної кріостимуляції (–120°C) на трансформацію еритроцитів крові молодих щурів

UDC 57.086.13:612.111.085.2

V.V. Lomako\*, O.V. Shylo, I.F. Kovalenko

## Influence of Whole-Body Cryostimulation (–120°C) on Transformation of Blood Erythrocytes in Young Rats

**Ключевые слова:** эритроциты, криокамера, общая кріостимуляція, крысы.

**Ключові слова:** еритроцити; криокамера, загальна кріостимуляція, щури.

**Key words:** erythrocytes, cryochamber, whole-body cryostimulation, rats.

Екстремально низькі температури (–60...–160°C) широко використовують для стимуляції певних функціональних систем організму людини та відновлення балансу в них, а також для лікування ряду захворювань [8, 9]. Однак дотепер більшість відповідних реакцій організму на кріостимуляцію залишаються невизначеними. Стан системи крові, зокрема її високоспеціалізованих клітин – еритроцитів, значною мірою відображає будь-які зміни в організмі.

Мета роботи – вивчення динаміки трансформації еритроцитів крові молодих щурів після загальної кріостимуляції (–120°C).

Експерименти були проведені відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики ІПКіК НАН України, погоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Роботу виконували на 6–7-місячних самцях білих безпородних щурів, які до початку експерименту перебували в умовах віварію за природного світлового режиму на стандартному раціоні *ad libitum*. Загальну кріостимуляцію (ЗКС) здійснювали за температури –120°C у експериментальній криокамері для охолодження дрібних лабораторних тварин [1]. Тривалість сеансу ЗКС становила 90 с. Загалом було проведено три кріовпливи з інтервалом у добу. Темпе-

Extremely low temperatures (–60...–160°C) are widely used to stimulate certain functional systems of human body and restore the homeostasis, as well as to treat a number of diseases [5, 7]. However, until now, most of the corresponding body responses to cryostimulation have remained vague. The state of blood system, in particular the one of its highly specialized cells, erythrocytes, largely reflects any changes in the body.

The purpose of this research was to study the dynamics of erythrocyte transformation in the blood of young rats after the whole-body cryostimulation (–120°C).

Experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ № 3447-IV dated of February 21<sup>st</sup>, 2006), and 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, agreed with the statements of the ‘European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986).

The work was performed in 6–7 month old males of white outbred rats, which before the experiment were maintained in the animal facility with natural light/dark cycle and a standart diet *ad libitum*. The whole-body cryostimulation (WBC) was carried out at a temperature of –120°C in an experimental cryochamber designated for the cooling of small laboratory animals [1]. The duration of the WBC session was 90 seconds. In general,

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

Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 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: victoria0regia@gmail.com

**\*To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 24.10.2017

Прийнята до друку 11.09.2018

Received October, 24, 2017

Accepted September, 11, 2018

© 2018 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.

ратуру тіла (ТТ) контролювали електронним термометром за допомогою ректального датчика. Експериментальних тварин було поділено на 9 груп ( $n = 5$  у кожній): 1 – контроль (інтактні тварини); 2–4 – одразу після 1–3-х сеансів ЗКС; 5–7 – через добу після 1–3-х сеансів ЗКС; 8–9 – через тиждень після 1-го та 3-х сеансів ЗКС відповідно.

Динаміку трансформації еритроцитів досліджували методом малокутового розсіювання світла на приладі, розробленому в ІПКіК НАН України (м. Харків). Залежність інтенсивності розсіювання світла суспензією еритроцитів від кількості клітин в ній вивчали під кутом  $90^\circ$  у напрямку до падаючого променя. У вимірювальну ємність, яка містить 3,0 мл розчину NaCl різної концентрації (від 0,15 до 0,05 М), вносили 30 мкл еритроцитів, отриманої після відстоювання крові й аспірації плазми. Усі дослідження проводили за температури  $20^\circ\text{C}$ . Розподіл еритроцитів за індексом сферичності (ІС) обчислювали із залежностей осмотичної крихкості, використовуючи фізико-математичну модель гіпотонічного гемолізу еритроцитів у розчині непроникаючої речовини [6]. Індекс сферичності прямо пропорційний поверхнево-об'ємному співвідношенню ( $S/V$ ) і характеризує форму клітин. Форми еритроцитів, які переважали у наступних інтервалах ІС, розподілили таким чином: (1...1,3) – сфероцити, (1,3...1,7) – стоматоцити (1,7...2,1) – нормальні та (2,1...3) – сплюснені дискоцити.

На підставі результатів обчислення співвідношень форм еритроцитів розраховували індекси трансформації еритроцитів: індекс трансформації –  $(\text{ОД} + \text{НД})/D$ ; індекс оборотної трансформації –  $\text{ОД}/D$ ; індекс необоротної трансформації –  $\text{НД}/D$ ; індекс оборотності –  $\text{ОД}/\text{НД}$ , де  $\text{ОД}$  – відсоток оборотно деформованих еритроцитів;  $\text{НД}$  – відсоток необоротно деформованих еритроцитів;  $D$  – відсоток дискоцитів. Статистичну обробку проводили методом ANOVA.

Щільність розподілу еритроцитів за ІС – важлива об'єктивна характеристика крові для оцінки інтенсивності відповідної реакції організму на вплив. Прискорення видалення з кров'яного русла низькорезистентних, деградованих, дефектних і старих клітин є адаптивною та стереотипною реакцією еритроцитарної ланки системи крові на стрес, яка спрямована на стимуляцію еритропоезу [4, 7] і таким чином популяція еритроцитів стає більш гомогенною. Однак одразу після 1-го та 2-х сеансів ЗКС, через добу після 1-го сеансу та тиждень після 3-х сеансів частка нормальних дискоцитів зменшувалася на фоні збільшення необоротно змінених форм (сфероцитів) (таблиця). Частка нормальних дискоцитів збільшувалася тільки через добу після 2- і 3-х сеансів ЗКС ( $-120^\circ\text{C}$ ), а високорезистентних сплюснених

three cryoexposures were conducted with an interval of 24 hrs. Body temperature (BT) was controlled by an electron thermometer with a rectal probe. Experimental animals were divided into 9 groups ( $n = 5$  each): 1 – control (intact animals); 2–4 – immediately after 1–3 sessions of the WBC; 5–7 – 24 hrs after 1–3 sessions of the WBC; 8–9 – one week after the 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> sessions of the WBC, respectively.

The dynamics of erythrocyte transformation was investigated by the method of low-angle light scattering with the device, developed by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. Dependence of the intensity of light scattering of erythrocyte cell suspension on the number of cells in it was studied at an angle of  $90^\circ$  to the incident beam. Measuring container was filled with 3.0 ml of a NaCl solution of various concentrations (from 0.15 to 0.05 M), and 30  $\mu\text{l}$  of erythrocytes obtained after blood settling and plasma aspiration. All the studies were performed at a temperature of  $20^\circ\text{C}$ . The distribution of erythrocytes according to the sphericity index (SI) was calculated from the dependences of their osmotic fragility using the model of hypotonic hemolysis of erythrocytes in the solution of non-penetrating substance [3]. The sphericity index is directly proportional to the surface-to-volume ratio ( $S/V$ ) and characterizes the shape of the cells. The shapes of erythrocytes that predominated in the particular intervals of the SI were distributed as follows: (1...1.3) – spherocytes, (1.3...1.7) – stomatocytes, (1.7...2.1) – normal and (2.1...3) – flattened discocytes.

Basing on the calculation of the ratios of erythrocyte shapes the following indices of erythrocytes transformation have been calculated: the index of transformation –  $(\text{RD} + \text{ID})/D$ ; the index of reversible transformation –  $\text{RD}/D$ , the index of irreversible transformation –  $\text{ID}/D$ ; the index of reversibility –  $\text{RD}/\text{ID}$ , where  $\text{RD}$  – percentage of reversibly deformed erythrocytes;  $\text{ID}$  – percentage of irreversibly deformed erythrocytes;  $D$  – percentage of discocytes. Statistical processing was carried out using the ANOVA test.

Density of erythrocytes distribution according to the SI is an important objective characteristic of blood which could be used to assess the intensity of the specific response of the organism to a particular exposure. Accelerated removal from the bloodstream of low-resistant, degraded, defective and old cells is an adaptive and typical response of the erythrocytes of blood system to a stress, and is aimed to stimulate the erythropoiesis [4, 8]. Following the process the erythrocytes population becomes more homogeneous. Nevertheless, immediately after the first and second sessions of the WBC, 24 hrs after the 1<sup>st</sup> session and

Розподіл форм еритроцитів та індекси їх трансформації після загальної кріостимуляції ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) ( $M \pm SE$ )  
 Distribution of erythrocyte shapes and the indices of transformation after whole-body cryostimulation ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) ( $M \pm SE$ )

Умови експерименту Experimental conditions	Форми еритроцитів, % Erythrocyte shapes, %				Індекси Indices of	
	Дискоцити Discocytes		Стоматоцити Stomatocytes	Сфероцити Spherocytes	трансформації transformation	оборотності reversibility
	сплощені flattened	нормальні normal				
Контроль Control	4,7 ± 0,66	50,83 ± 1,91	43,84 ± 2,31	1,02 ± 0,29	0,85 ± 0,09	30,6 ± 7,64
1 сеанс ЗКС One session of WBC	6,6 ± 1,06	44,52 ± 2,74*	47,66 ± 1,65	1,2 ± 0,59	0,96 ± 0,07	18,98 ± 10,18
2 сеанси ЗКС Two sessions of WBC	5,37 ± 0,53	43,96 ± 1,43*	46,37 ± 1,46	4,275 ± 0,55*	1,04 ± 0,06	12,13 ± 1,62*
3 сеанси ЗКС Three sessions of WBC	10,22 ± 2,82*	48,94 ± 3,19	40,42 ± 4,45	0,46 ± 0,46*	0,73 ± 0,14	4,2 ± 4,2*
Доба після одного сеансу ЗКС 24 hrs after one session of WBC	3,67 ± 0,39	45,78 ± 1,61*	45,3 ± 1,78	5,22 ± 0,69*	1,03 ± 0,07	9,95 ± 1,75*
Доба після двох сеансів ЗКС 24 hrs after two sessions of WBC	8,17 ± 1,01*	55,87 ± 2,29*	30,65 ± 1,49*	5,35 ± 1,68*	0,58 ± 0,09*	7,81 ± 1,88*
Доба після трьох сеансів ЗКС 24 hrs after three sessions of WBC	7,44 ± 0,97*	55,67 ± 1,79*	34,34 ± 2,38*	2,56 ± 0,62*	0,6 ± 0,08*	14,42 ± 3,4*
Тиждень після одного сеансу ЗКС One week after one session of WBC	2,35 ± 0,5*	39,92 ± 5,37*	54,87 ± 7,2*	2,92 ± 1,59*	1,27 ± 0,41	18,58 ± 12,84
Тиждень після трьох сеансів ЗКС One week after three sessions of WBC	1,37 ± 0,38*	36,21 ± 2,12*	58,23 ± 2,42*	4,22 ± 0,63*	1,71 ± 0,16*	17,13 ± 4,81*

**Примітки:** \* – відмінності статистично значущі порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

**Notes:** \* – differences are statistically significant if compared with the control,  $p < 0,05$ .

дискоцитів – одразу після 3-х сеансів (більш ніж у два рази) і через добу (таблиця). При цьому відзначалося зменшення частки стоматоцитів і збільшення сфероцитів (крім 1-го та 3-х сеансів). Слід зазначити, що через тиждень після 1-го та 3-х сеансів ЗКС зменшувалася частка дискоцитів (нормальних та сплоснених), а змінених форм еритроцитів (як оборотних, так і необоротних), навпаки, збільшувалася (таблиця). Отже, на всіх етапах дослідження після ЗКС ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) популяція еритроцитів крові молодих щурів ставала більш гетерогенною, а гетерогенна популяція еритроцитів (збільшення частки змінених форм) більш чутлива до дії осмотичного фактора, рН та зміни ТТ [5, 7]. Раніше було показано [3], що у щурів за умов гіпотермії, незалежно від способу її досягнення і ступеня зниження ТТ: краніоцеребральна і загальна імерсійна гіпотер-

one week after 3<sup>rd</sup> sessions, the portion of normal discocytes decreased on the background of an increase of irreversibly altered shapes (spherocytes) (Table). The percentage of normal discocytes increased only after 24 hrs following 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sessions of the WBC ( $-120^{\circ}\text{C}$ ), and for high-resistive flattened discocytes it appeared immediately after 3<sup>rd</sup> sessions (more than twice) and in 24 hrs (Table). At the same time there was a decrease in the part of stomatocytes and an increase in spherocytes (excluding the sessions 1 and 3). It should be noted that one week after the first and third sessions of the WBC, the proportion of discocytes (normal and flattened) decreased, and *vice versa* the part of the altered forms of erythrocytes (both reversible and irreversible) was increased (Table). Consequently, in all cases the WBC ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) resulted in higher heterogeneity of the red blood cell population in young rats, and moreover

мія, а також загальна гіпотермія на тлі наростання гіпоксії-гіперкапнії (ТТ знижувалася до 32, 27 і 17°C відповідно) – спостерігається зворотна, але різна за вираженістю зміна співвідношення форм еритроцитів. Частка дискоцитів зменшується, а змінених форм (стоматоцитів і сфероцитів) – збільшується, Через добу спостерігається тенденція до збільшення частки дискоцитів за рахунок сплосчених форм на тлі зменшення змінених форм еритроцитів [3]. Однак після ЗКС (-120°C) (таблиця), коли ТТ не була нижчою за 37°C (нижня межа нормальної ТТ у щурів), на відміну від стану гіпотермії динаміка трансформації була іншою і визначалася кратністю сеансів кріостимуляції та терміном спостереження (відновлення). Відомо, що здатність еритроцитів до трансформації має адаптаційно-присосувальне значення. Розраховуючи індекси трансформації еритроцитів, можна розширити уявлення про процеси їх трансформації. Використовуючи значення співвідношень форм еритроцитів, були розраховані індекси трансформації еритроцитів (таблиця). Зменшення індексу трансформації та збільшення індексу оборотної трансформації вказують на ригідність еритроцитарної системи внаслідок прискорення видалення нестійких форм. Такі зміни свідчать про адаптаційні реакції системи еритрону. Однак після ЗКС (-120°C) зміни індексів трансформації мали іншу спрямованість. Одразу після ЗКС змінювався тільки індекс необоротної трансформації (підвищувався після двох сеансів із  $0,02 \pm 0,02$  (контроль) до  $0,09 \pm 0,01$ ). Через добу після 3-х сеансів ЗКС знижувалися індекси трансформації, оборотної трансформації (з  $0,94 \pm 0,11$  в контролі до  $0,49 \pm 0,05$ ) та, особливо, оборотності, а через тиждень після ЗКС вони підвищувалися (індекси оборотної та необоротної трансформації до  $1,65 \pm 0,16$  та  $0,11 \pm 0,02$  відповідно), крім індексу оборотності (залишався зниженим). Слід зазначити, що групи експериментальних тварин 2 та 8 (одразу та через тиждень після 1-го сеансу ЗКС) за індексом оборотності розподілилися на дві підгрупи: з низькими його значеннями та значенням на рівні контрольної групи (таблиця).

Напруга неспецифічних адаптаційних реакцій призводить до збільшення в крові частки оборотно змінених форм еритроцитів. Згідно з Л. Х. Гаркаві з співавт. [2], за певних умов процеси адаптації, формування яких супроводжується напругою та ймовірним виснаженням, можуть стати такими, що набувають тренувального ефекту.

Таким чином, ЗКС (-120°C) приводить до суттєвих змін трансформації еритроцитів у крові молодих щурів, спрямованість і вираженість яких залежать від кратності впливу та термінів спостереження. На тлі підвищення як оборотно, так і не-

the heterogeneous erythrocyte populations (increased part of altered forms) were more sensitive to the effect of an osmotic factor, pH, and changes in BT [4, 9]. Previously, it has been shown [6] that reversible, but differently manifested changes in the ratio of erythrocyte forms are found in the rats undergoing hypothermia, regardless of the method of its achievement and the degree of reduction of the BT (craniocerebral and whole-body immersion hypothermia, as well as whole-body hypothermia on the background of an increased hypoxia-hypercapnia (the BT decreased down to 32, 27 and 17°C, respectively)). The portion of discocytes decreases, and of the altered forms (stomatocytes and spherocytes) increases. A day later, there was tendency to an increased percentage of discocytes owing to flattened forms on the background of reduced amount of transformed erythrocytes [6]. However, if after the WBC (-120°C) (Table), the BT was not lower than 37°C (lower limit of normal BT in rats), the dynamics of transformation was different comparing the one at hypothermia, and was determined by the number of cryostimulation sessions and the period of observation (recovery). It is known that the ability of erythrocytes to transformation has an adaptive value. By calculating the indices of erythrocyte transformation, one can expand the knowledge about these processes. Using the ratios of erythrocyte shapes, we have calculated the transformation indices of erythrocytes (Table). The decrease of the index of transformation and the increase of the one of reversibility transformation indicate the rigidity of the erythrocytic system as a result of accelerating the removal of unstable shapes. These changes indicate adaptive responses of the erythron system. However, the WBC (-120°C) resulted in altered direction of the transformation indices. Right after the WBC only the index of irreversible transformation was changed (it was increased after two sessions from  $0.02 \pm 0.02$  (control) to  $0.09 \pm 0.01$ ). In 24 hrs after 3<sup>rd</sup> sessions of the WBC the indices of transformation, reversible transformation (from  $0.94 \pm 0.11$  (control) to  $0.49 \pm 0.05$ ) and, especially, reversibility were declined, and a week after the WBC they were increased (the indices of reversible and irreversible transformation to  $1.65 \pm 0.16$  and  $0.11 \pm 0.02$ , respectively), excluding the index of reversibility (it remained low). It should be noted that the experimental animals of groups 2 and 8 (immediately and one week after the 1<sup>st</sup> session of the WBC) could be divided into two subgroups according to the found reversibility index values: a group with low values and the one left at the control group level (Table).

The intensity of nonspecific adaptive reactions leads to an increase in the ratio of reversibly altered forms of erythrocytes in blood. According to L.Kh. Gar-kavi *et al.* [2], if adaptation processes are accompanied



оборотно змінених форм еритроцитів зменшується частка нормальних дискоцитів, але збільшується частка високорезистентних сплюснених дискоцитів (крім як через тиждень після ЗКС, коли вона, навпаки, зменшувалася). Значення інтегральних показників трансформації (індекси трансформації) еритроцитів вказують на зниження її оборотності після ЗКС.

### Література

1. Бабійчук ГО, Козлов ОВ, Ломакін ІІ, Бабійчук ВГ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Кріокамера для експериментального охолодження лабораторних тварин. Патент України № 40168. 25.03.2009.
2. Гаркави ЛХ, Квакина ЕБ, Уколова МА. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов н/Д: Издательство Ростовского университета; 1990. 224 с.
3. Ломако ВВ, Шило АВ, Коваленко ИФ, Бабійчук ГА. Эритроциты гетеро- и гомойотермных животных при естественной и искусственной гипотермии. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2015; 51(1): 52–9.
4. Луговская СА, Козинец ГИ. Иерархия гемопозитических клеток: кинетика, структура и функции. Клиническая лабораторная диагностика. 2009; (5): 21–37.
5. Рязанцева НВ, Новицкий ВВ, Степовая ЕА, Ткаченко ТН. Ультраструктура эритроцитов в норме и при патологии: морфологические феномены, клинические аспекты. Морфология. 2004; 126(5): 48–51.
6. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. Bioelectrochem. 2004; 62: 119–22.
7. Harvey JW. The Erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical Disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. London: Elsevier; 2008. p. 173–240.
8. 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: 121–5.
9. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. Front Physiol. 2017 May 2 [Cited 09.12.2017]; 8: Article 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>.

by tension and probable exhaustion, under certain conditions they can acquire a training effect.

Thus, the WBC ( $-120^{\circ}\text{C}$ ) leads to significant changes in erythrocyte transformation in blood of young rats, the direction and manifestation of which depend on the multiplicity of exposures and the observation time. With the increase in content of both reversibly and irreversibly altered forms of erythrocytes, the part of normal discocytes decreases, but the one of high-resistant flattened discocytes increases (except the case when in a week after the WBC it was decreased). Calculated integral indices of transformation of erythrocytes indicate a reduction of its reversibility after the WBC.

### References

1. Babiichuk VG, Kozlov AV, Lomakin II, Babiichuk GA, inventor; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, assignee. [Cryochamber for experimental cooling of laboratory animals]. Patent of Ukraine № 40168. 25.03.2009. Ukrainian.
2. Garkavi LKh, Kvakina EB, Ukolova MA. [Adaptive reactions and resistance of the organism]. Rostov-on-Don: Rostov University publishing; 1990. 224 p. Russian.
3. Gordiyenko OI, Gordiyenko YuE, Makedonska VO. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution. Bioelectrochemistry. 2004; 62: 119–22.
4. Harvey JW. The Erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical Disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. London: Elsevier; 2008. p. 173–240.
5. 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: 121–5.
6. Lomako VV, Shilo AV, Kovalenko IF, Babiichuk GA. Erythrocytes of hetero- and homoiothermic animals under natural and artificial hypothermia. J Evol Biochem Physiol. 2015; 51(1): 58–66.
7. Lombardi G, Ziemann E, Banfi G. Whole-body cryotherapy in athletes: from therapy to stimulation. An updated review of the literature. Front Physiol. 2017 May 2 [Cited 09.12.2017]; 8: Article 258. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00258/full>.
8. Lugovskaya SA, Kozinets GI. [Hierarchy of hematopoietic cells: kinetics, structure and function]. Klin Lab Diagnostika. 2009; (5): 21–37. Russian.
9. Ryazantseva NV, Novitsky VV, Stepovaya EA, Tkachenko TN. [Ultrastructure of erythrocytes in norm and in pathology: morphological phenomena, clinical aspects]. Morphology. 2004; 126(5): 48–51. Russian.

