

УДК 57.086.13:612.112.014.4.084«46»

В.В. Ломако*, О.В. Шило

Лейкоцитарні показники крові молодих і старих щурів за ініціації десинхронозу на тлі превентивної загальної кріостимуляції

UDC 57.086.13:612.112.014.4.084«46»

V.V. Lomako*, O.V. Shylo

Blood Leukocyte Indices in Young and Aged Rats Under Desynchronization Initiation Against the Background of Preventive Whole-body Cryostimulation

Реферат: Авторами висловлюється припущення, що нівелюванню негативного впливу десинхронозу на організм сприятиме загальна кріостимуляція (ЗКС). Здійснювали ЗКС однократно у криокамері при -120°C за добу до моделювання десинхронозу шляхом зсуву світлового режиму. Ефективність ЗКС визначали за лейкоцитарними показниками крові щурів 6- і 18-місячного віку. Типи лейкоцитів підраховували у мазках крові. За інтегральними лейкоцитарними індексами оцінювали стан імунної системи. За превентивної ЗКС відновлювалася кількість лімфоцитів та еозинофілів і збільшувалася кількість моноцитів у щурів обох вікових груп, а також загальна кількість лейкоцитів у молодих тварин. У тварин обох вікових груп переважали молоді форми нейтрофілів, знижувалася імунореактивність, активувалися ефektorна ланка імунітету та макрофагальна система. У молодих щурів активувалися процеси гіперчутливості уповільненого типу, у старих — негайного типу, знижувалася / збільшувалася реактивна відповідь нейтрофілів відповідно віку тварин.

Ключові слова: лейкоцити крові, інтегральні лейкоцитарні індекси, десинхроноз, загальна кріостимуляція організму, вік, щури.

Abstract: It was speculated that the whole-body cryostimulation (WBC) would adjust the negative effect of desynchronization on the body. One-time WBC was performed in a cryochamber at -120°C a day before the desynchronization simulation, which was initiated by shifting the light regimen. The WBC efficacy was determined by leukocyte parameters of the blood of 6- and 18-month-old rats. Types of leukocytes were counted in blood smears. Integral leukocyte indices were used to assess the immune system state. Preventive application of WBC restored the number of lymphocytes and eosinophils and increased the number of monocytes in rats of both age groups, as well as the total leukocytes count in young animals. In animals of both age groups, young forms of neutrophils predominated, immunoreactivity decreased, the effector link of immunity and the macrophage system were activated. Delayed-type hypersensitivity processes in young rats as well as immediate-type hypersensitivity processes in aged rats were activated, and the reactive response of neutrophils decreased/increased according to the age of the animals.

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

Десинхронози є патогенетичною основою доклінічних порушень здоров'я та інтеграції складних пато- і саногенних змін у біосистемі, що мають причинно-наслідкові зв'язки між собою і зовнішнім середовищем [1, 14]. Різні форми десинхронозу визнаються самостійним фактором прискороного старіння, підвищеного ризику раннього розвитку злоякісних новоутворень, метаболічних порушень і скорочення тривалості життя [13, 14]. і, будучи дезадаптивними за суттю, вимагають своєчасного виявлення і лікування їхніх наслідків. Тому профілактика і рання діагностика десинхронозів може запобігти багатьом серйозним захворюванням.

Desynchronization is the pathogenetic basis of preclinical health disorders and disturbances of integration of complex pathological and sanogenic changes in the biosystem, which have cause-and-effect relationships between themselves and the external environment [1, 14]. Various forms of desynchronization are recognized as an independent factor of accelerated aging, increased risk of malignant neoplasms early development, metabolic disorders and shortening of life expectancy [13, 14], and, being maladaptive in essence, require timely detection and treatment of their consequences. Therefore, prophylaxis and early diagnosis of desynchronization could prevent many serious diseases.

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, 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 10.03.2024

Прийнята до друку 12.09.2024

Received March, 10, 2024

Accepted September, 12, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

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.

Показано, що загальна кріостимуляція (ЗКС) знижує больові відчуття, окиснювальний стрес, пригнічує запальні процеси в тканинах і покращує показники ліпідного обміну, впливає на гормональний фон, знижуючи рівень гормонів стресу. Сеанси ЗКС покращують якість сну і рекомендуються як додаткова процедура при лікуванні тривожно-депресивних розладів, оскільки завдяки ЗКС активується парасимпатична ланка вегетативної нервової системи. Крім того, ЗКС сприяє стимуляції процесів самовідновлення і підвищенню адаптивних можливостей організму [4], а також збільшенню рівня білків *Sirt1* і *Sirt3*, яке пов'язується із подовженням тривалості життя [16].

Стан системи крові та її високоспеціалізованих клітин лейкоцитів, зміни якісно-кількісного співвідношення типів лейкоцитів багато в чому визначають рівень адаптивних реакцій організму і є інформативними діагностично-прогностичними показниками.

Ми припустили, що превентивна ЗКС за температури -120°C дозволить певною мірою захистити організм від негативних проявів десинхронозу. З урахуванням вищевикладеного метою роботи було визначити ефективність превентивної ЗКС за -120°C щодо десинхронозу за зміною лейкоцитарних показників крові молодих і старих щурів.

Матеріали та методи

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 виконані на 6- та 18-місячних самцях білих нелінійних щурів, яких до початку експерименту утримували за умов природного світлового режиму на стандартному раціоні *ad libitum* у віварії. Перед ініціацією десинхронозу щурів переміщували у спеціальну звукопоглинальну камеру за 26°C і утримували в ній протягом місяця при світловому режимі світло:темрява 12:12 годин. Здійснювали ЗКС у кріокамері за -120°C одноразово протягом 90 с за добу до ініціації десинхронозу, який моделювали одноразовим зсувом світлового режиму [15], а саме збільшенням тривалості світлового періоду на 12 годин, тобто світловий період складав 24 години.

Тварин кожного віку розподілили на експериментальні групи (по 5 у кожній): контроль

The whole-body cryostimulation (WBC) is shown to reduce pain and oxidative stress, suppress inflammation in tissues, improve lipid metabolism, and affect the hormonal background by reducing the level of stress hormones. WBC sessions enhance sleep quality and are recommended as an additional procedure in the treatment of anxiety-depressive disorders since the parasympathetic link of the autonomic nervous system is activated as the result of WBC action. In addition, WBC promotes the stimulation of self-healing processes and enhances the body's adaptive capabilities [4], as well as a raise in the level of *Sirt1* and *Sirt3* proteins, which is associated with an increase in life expectancy [16].

The blood system condition and its highly specialized leukocyte cells, as well as changes in the qualitative-quantitative ratio of leukocyte types largely determine the level of the body's adaptive reactions and are informative diagnostic and prognostic indicators.

We assumed that preventive WBC at a temperature of -120°C would protect, to some extent, the body from the negative manifestations of desynchronization. With regard to the above, the aim of the work was to determine the effectiveness of preventive WBC application at -120°C in relation to desynchronization, according to the change in leukocyte blood parameters of young and aged rats.

Material and methods

Experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Protocol № 2 dated 03.03.2015) and agreed with the main provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty (No. 3447-IV of February 21, 2006) and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasburg, 1986).

The research was performed in 6- and 18-month-old males of white outbred rats, which before the experiment were maintained in the animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet *ad libitum*. The WBC was carried out at a temperature of -120°C in an experimental cryochamber designed for the cooling of small laboratory animals [1]. Before the initiation of desynchronization, the rats were maintained in a special sound-absorbing chamber for a month on a 12-hrs light:12-hrs dark cycle (lights on at 09:00), with ambient temperature kept constant at 26°C . WBC was performed in a cryochamber (-120°C , one



(інтактні тварини), тварини з моделлю десинхронозу, тварини з ініційованим десинхронозом після превентивної ЗКС. Забір крові одночасно з фрагментами тканин для біохімічних і морфологічних досліджень проводили після декапітації тварин через 24 години після моделювання десинхронозу.

Підрахунок загальної кількості лейкоцитів (ЗКЛ) здійснювали за допомогою камери Горяєва. Кількісно-якісне співвідношення типів лейкоцитів підраховували у мазках крові, оброблених фіксатором Май-Грюнвальда і забарвлених за Романовським, на підставі чого розраховували інтегральні лейкоцитарні індекси (ЛІ) [3, 8, 9], які визначають зміни окремих ланок імунної системи і у цілому стану організму тварин і людини.

У роботі використано наступні ЛІ:

- індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів ($ICNM = N/M$, за змінами якого можна судити про співвідношення компонентів мікрота макрофагальної системи);

- індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів ($ICLM = L/M$) відображає взаємовідносини афекторної та ефекторної ланок імунологічного процесу;

- індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів ($ICNL = N + C/L$) відображає співвідношення клітин неспецифічного і специфічного захисту;

- лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс ($LGI = 10L/(Mi + Y + P + C + E + B)$) дозволяє диференціювати ауто- та інфекційну інтоксикацію;

- індекс ядерного зсуву ($IYZ = (Mi + Y + P)/C$) показує співвідношення кількості всіх молодих форм нейтрофілів до їхніх зрілих форм;

- індекс алергізації ($IA = L + 1 - (E + 1)/P + C + M$);

- індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів ($ICLE = L/E$) відображає співвідношення процесів гіперчутливості негайного і уповільненого типу;

- індекс зсуву лейкоцитів ($I3L = (E + B + C + P)/L + M$), підвищення якого свідчить про активний запальний процес і порушення імунореактивності;

- лейкоцитарний індекс ($LI = L/N$) відображає взаємовідносини гуморальної і клітинної ланок імунної системи;

- лейкоцитарний індекс інтоксикації Кальф-Каліфа ($LPI = (4Mi + 3Y + 2P + C) \times (PK + 1) / (L + M) \times (E + 1)$) характеризує рівень ендогенної інтоксикації та активізації процесів тканинного розпаду;

90 sec session) a day before the initiation of desynchronization, which was modelled by a single shift of the light mode [15], namely, an increase in the duration of the light period by 12 hrs, *i. e.*, the light period was 24 hrs.

Animals of each age were divided into the following experimental groups (5 in each): control (intact animals), desynchronization animals (animals with modelled desynchronization), desynchronization animals after preventive WBC session. Blood was collected simultaneously with tissue fragments for other studies after decapitation of animals 24 hrs after desynchronization initiation.

The total leukocyte count (TLC) was determined in the Goryaev chamber. The quantitative-qualitative ratio of leukocyte types was calculated in blood smears treated with the May-Grunwald fixative and colored according to Romanowsky, on the basis of which integral leukocyte indices (LI) were calculated [3, 8, 9], determining changes in particular links of the immune system and in the whole state of the animal and human body.

The following LIIs were used in the research:

- index of neutrophils to monocytes ratio ($INMR = N/M$), by the changes of which one can judge the ratio of the components of the micro- and macrophage system;

- index of lymphocytes to monocytes ratio ($ILMR = L/M$) reflects the relationship between the affector and effector links of the immunological process;

- index of neutrophils to lymphocytes ratio ($INLR = N/L$) reflects the ratio of cells of non-specific and specific protection;

- lymphocyte-granulocyte index ($LGI = 10L/(Mi + Yu + PCs + C + E + B)$) allows to differentiate auto- and infectious intoxication;

- nuclear shift index ($NSI = (Mi + Yu + PCS)/C$) reflects the ratio of the number of all young forms of neutrophils to their mature forms;

- indices of allergization ($IA = L + 1 - (E + 1)/Bl + Sls + M$);

- index of lymphocytes to eosinophil ratio ($ILER = L/E$);

- reflects the ratio of immediate and delayed hypersensitivity processes;

- leukocyte shift index ($LSI = (E + BLs + SLs + B)/L + M$);

- the increase of which indicates an active inflammatory process and impaired immunoreactivity;

- leukocyte index ($LI = L/N$);

- reflects the relationship between the humoral and cellular links of the immune system;



- індекс реактивної відповіді нейтрофілів ($IPBH = \frac{P \times C}{(L + M) \times E}$) є показником ендогенної інтоксикації;

- індекс адаптації Гаркаві ($IAГ = L/C$);

- індекс імунореактивності ($IIP = (L + E)/M$).

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

Дані було проаналізовано за допомогою пакету Excel (Microsoft, США) та Social Science Statistics. Розподіл даних за нормальним законом було перевірено за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова. Статистичну обробку результатів проводили методом ANOVA (Excel, США), виражали у вигляді $M \pm SE$. Значущість одержаних результатів оцінювали на рівні не менше 95% ($p < 0,05$).

Результати та обговорення

Аналіз отриманих даних показав, що з віком у щурів розвивався лейкоцитоз, збільшувалася кількість сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів (майже вдвічі) і моноцитів та зменшувалася кількість лімфоцитів (табл. 1). У мазках крові старих щурів виявлялися плазматизація цитоплазми окремих лейкоцитів, поліхроматофільні та юні (мієлоцити) клітини (1:100). Плазматизація цитоплазми спостерігалася у незрілих, нездатних продукувати антитіла лейкоцитів, вихід яких у кровотік свідчить про порушення роботи імунної системи. Поліхроматофілія характерна для незрілих еритроїдних клітин, які передчасно потрапляють у периферичну кров ще до завершення гемоглобінізації. Такі клітини здатні зафарбовуватися як лужними, так і кислими барвниками [6, 12]. Детальніший аналіз вікових змін лейкоцитарних показників крові щурів опублікований нами раніше [8]. Модель десинхронозу, яка використана в наших експериментах, за класифікацією відповідає екзогенному зовнішньому десинхронозу першої стадії тимчасової неузгодженості [9].

Оскільки роботу проводили й на старих тваринах, то додається вплив вікового десинхронозу, який за механізмами розвитку і причинному фактору окремо виділяється у класифікації десинхронозів [1, 14].

Отже, ініціація десинхронозу призводила до лейкоцитозу у молодих (збільшення ЗКЛ майже у 2,5 раза) і легкої лейкопенії (зменшення ЗКЛ у 1,4 раза) у старих щурів (табл. 1). Кількість

- leukocyte index of intoxication by Kalf-Kalif ($LII = \frac{(4MCs + 3MMCs + 2Bls + Sls) \times (PCs + 1)}{(L + M) \times (E + 1)}$);

- characterizes the level of endogenous intoxication and activation of tissue decay processes;

- neutrophil reactive response index ($NRRI = \frac{PCs \times Sls}{(L + M) \times E}$) is an indicator of endogenous intoxication;

- Garkavi adaptation index ($GAI = L/SLs$);

- index of immune reactivity ($IIR = (L + E)/M$).

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

Data were analyzed using Excel (Microsoft, USA) and Social Science Statistics. The normal distribution of the data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical processing of the results was carried out by ANOVA (Excel, USA), expressed as $M \pm SE$. The significance of the results was evaluated at a level of 95% ($p < 0.05$).

Results and discussion

The analysis of the data obtained showed that with age in rats, the leukocytosis developed, the number of segmented neutrophils, eosinophils (almost twice) and monocytes increased, but the one of lymphocytes decreased (Table 1). In the blood smears of aged rats the plasmatisation of the cytoplasm of individual leukocytes, as well as the polychromatophilic and young (myelocytes) cells were detected (1:100). Plasmatisation of the cytoplasm was observed in immature leukocytes, incapable of producing antibodies, the release of which into the blood stream indicates a malfunction of the immune system. Polychromatophilia, as known, is characteristic of immature erythroid cells, which prematurely enter the peripheral blood before the completion of hemoglobinization. Such cells can be stained with both alkaline and acidic dyes [6, 12]. More detailed analysis of age-related changes in blood leukocyte parameters of rats was presented by us earlier [8]. The desynchronosis model used in our experiments is classified as exogenous external desynchronosis of the first stage of temporal incoherence [9].

Since the work was also carried out in aged animals, the influence of age-related desynchronosis is added, which according to the mechanisms of development and the causal factor, is separately allocated in the classification of desynchronoses [1, 14].



Таблиця 1. Зміни співвідношення типів лейкоцитів крові щурів за умов моделювання десинхронозу на тлі ЗКС, $M \pm SE$

Table 1. Changes in the ratio of rat blood leukocytes types under the desynchronization initiation against the background of WBC application, $M \pm SE$

Групи тварин Animal groups	Умови експерименту Experimental conditions		
	Контроль Control	Десинхроноз Desynchronization	Десинхроноз + ЗКС Desynchronization + WBC
Загальна кількість лейкоцитів, $10^9/\text{л}$ Total leucocytes count, $10^9/\text{L}$			
Молоді щури Young rats	$6,5 \pm 0,1$	$15,2 \pm 0,3^*$	$8,0 \pm 1,0$
Старі щури Aged rats	$7,3 \pm 0,3^\#$	$5,7 \pm 0,1^* \#$	$3,7 \pm 0,3^* \#$
Паличкоядерні нейтрофіли, % Band neutrophils, %			
Молоді щури Young rats	$1,9 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,4^*$	$7,8 \pm 0,5^*$
Старі щури Aged rats	$2,5 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,3^* \#$	$7,5 \pm 1,0^*$
Сегментоядерні нейтрофіли, % Segmented neutrophils, %			
Молоді щури Young rats	$27,1 \pm 1,5$	$16,9 \pm 2,2^*$	$20,0 \pm 2,0^*$
Старі щури Aged rats	$32,6 \pm 2,0^\#$	$40,7 \pm 2,3^* \#$	$20,5 \pm 3,7^*$
Еозинофіли, % Eosinophils, %			
Молоді щури Young rats	$3,5 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,2^*$	$2,8 \pm 0,8$
Старі щури Aged rats	$6,9 \pm 0,7^\#$	$5,5 \pm 1,7^\#$	$4,5 \pm 0,6^* \#$
Лімфоцити, % Lymphocytes, %			
Молоді щури Young rats	$65,5 \pm 1,3$	$73,2 \pm 2,2^*$	$65,2 \pm 2,5$
Старі щури Aged rats	$56,2 \pm 4,8^\#$	$46,2 \pm 1,0^* \#$	$62,7 \pm 5,0$
Моноцити, % Monocytes, %			
Молоді щури Young rats	$1,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3^*$
Старі щури Aged rats	$2,4 \pm 0,4^\#$	$2,0 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,6^*$

Примітки: * — відмінності значущі порівняно з контрольними показниками щурів відповідного віку; # — порівняно з молодими щурами, $p < 0,05$

Notes: * — differences are significant compared to the control of corresponding rat age, # — compared to young rats, $p < 0.05$

паличкоядерних нейтрофілів за десинхронозу збільшувалася як у молодих, так і старих щурів у 3,6 і 2,2 раза відповідно, сегментоядерних — зменшувалася у молодих у 1,6 раза та збільшувалася у 1,2 раза у старих; кількість лімфоцитів у молодих тварин збільшувалася, у старих — зменшувалася; кількість еозинофілів у старих не змінювалася, у молодих — зменшувалася, у старих щурів спостерігали тенденцію до змен-

Thus, the initiation of desynchronization led to leukocytosis in young (an increase in TLC by almost 2.5 times) and mild leukopenia (a decrease in TLC by 1.4 times) in aged rats (Table 1). The number of band neutrophils under desynchronization increased by 3.6 and 2.2 times in both young and aged rats, respectively, the number of segmented neutrophils decreased by 1.6 times in young and increased by 1.2 times in aged animals; the



шення моноцитів (табл. 1). Крім того, у мазках крові молодих щурів цієї групи спостерігали плазматизацію цитоплазми (як й у старих інтактних щурів) та амітоз (1–2:100) у частини лейкоцитів, у старих щурів — появу нормобластів (1:100). Амітоз характерний для клітин зі зниженою мітотичною активністю, а також для старіючих, патологічно змінених або тих, що гинуть. Нормобласти у нормі виявлялися тільки у кістковому мозку, тому їхня наявність у периферичній крові є ознакою порушень системи кровотворення [6, 12].

Раніше нами проведено дослідження превентивного (за тиждень) введення кріоконсервованих ядровмісних клітин кордової крові людини для корекції змін лейкоцитарних показників, спричинених ініціацією десинхронозу у молодих і старих щурів. Щодо позитивних впливів було встановлено, що ін'єкції кордової крові перед ініціацією десинхронозу у молодих тварин сприяють зменшенню ЗКЛ порівняно з десинхронозом, коли вона збільшується майже у 2,5 рази, кількість еозинофілів і сегментоядерних нейтрофілів відновлюється до контрольних значень. У старих щурів відновлюються ЗКЛ, кількість еозинофілів і моноцитів до значень молодих тварин [9].

У молодих щурів після моделювання десинхронозу на тлі превентивної кріостимуляції ЗКЛ відповідала контрольному рівню, тобто ЗКС нівелювала викликаний десинхронозом лейкоцитоз. У старих щурів за цих умов спостерігалася ще більш суттєва, ніж за умов десинхронозу, лейкопенія (зменшення ЗКЛ у 2 рази порівняно зі зменшенням у 1,3 раза після десинхронозу). У крові тварин обох вікових груп кількість паличкоядерних нейтрофілів збільшувалася, як і при десинхронозі, у 4,1 та 3 рази відповідно, кількість сегментоядерних клітин, навпаки, зменшувалася у 1,3 та 1,6 рази відповідно порівняно з контрольною групою, а у старих ще й порівняно з десинхронозом (майже вдвічі). Кількість еозинофілів у молодих щурів відповідала контрольному значенню (при десинхронозі вона зменшувалася), у старих — зменшувалася і відповідала значенню молодих інтактних тварин контрольної групи. Кількість моноцитів при цьому збільшувалася у 3,0 та 1,9 рази відповідно, а кількість лімфоцитів відновлювалася до контрольних значень у тварин обох вікових груп. Оскільки у молодих щурів за умов ініціації десинхронозу кількість лімфоцитів значуще збільшувалася, а у старих вона зменшувалася, то можна стверджувати, що ЗКС сприяла нормалізації кількості лімфоцитів у їхній крові (табл. 1).

number of lymphocytes increased in young and decreased in aged rats; the number of eosinophils did not change in the aged rats, but decreased in the young animals; a tendency to a decrease in monocytes in the aged rats was observed (Table 1). In addition, in blood smears of young rats of this group, plasmation of the cytoplasm (as in aged intact rats) and amitosis (1-2:100) in part of leukocytes as well as appearance of normoblasts (1:100) in old rats were observed. Amitosis is characteristic of cells with reduced mitotic activity, as well as aging, pathologically altered or dying. Normoblasts were normally found only in the bone marrow, so their presence in peripheral blood is a sign of disorders of the hematopoietic system [6, 12].

Previously, we have conducted a study of preventive (one week before) administration of cryopreserved human umbilical cord blood nuclear cells to correct changes in leukocyte indices caused by the initiation of desynchronization in young and aged rats. As for the positive effects, it was found that the injection of umbilical cord blood before the desynchronization initiation in young animals contribute not only to a decrease in TLC compared to desynchronization (when it increases almost 2.5 times), but also to the restoration of the number of eosinophils and segmented neutrophils to control values. In aged rats, TLC, the number of eosinophils and monocytes are restored to the values of young animals [9].

In young rats, after desynchronization initiation against the background of preventive cryostimulation, TLC corresponded to the control level, that is, WBC eliminated the leukocytosis caused by desynchronization. On the contrary, in aged rats under these conditions, leukopenia was even more pronounced than under the desynchronization *per se* (a 2-fold decrease in TLC compared to a 1.3-fold decrease under desynchronization). In the blood of animals of both age groups, the number of band neutrophils increased, as in desynchronization, by 4.1 and 3 times, respectively, while the number of segmented cells, on the contrary, decreased by 1.3 and 1.6 times, respectively, compared with the control group, and also to desynchronization (almost twice) in the aged rats. The number of eosinophils corresponded to the control value (but decreased with desynchronization) in young animals, but, as for aged rats, it decreased and corresponded to the value of young animals of the control group. The number of monocytes increased by 3.0 and 1.9 times, respectively, and the number of lymphocytes was restored to control values in animals of both age groups. Since the



У мазках крові щурів обох вікових груп виявляли юні клітини (1:100), а у старих щурів — ще й мієлоцити (1–2:100) та нормобласти (2–3:100). Наявність у крові юних клітин на тлі збільшення кількості паличкоядерних форм нейтрофілів, що характеризує зсув лейкоцитарної формули вліво, може свідчити про розвиток патологічного процесу в організмі та/або активацію гемопоезу [6, 12]. У нормі мієлоцитів (попередники лейкоцитів) у крові не буває, оскільки вони локалізовані у кістковому мозку. Поява їх у крові є ознакою розвитку процесів запалення, а також зсуву кислотно-лужного балансу. Крім того, поява мієлоцитів у крові може бути й наслідком інтенсивних фізичних навантажень, що спостерігалось і під впливом ЗКС. Зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів (спостерігалось у молодих щурів із десинхронозом та у обох вікових групах після його ініціації на тлі ЗКС) може визначатися як перерозподільними нейтропеніями, так і вказувати на розвиток патологічних змін в організмі [2, 6]. Зменшення кількості еозинофілів, що спостерігалось у крові молодих щурів із десинхронозом та у старих щурів за умов ініціації десинхронозу на тлі ЗКС (табл. 1), може свідчити про зниження стійкості організму до дії екзо- і ендогенних факторів та фізичне перенапруження. Але й може мати такі фізіологічні причини, як фізичне навантаження, стрес тощо, і в цьому випадку кількість еозинофілів у крові нормалізується самостійно протягом деякого часу [4, 5, 11].

Відомо, що моноцити беруть участь у регуляції багатьох процесів: формування «імуної» пам'яті і специфічного імунітету; знищення загиблих клітин у ділянках запалення, чим сприяють регенерації тканин у місці пошкодження; моноцити також здійснюють протипухлинний ефект, вироблення інтерферону тощо [2, 12]. Збільшення кількості моноцитів у крові, яке відбувалося після превентивного застосування ЗКС у щурів обох вікових груп із ініціацією десинхронозу і порівняно з контролем на вплив десинхронозу, може обумовлюватися активацією механізмів, які протидіють розвитку патологічних процесів та/або змінам, супутнім фізіологічному старінню.

Отже, превентивна ЗКС приводила до відновлення кількості лімфоцитів та еозинофілів, збільшення кількості моноцитів у крові щурів обох вікових груп, а також ЗКЛ у молодих тварин. Крім того, поява у мазках крові молодих форм клітин свідчить про активацію процесів гемопоезу. Такі зміни можуть вказувати на певний позитивний ефект превентивної ЗКС.

number of lymphocytes significantly increased in young rats under the desynchronosis initiation and decreased in aged animals, it can be argued that WBC contributed to the normalization of the number of lymphocytes in their blood (Table 1).

Young cells (1:100) were detected in blood smears of rats of both age groups, as well as myelocytes (1–2:100) and normoblasts (2–3:100) were also detected in aged rats. The presence of young cells against the background of an increase in the number of band neutrophils in the blood, which characterizes the shift of the leukocyte formula to the left, may indicate the development of a pathological process in the body and/or activation of hematopoiesis [6, 12]. Myelocytes (precursors of leukocytes) are not normally present in peripheral blood, as they are localized in the bone marrow. Their appearance in the blood is a sign of the development of inflammation, as well as a shift in the acid-alkaline balance. In addition, the appearance of myelocytes in the blood can also be a consequence of intense physical loads, which was also observed under the influence of the WBC. Decrease in the number of segmented neutrophils (observed in young rats with desynchronosis and in both age groups with its initiation against the background of WBC application) can be determined not only as redistributive neutropenia but also indicate the development of pathological changes in the body [2, 6]. The decrease in the number of eosinophils observed in the blood of young rats with desynchronosis and in aged rats under the initiation of desynchronosis against the background of WBC application (Table 1) may indicate a decrease in the body's resistance to the action of exo- and endogenous factors and physical overexertion. But it can also have physiological origins, such as physical loads, stress, etc., and in these cases, the number of eosinophils in the blood normalizes on its own over time [4, 5, 11].

Monocytes are known to be involved in the regulation of many processes: the formation of immunological memory and specific immunity; destruction of dead cells in the areas of inflammation, which contributes to the regeneration of tissues at the site of injury; they also have an antitumor effect, produce a large amount of interferon, *etc.* [2, 12]. The increased number of monocytes in the blood, which occurred after the preventive application of WBC in rats of both age groups with the desynchronosis (in comparison to the effect of desynchronosis), may be due to the activation of mechanisms that counteract the development of pathological pro-



Зміни ІЛІ у старих щурів порівняно з молодими (табл. 2) свідчать про активацію ефекторної ланки імунітету, процесів гіперчутливості, переважання клітин неспецифічного захисту (нейтрофілів) та їхніх незрілих форм, знижен-

cesses and/or changes accompanying physiological aging.

Thus, preventive WBC led to the restoration of the number of lymphocytes and eosinophils, an increased number of monocytes in the blood

Таблиця 2. Інтегральні лейкоцитарні індекси у щурів за умов ініціації десинхронозу на тлі ЗКС, $M \pm SE$
Table 2. Integral leukocyte indices in rats under desynchronosis against the background of WBC application, $M \pm SE$

Групи тварин Group of animals	Умови експерименту Experimental conditions		
	Контроль Control	Десинхроноз Desynchronosis	Десинхроноз + ЗКС Dsynchronosis + WBC
Індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів Index of neutrophil to monocyte ratio			
Молоді щури Young animals	23,6 ± 2,4	15,7 ± 1,4*	7,4 ± 0,6*
Старі щури Aged animals	20,6 ± 5,7	20,6 ± 5,7	6,2 ± 0,3*
Індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів Index of lymphocyte to monocyte ratio			
Молоді щури Young animals	54,2 ± 1,9	59,1 ± 6,5	17,7 ± 1,9*
Старі щури Aged animals	28,5 ± 5,5 [#]	27,3 ± 7,4 [#]	15,4 ± 3,4*
Індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів Index of neutrophil to lymphocyte ratio			
Молоді щури Young animals	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Старі щури	0,7 ± 0,1 [#]	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс Lymphocyte-granulocyte index			
Молоді щури Young animals	20,1 ± 1,3	30,9 ± 3,6*	22,2 ± 2,6
Старі щури Aged animals	16,4 ± 3,7	8,9 ± 0,3* [#]	20,8 ± 4,3
Індекс алергізації Index of allergization			
Молоді щури Young animals	3,9 ± 0,4	4,1 ± 0,4	3,4 ± 0,3
Старі щури Aged animals	4,4 ± 1,0	2,4 ± 0,5* [#]	3,9 ± 0,7
Індекс ядерного зсуву Nuclear shift index			
Молоді щури Young animals	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
Старі щури Aged animals	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0 [#]	0,6 ± 0,1*
Індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів Index of lymphocyte to eosinophil ratio			
Молоді щури Young animals	17,8 ± 2,9	55,5 ± 7,7*	36,1 ± 10,4*
Старі щури Aged animals	9,2 ± 1,2 [#]	12,2 ± 4,2 [#]	15,1 ± 2,9* [#]
Індекс зсуву лейкоцитів Leukocyte shift index			
Молоді щури Young animals	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Старі щури Aged animals	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,0 [#]	0,5 ± 0,1*

Продовження Таблиці 2 на сторінці 209 /



Групи тварин Group of animals	Умови експерименту Experimental conditions		
	Контроль Control	Десинхроноз Desynchronization	Десинхроноз + ЗКС Desynchronization + WBC
Індекс адаптації Гаркаві Garkavi adaptation index			
Молоді щури Young animals	2,6 ± 0,2	5,0 ± 0,8*	3,5 ± 0,6
Старі щури Aged animals	2,4 ± 0,7	1,2 ± 0,1* #	3,4 ± 1,5
Лейкоцитарний індекс Leukocyte index			
Молоді щури Young animals	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4*	2,4 ± 0,3
Старі щури Aged animals	2,4 ± 0,6	1,0 ± 0,1* #	2,4 ± 0,5
Лейкоцитарний індекс інтоксикації Кальф-Каліфа Leukocyte index of intoxication by Kalf-Kaliph			
Молоді щури Young animals	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Старі щури Aged animals	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
Індекс імунореактивності Index of immune reactivity			
Молоді щури Young animals	59,5 ± 5,8	59,0 ± 6,3	21,2 ± 3,1*
Старі щури Aged animals	31,9 ± 5,6#	31,1 ± 9,2#	16,4 ± 3,6*
Індекс реактивної відповіді нейтрофілів Neutrophil reactive response index			
Молоді щури Young animals	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2*	1,1 ± 0,3*
Старі щури Aged animals	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,9*

Примітки: * — відмінності значущі порівняно з контрольними показниками щурів відповідного віку; # — порівняно з молодими щурами, $p < 0,05$

Notes: * – differences are significant compared to the control of corresponding age, # – compared to young animals, $p < 0.05$

ня імунореактивності та активацію запального процесу. Детальніший аналіз вікових змін ІЛІ щурів наданий в нашій попередній публікації [8].

За десинхронозу у молодих щурів спостерігали переважання у крові молодих форм клітин і компонентів макрофагальної системи, активацію гуморальної ланки імунної системи, ауто- та ендогенну інтоксикацію, прискорення процесів гіперчутливості негайного типу, підвищення індексу адаптації Гаркаві. У старих тварин, на відміну від молодих, відзначали інфекційну інтоксикацію, переважання клітинної ланки імунітету, зниження алергізації і адаптації організму (табл. 2).

Слід зазначити, що у молодих тварин цієї групи індекс адаптації Гаркаві та індекс ядерного зсуву збільшувалися, а індекс зсуву лейкоцитів мав тенденцію до зниження. Оскільки підвищення індексу зсуву лейкоцитів свідчить

of rats of both age groups, as well as TLC in young animals. In addition, the appearance of young forms of cells in blood smears indicates the activation of hematopoietic processes. Such changes may indicate a certain positive effect of preventive WBC application.

Changes in the ILIs in aged rats compared to young rats (Table 2) indicate activation of the effector link of immunity and hypersensitivity processes, predominance of non-specific defence cells (neutrophils) and their immature forms, as well as decrease in immune reactivity and activation of the inflammation. More detailed analysis of age-related changes in ILIs of rats is provided in our previous report [8].

Under desynchronization in young rats, there is a predominance of young forms of cells and components of the macrophage system in the blood, activation of the humoral link of the im-



про активацію запалення і порушення імунореактивності, тобто функціональної активності чинників і механізмів неспецифічного та імунного специфічного захисту, а збільшення індексу ядерного зсуву — про стимуляцію лейкопоетичної функції кісткового мозку, то складається враження, що певні ланки імунної системи виявилися стійкими до розвитку десинхронозу у молодих тварин.

Превентивна ЗКС призводила у тварин обох вікових груп до переважання у крові молодих форм нейтрофілів, зниження імунореактивності, активації ефektorної ланки імунологічного процесу та макрофагальної системи. Слід зазначити, що за ініціації десинхронозу на тлі ін'єкції кордової крові людини у тварин обох вікових груп знижується індекс алергізації, у 6-місячних — збільшується кількість молодих форм нейтрофілів у крові, що свідчить про стимуляцію лейкопоезу. У старих щурів за цих умов активується макрофагальна система [9].

Макрофаги беруть участь як в активному фагоцитозі, так й імунологічному розпізнаванні та представленні антигенів Т-лімфоцитам. Крім того, у молодих щурів відбувалася активація процесів гіперчутливості уповільненого, а у старих — негайного типу та зниження/підвищення реактивної відповіді нейтрофілів відповідно віку (табл. 2). У старих щурів також знижувався індекс зсуву лейкоцитів, що, як відзначали вище, є позитивним.

Особливості відповіді лейкоцитарної ланки крові молодих і старих щурів на окремий вплив ЗКС у криокамері за -120°C описані нами раніше [10].

Отже, аналіз отриманих результатів дозволив визначити за зміною лейкоцитарних показників крові у молодих і старих щурів певні ознаки позитивного впливу превентивної ЗКС при розвитку десинхронозу. У подальшому планується вивчення превентивного комбінованого впливу ЗКС і ін'єкції кордової крові на організм щурів різного віку за ініціації десинхронозу.

Висновки

1. Ініціація десинхронозу на тлі превентивної одноразової ЗКС за температури -120°C сприяє відновленню ЗКЛ у молодих тварин, а також відновленню кількості лімфоцитів та еозинофілів, збільшенню кількості моноцитів у крові щурів обох вікових груп.

2. Зміни ІЛІ показали, що превентивна ЗКС у тварин обох вікових груп приводить до переважання у крові молодих форм нейтрофілів, зниження імунореактивності, активації ефек-

tory system, auto- and endogenous intoxication, acceleration of immediate-type hypersensitivity processes, and an increase in the Garkavi adaptation index. In aged animals, in contrast to young animals, infectious intoxication, predominance of the cellular link of immunity, reduction of allergy and adaptation of the body were noted (Table 2).

It should be noted that in young animals under dsynchronosis, the Garkavi adaptation index and the nuclear shift index increased, while the leukocyte shift index tended to decrease. Since an increase in the leukocyte shift index indicates the activation of inflammation and impaired immune reactivity, namely, the functional activity of factors and mechanisms of non-specific and immune specific protection, and an increase in the nuclear shift index indicates stimulation of the leukopoietic function of the bone marrow, it seems that certain links of the immune system were resistant to the desynchronosis development in young animals.

In animals of both age groups, preventive WBC led to the predominance of young forms of neutrophils in the blood, a decrease in immunoreactivity, activation of the effector link of the immunological process and the macrophage system. It should be noted that when desynchronosis is initiated against the background of the injection of human umbilical cord blood, the allergy index decreases in animals of both age groups, and in 6-month-old animals, the number of young forms of neutrophils in the blood increases, which indicates stimulation of leukopoiesis. In aged rats, under these conditions, the macrophage system is activated [9].

Macrophages participate in active phagocytosis and immunological recognition as well as the presentation of antigens to T-lymphocytes. In addition, the processes of delayed and immediate hypersensitivity were activated in young and aged rats, respectively, as well as a decrease/increase in the reactive response of neutrophils, according to age were found (Table 2). The leukocyte shift index also decreased in aged rats, which, as noted above, is positive.

Features of the response of the blood leukocyte of young and aged rats to an effect of the WBC in a cryochamber at -120°C have been studied previously [10].

In conclusion, the analysis of the results obtained made it possible to determine certain signs of a positive effect of the prophylactic WBC application in the development of desynchronosis by changing blood leukocyte indices in young and aged rats. Future research will be aimed at clarifying



торної ланки імунологічного процесу та макрофагальної системи. У молодих щурів відзначається переважання процесів гіперчутливості уповільненого, а у старих — негайного типу, а також зниження або підвищення реактивної відповіді нейтрофілів відповідно віку.

Автори висловлюють подяку лікарю вищої категорії Л.М. Піроженко за консультативну і методичну допомогу.

Робота виконана в рамках НДР за темою №103, шифр 2.2.6.103, № державної реєстрації 0116U003493 (2016–2020 рр.).

Література

1. Bazhanova ED. Desynchronization: types, main mechanisms, role in the pathogenesis of epilepsy and other diseases: a literature review. *Life (Basel)*. [Internet]. 2022 Aug 11 [cited 15 Dec 2023]. 12(8): 1218. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/8/1218>
2. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008; 112(4): 935–45.
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. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(5): 709–50.
5. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of eosinophils to human health and disease. *Annu Rev Pathol*. 2020; 15: 179–209.
6. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(3): 159–75.
7. Legrand FD, Dugué B, Costello J, et al. Evaluating safety risks of whole-body cryotherapy/cryostimulation (WBC): a scoping review from an international consortium. *Eur J Med Res*. [Internet]. 2023 Sept 28 [cited 15 Dec 2023]. 28(1): 387. Available from: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-023-01385-z>
8. Lomako VV. Blood leukocyte indices in male rats of different ages. *Advances in Gerontology*. 2020; 10(2): 135–141.
9. Lomako VV. Blood leukocytes in rats of different ages under desynchronization initiation against the background of cryopreserved cord blood injection. *Fiziol Zh*. 2023; 69(5): 66–74.
10. Lomako VV, Pirozhenko LM. Blood leukocytes in young and aged rats after whole body cryostimulation (–120°C). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021; 31(1): 23–37.
11. Long H, Liao W, Wang L, Lu Q. A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43(2): 96–108.
12. Omman RA, Kini AR. Leukocyte. Development, kinetics, and functions Chapter 9. In: Keohane EM, Walluga JM, Otto CN. *Rodax's hematology. Clinical principles and applications*. 6th ed. Elsevier; 2020. p 117–35.
13. Park N, Cheon S, Son GH, et al. Chronic circadian disturbance by a shortened light-dark cycle increases mortality.

the effect of the preventive combined action of the WBC and umbilical cord blood injection on desynchronization initiation in rats of various ages.

Conclusions

1. The initiation of desynchronization after a single preventive WBC at a temperature of –120°C contributes to the restoration of TLC level in young animals, as well as promotes the restoration in the number of lymphocytes and eosinophils, as well as increases the one of monocytes in the blood of rats of both age groups.

2. The changes in the ILIs indicated that preventive WBC application in animals of both age groups leads to a predominance of young forms of neutrophils in the blood, a decrease in immunoreactivity, and activation of the effector link of the immunological process as well as the macrophage system. There is a predominance of delayed hypersensitivity processes in young rats and immediate type in aged rats, as well as a decrease or increase in the reactive response of neutrophils according to age.

We would like to acknowledge doctor of the highest qualification category Lydmila M. Pirozhenko for her advisory and methodological assistance.

The work was carried out within the framework of the NDR No. 103, code 2.2.6.103, state registration number 0116U003493 (2016–2020).

References

1. Bazhanova ED. Desynchronization: types, main mechanisms, role in the pathogenesis of epilepsy and other diseases: a literature review. *Life (Basel)*. [Internet]. 2022 Aug 11 [cited 15 Dec 2023]. 12(8): 1218. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/8/1218>
2. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008; 112(4): 935–45.
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. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(5): 709–50.
5. Klion AD, Ackerman SJ, Bochner BS. Contributions of eosinophils to human health and disease. *Annu Rev Pathol*. 2020; 15: 179–209.
6. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(3): 159–75.
7. Legrand FD, Dugué B, Costello J, et al. Evaluating safety risks of whole-body cryotherapy/cryostimulation (WBC): a



- Neurobiol Aging. [Internet]. 2012 Jun [cited 15 Dec 2023]. 33(6): 1122.e11-1122.e22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458011004763>
14. Steele TA, St Louis EK, Videnovic A, Auger RR. Circadian rhythm sleep-wake disorders: a contemporary review of neurobiology, treatment, and dysregulation in neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics*. 2021; 18(1): 53–74.
 15. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. *Indust Health*. 1995; 33(2): 57–66.
 16. Wojciak G, Szymura J, Szygula Z, et al. The effect of repeated whole-body cryotherapy on *Sirt1* and *Sirt3* concentrations and oxidative status in older and young men performing different levels of physical activity. *Antioxidants (Basel)*. [Internet]. 2020 Dec 31 [cited 15 Dec 2023]. 10(1): 37. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/1/37>
 8. Lomako VV. Blood leukocyte indices in male rats of different ages. *Advances in Gerontology*. 2020; 10(2): 135–141.
 9. Lomako VV. Blood leukocytes in rats of different ages under desynchronization initiation against the background of cryopreserved cord blood injection. *Fiziol Zh*. 2023; 69(5): 66–74.
 10. Lomako VV, Pirozhenko LM. Blood leukocytes in young and aged rats after whole body cryostimulation (–120°C). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021; 31(1): 23–37.
 11. Long H, Liao W, Wang L, Lu Q. A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43(2): 96–108.
 12. Omman RA, Kini AR. Leukocyte. Development, kinetics, and functions Chapter 9. In: Keohane EM, Walluga JM, Otto CN. *Rodax's hematology. Clinical principles and applicatios*. 6th ed. Elsevier; 2020. p 117–35.
 13. Park N, Cheon S, Son GH, et al. Chronic circadian disturbance by a shortened light-dark cycle increases mortality. *Neurobiol Aging*. [Internet]. 2012 Jun [cited 15 Dec 2023]. 33(6): 1122.e11-1122.e22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0197458011004763>
 14. Steele TA, St Louis EK, Videnovic A, Auger RR. Circadian rhythm sleep-wake disorders: a contemporary review of neurobiology, treatment, and dysregulation in neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics*. 2021; 18(1): 53–74.
 15. Sudo A, Miki K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. *Indust Health*. 1995; 33(2): 57–66.
 16. Wojciak G, Szymura J, Szygula Z, et al. The effect of repeated whole-body cryotherapy on *Sirt1* and *Sirt3* concentrations and oxidative status in older and young men performing different levels of physical activity. *Antioxidants (Basel)*. [Internet]. 2020 Dec 31 [cited 15 Dec 2023]. 10(1): 37. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/1/37>

