

Wpływ krótkotrwałej kriostymulacji ogólnoustrojowej na zmiany limfocytarne u osób zdrowych oznaczane metodą cytometrii przepływowej

The impact of the short-term systemic cryotherapy on lymphocyte subsets in healthy individuals measured with flow cytometry

Robert Szafkowski¹, Sylwia Oczachowska-Szafkowska², Irena Ponikowska¹,
Magdalena Sobieska³

¹Katedra i Zakład Balneologii i Medycyny Fizykalnej CM UMK w Ciechocinku

²Wyższa Szkoła Gospodarki w Bydgoszczy

³Zakład Fizjoterapii i Reumatologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

STRESZCZENIE

WSTĘP: Krioterapia ogólnoustrojowa jest uznaną metodą stosowaną w fizykoterapii. Z każdym rokiem zwiększa się jej dostępność w Polsce i pojawiają się kolejne wskazania do jej stosowania. W wielu badaniach obserwowano korzystny wpływ zabiegu na proces zapalny u pacjentów z chorobami reumatycznymi. Jednak nadal pewną niewiadomą stanowią mechanizmy powyższych zmian. Istotne znaczenie w przebiegu reakcji zapalnych odgrywają limfocyty i ich subpopulacje. Dlatego interesującym wydaje się ocena wpływu zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej na te komórki układu immunologicznego oraz czy zabieg krioterapii ogólnoustrojowej wywoła u osoby zdrowej, u której nie obserwujemy przewlekłego procesu zapalnego istotne zmiany w zakresie subpopulacji limfocytarnych.

CEL: Ocena czy poddawanie osób zdrowych jednorazowej stymulacji w komorze kriogenicznej spowoduje ilościowe i odsetkowe zmiany subpopulacji limfocytów. Jeśli tak, to w jakim kierunku zachodzą zmiany.

MATERIAŁ I METODY: W badaniu uczestniczyło 15 zdrowych ochotników (10 kobiet i 5 mężczyzn). Średnia wieku dla grupy wyniosła 44,4 ± 9,13 lat, masa ciała 66 ± 12,7 kg, wzrost 169 ± 11,71 cm, BMI 24 ± 3,97 kg/m². Uczestnicy badania poddawani byli jednorazowej ekspozycji na temperatury kriogeniczne w komorze. Czas ekspozycji wynosił 3 minuty. W komorze panowała temperatura -140°C. Bezpośrednio przed oraz po wyjściu z komory pobierano krew z której oznaczono subpopulacje limfocytów metodą cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych firmy Becton-Dickson i cytometru firmy Ortho Diagnostics. Oznaczano subpopulacje następujących limfocytów: limfocyty T (CD3+), limfocyty T pomocnicze (CD3+CD4+), limfocyty T cytotoksyczne (CD3+CD8+), limfocyty B (CD19+), komórki NK (CD3- CD16+).

WYNIKI: Pod wpływem zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej obserwowano istotne obniżenie ogólnej liczby limfocytów i ich subpopulacji limfocytów T (CD3+), limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+), oraz zmniejszenie liczby limfocytów B (CD19+). Wartości procentowe mierzonych subpopulacji limfocytów nie uległy istotnym zmianom pod wpływem zabiegu.

WNIOSKI: Uzyskane wyniki potwierdzają, że krioterapia ogólnoustrojowa jest silnym czynnikiem stymulującym układ immunologiczny, co przekłada się na zmiany w ilości limfocytów i ich subpopulacji. Zmiany obserwowane są u osób zdrowych już po jednym zabiegu.

Słowa kluczowe: krioterapia ogólnoustrojowa, subpopulacje limfocytarne, cytometria przepływowa

SUMMARY

Background: Systemic cryotherapy is a well-known method used in physical therapy. Every year we observe new indications of use and the increase of its availability in Poland. In several studies we have observed a beneficial effect of this treatment on the inflammatory process in patients with rheumatic diseases. However, the precise mechanisms of these changes are still unknown. Lymphocytes and lymphocyte subsets play the key role in inflammatory reactions.

Therefore, it seems to be interesting to observe the impact of a systemic cryotherapy on the immune system cells. It seems to be interesting to assess whether systemic cryotherapy treatment will make any changes in lymphocyte subsets in healthy individuals without any active inflammatory process.

AIM: The assessment of the impact of the systemic cryotherapy on lymphocyte subsets in healthy individuals and the direction of possible changes.

MATERIAL AND METHODS: The study group consisted of 15 healthy volunteers (10 women and 5 men) with the average age of $44.4 \pm 9,13$ years, the weight of $66 \pm 12,7$ kg, the height of $169 \pm 11,71$ cm, BMI $24 \pm 3,97$ kg/m². The participants were subjected to a single exposure to cryogenic temperatures in the chamber. The exposure time was 3 minutes and the temperature in the chamber -140°C . Blood tests were done immediately before going in and after leaving the chamber. Lymphocytes research was done using flow cytometry with monoclonal antibodies from Becton-Dickenson and a flow cytometer from Ortho Diagnostic company. The following subsets were examined: lymphocytes T cells (CD3+), lymphocytes T helper (CD3+ CD4+), lymphocytes T cytotoxic (CD8+ CD3+), lymphocytes B cells (CD19+), natural killer cells (CD3-CD16+).

RESULTS: Under the influence of systemic cryotherapy treatment, significant reductions in the total number of lymphocytes and their subpopulations were observed: lymphocytes T cells (CD3+), lymphocytes T helper (CD3+ CD4+), lymphocytes T cytotoxic (CD8+ CD3+), as well as a decrease of lymphocytes B cells (CD19+). There were no relevant changes in the percentage value.

CONCLUSIONS: Based on the obtained results, it might be concluded that the systemic cryotherapy is a strong factor stimulating immune system, which causes significant changes in the lymphocyte subsets of peripheral blood. These changes were observed in healthy individuals after one treatment in cryogenic chamber.

Key words: whole body cryotherapy, lymphocyte subsets, flow cytometry

Acta Balneol., TOM LVI, Nr 4 (138)/2014, s. 214-219

WSTĘP

Krioterapia ogólnoustrojowa jest uznaną metodą stosowaną w fizykoterapii. Metodę tę jako pierwszy do praktyki lekarskiej wprowadził Japończyk prof. Toshiro Yamauch (1), który w 1978 zastosował komorę kriogeniczną w leczeniu. W Polsce pierwsza kriokomora powstała w 1989 roku we Wrocławiu. Z każdym rokiem zwiększa się dostępność tej metody i pojawiają kolejne wskazania do jej stosowania. Polska stała się liderem europejskim w krioterapii ogólnoustrojowej. Tak dynamiczny rozwój metoda zawdzięcza korzyściom wynikającym z jej stosowania. Krótkotrwałe działanie temperatur kriogenicznych na ludzki organizm inicjuje wiele korzystnych efektów fizjologicznych przekładających się na zmniejszenie dolegliwości bólowych, ograniczenie obrzęków i procesów zapalnych, stymulację układu krążenia, dokrewnego i immunologicznego [2, 3, 4, 5] Szczególnie interesujący wydaje się być wpływ zabiegów kriogenicznych na proces zapalny. Obserwowany w badaniach efekt przeciwzapalny może być wynikiem zmian w wydzielaniu mediatorów zapalenia, jak również zmian w obrębie komórek układu immunologicznego. W prowadzonych badaniach zarówno u chorych, jak i zdrowych osób obserwowano znamienne obniżenie wartości odczynu Biernackiego, stężenia markerów stanu zapalnego jak: CRP, mukoproteina, fibrynogen, s-ICAM. Ponadto obserwowano zmniejszenie stężenia immunoglobulin klasy IgG i IgA [6, 7, 8]. Obniżały się również stężenia interleukin prozapalnych IL-2 i IL8, a poziom IL-10 o właściwościach przeciwzapalnych się podnosił [6, 7, 9, 10]. Na przebieg zapalenia może mieć wpływ hamowanie uwalniania enzymów lizoso-

malnych w wyniku stabilizacji błon lizosomalnych, które to zjawisko obserwowano po zabiegach krioterapii ogólnoustrojowej [11, 12]. Szczególne znaczenie w przebiegu procesów zapalnych odgrywają komórki układu immunologicznego, a zwłaszcza limfocyty i ich subpopulacje. Współczesna diagnostyka pozwala na precyzyjną ocenę ilości limfocytów i ich poszczególnych subpopulacji za pomocą cytometrii przepływowej. Jest to metoda polegająca na precyzyjnej ocenie ilości komórek znakowanych przeciwciałami monoklonalnymi. W prowadzonych dotychczas badaniach obserwowano korzystne zmiany w ilości i odsetku subpopulacji limfocytarnych u pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów poddanych zabiegom kriogenicznym [13, 14]. Interesującym wydaje się ocena, czy zabieg krioterapii ogólnoustrojowej wywoła u osoby zdrowej, u której nie obserwujemy przewlekłego procesu zapalnego istotne zmiany w zakresie subpopulacji limfocytarnych.

CEL

Ocena czy poddawanie osób zdrowych jednorazowej stymulacji w komorze kriogenicznej spowoduje ilościowe i odsetkowe zmiany subpopulacji limfocytów. Jeśli tak, to w jakim kierunku zachodzą zmiany.

MATERIAŁ

Materiał badawczy stanowiło 15 zdrowych osób, które dobrowolnie zgodziły się na poddanie się zabiegowi krioterapii ogólnoustrojowej oraz pobranie krwi. W badanej grupie większość tj. 10 osób stanowiły kobiety, mężczyzn było 5.

Średnia wieku dla tej grupy wynosiła $44,4 \pm 9,13$ lat. Wzrost w grupie $169,0 \pm 11,71$ cm. Masa ciała 66 ± 12 kg, wskaźnik BMI $24 \pm 3,97$ kg/m².

METODY

Uczestnicy badania poddawani byli jednorazowej ekspozycji na temperatury kriogeniczne w komorze. Była to komora o konstrukcji wykorzystującej zjawisko zalegania chłodu z bezpośrednim wtryskiem pary zimnego powietrza o temp -170°C . Zabieg wykonywano w przeciętnej temperaturze -120°C , podczas zabiegu prowadzono stały nadzór temperatury w komorze. Czas zabiegu wynosił 3 min. Każdy z uczestników był poddawany badaniu lekarskiemu przed zabiegiem. Przed wejściem do komory oraz 20 min po zabiegu pobierano próbki krwi z żyły łokciowej przeznaczone do badań cytometrycznych. Oznaczenia cytometryczne dokonywane były ze świeżej krwi w Katedrze Biologii i Ochrony Środowiska UM w Poznaniu. Subpopulacje limfocytarne oznaczano metodą cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych firmy Becton-Dickinson i cytofluorometru firmy Ortho Diagnostics Systems. Oceniano następujące parametry cytometryczne: ilość oraz odsetek limfocytów, limfocytów T (CD3+), limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+), limfocytów T cytotoksycznych (CD3+CD8+), komórek NK (CD3-CD16+), limfocytów B (CD3-CD19+), oraz stosunek CD4+/CD8+.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, normalność rozkładu badanych cech sprawdzano testem Kolmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforca'a. W wypadku rozkładów normalnych, po sprawdzeniu jednorodności wariancji hipotezy statystyczne weryfikowano stosując test t-Studenta dla zmiennych powiązanych. W przypadku cech o rozkładzie odbiegającym od normalnego stosowano testy nieparametryczne Wilcoxon. Za poziom istotności dla odrzucenia hipotezy zerowej przyjęto prawdopodobieństwo błędu pierwszego rodzaju $p < 0,05$. Na badanie uzyskano zgodę komisji bioetycznej AM w Bydgoszczy.

WYNIKI

Wyniki badań ilości i odsetka limfocytów i ich subpopulacji za pomocą cytometru przepływowego przed i po jednorazowym zabiegu w komorze kriogenicznej przedstawiono w tabeli 1. Kolorem zaznaczono parametry, które pod wpływem zabiegu zmieniały się w sposób istotny.

Pod wpływem zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej u zdrowych ochotników obserwowano istotne zmniejszenie ogólnej liczby limfocytów (ryc.1) z ilości $1317,00 \pm 422,85$ na $1181,87 \pm 476,08$ ($p < 0,02$).

Zmniejszeniu ogólnej liczby limfocytów towarzyszyło statystycznie istotne zmniejszenie ich populacji limfocytów T (CD3+) z wartości $1109,93 \pm 362,31$ na $1000,13 \pm 392,67$ ($p < 0,02$) (ryc.2), limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+) z ilości $675,33 \pm 252,35$ na $636,07 \pm 298,76$ ($p < 0,0004$) (ryc. 3) i limfocytów B (CD3-CD19+) z wartości $121,13 \pm 51,88$ na $101,20 \pm 57,08$ ($p < 0,03$) (ryc. 4). Pozostałe mierzone subpopulacje limfocytów nie różniły się istotnie po zastosowanym zabiegu kriogenicznym.

Zmianom w zakresie liczby limfocytów i ich subpopulacji nie towarzyszyły istotne zmiany w zakresie ich odsetka mierzonych subpopulacji limfocytów.

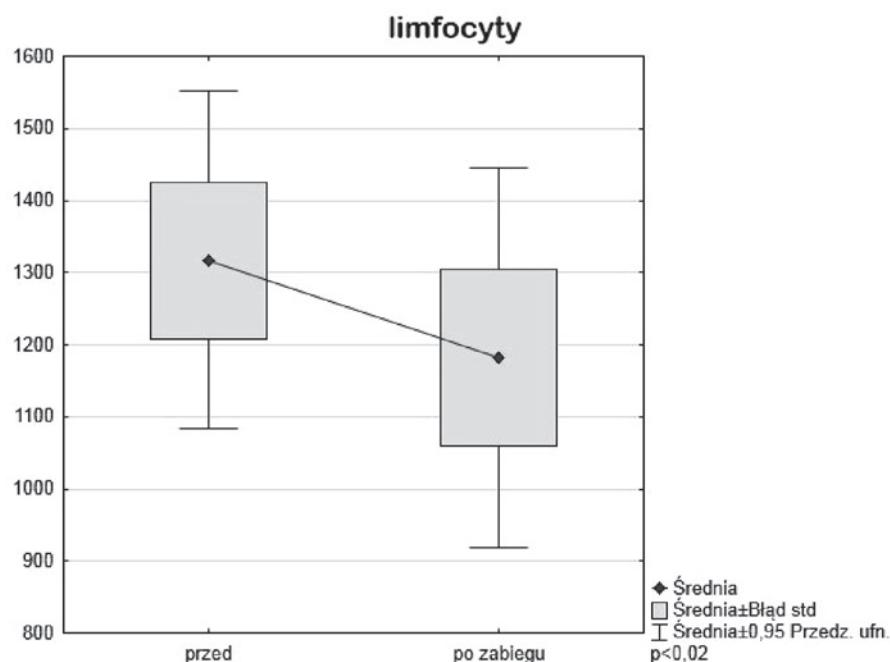
DYSKUSJA

Proces zapalny stanowi wypadkową wielu czynników. Wśród nich istotną rolę odgrywają cytokiny i ich wzajemne oddziaływanie. Zaburzenia o podłożu immunologicznym są prawdopodobnie wynikiem zaburzeń funkcjonowania sieci cytokin i dysproporcji między aktywacją różnych subpopulacji limfocytów. Dlatego zmiany w ilościowym i jakościowym składzie subpopulacji limfocytarnych mogą mieć istotne znaczenie w patomechanizmie wielu schorzeń o podłożu zapalnym. Od kilkunastu lat rozwój technik cytometrycznych pozwolił na dokonywanie precyzyjnych pomiarów ilości tych komórek. Dokonując ocen obrazu subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej należy pamiętać iż jest on opisem zaledwie 2% limfocytów całego organizmu, dlate-

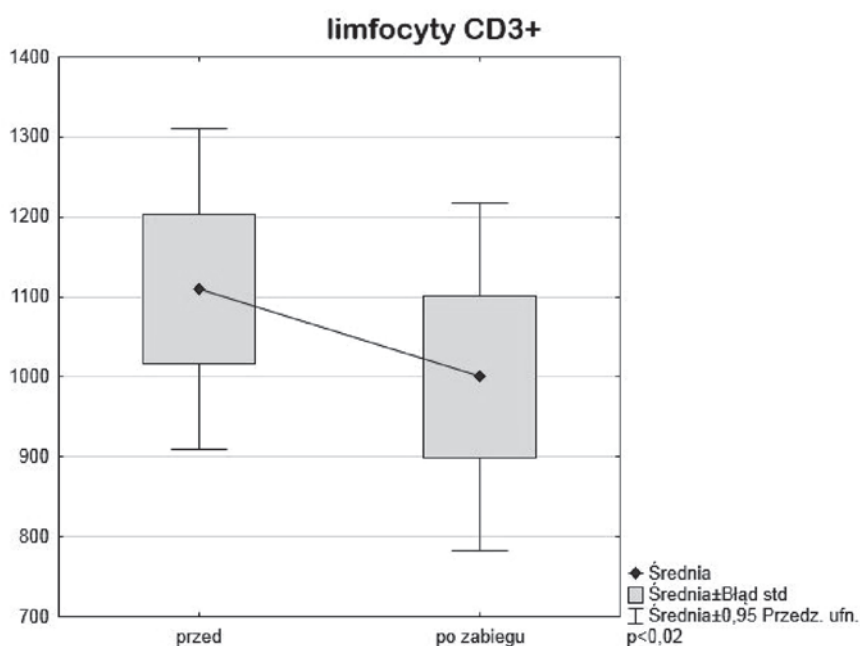
Tabela 1. Liczba limfocytów i ich subpopulacji limfocytarnych przed i po zabiegu kriogenicznym.

	Krioterapia ogólnoustrojowa	
	przed krio	po zabiegu w kriokomorze
n	15	15
liczba limfocytów $x \pm SD$	$1317,00 \pm 422,85$	$1181,87 \pm 476,08^*$
liczba limfocytów CD3+ $x \pm SD$	$1109,93 \pm 362,31$	$1000,13 \pm 392,67^*$
liczba limfocytów CD4+ $x \pm SD$	$675,33 \pm 252,35$	$636,07 \pm 298,76^{**}$
liczba limfocytów CD8+ $x \pm SD$	$409,48 \pm 151,19$	$341,47 \pm 140,84$
liczba limfocytów CD16+ $x \pm SD$	$91,40 \pm 44,18$	$74,40 \pm 39,45$
liczba limfocytów CD19+ $x \pm SD$	$121,13 \pm 51,88$	$101,20 \pm 57,08^{***}$
stosunek CD4/CD8	$1,85 \pm 0,77$	$2,01 \pm 0,79$

* – $p < 0,02$, ** – $p < 0,0004$, *** – $p < 0,03$



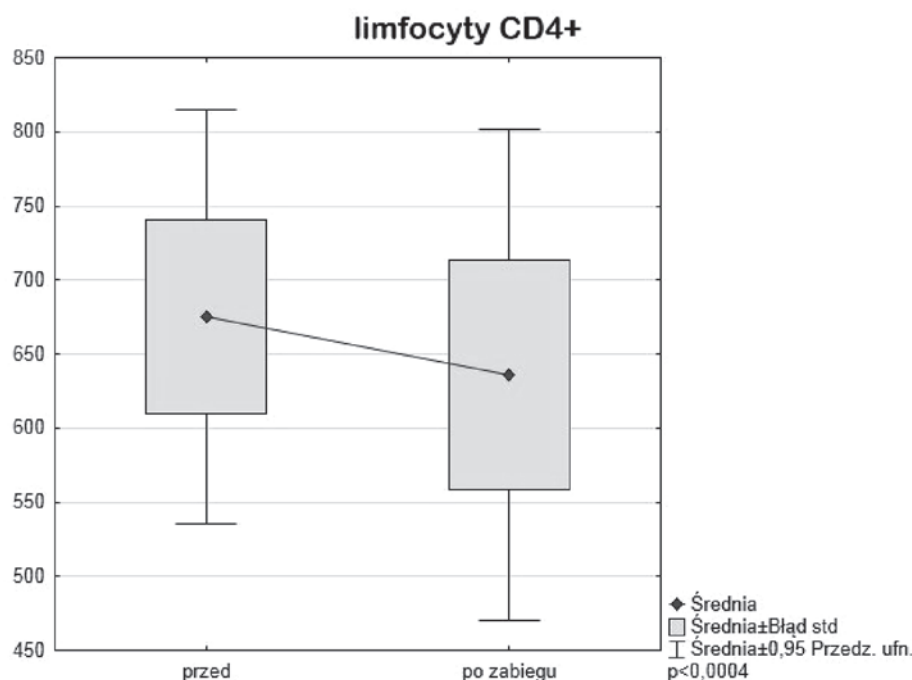
Rycina 1. Zmiana liczby limfocytów przed i po zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej ($p < 0,02$).



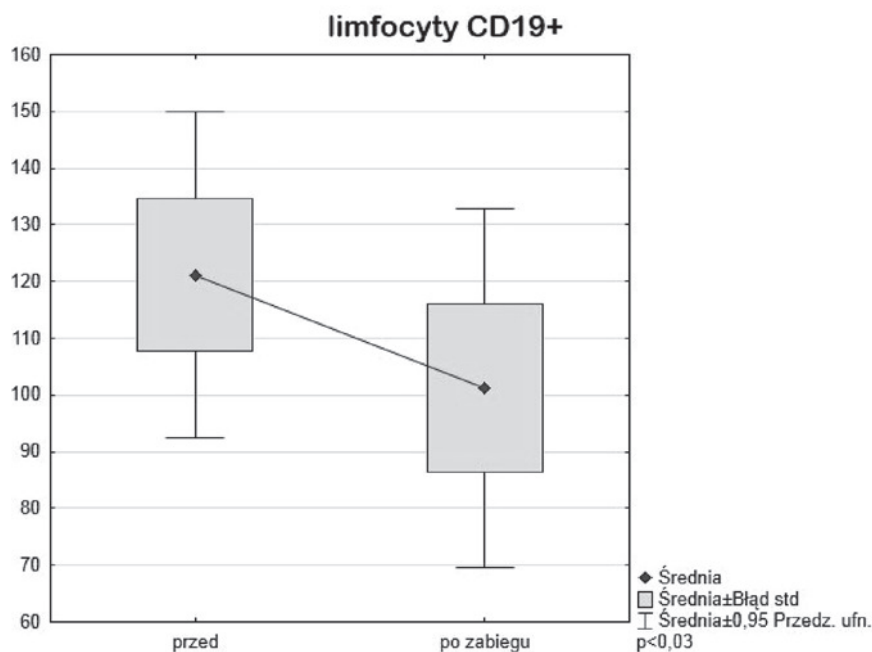
Rycina 2. Zmiana liczby limfocytów T (CD3+) przed i po zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej ($p < 0,02$).

go też jest badaniem przybliżonym i uproszczonym. Jeżeli jednak nawet w tym badaniu można wykazać różnice statystycznie, to można przypuszczać, że stanowią one wypadkową zmian dotyczących ogółu limfocytów jak również aktywności procesu zapalnego. Autorzy podejmowali już próby oceny wpływu krioterapii ogólnoustrojowej na proces zapalny. Stanek i wsp. [7] obserwowali u chorych

poddanych krioterapii ogólnoustrojowej znamienne statystycznie spadek wartości odczynu Biernackiego i stężenia markerów stanu zapalnego: białka ostrej fazy (CRP), seromukoidu oraz immunoglobulin IgG i IgA, a także znamienne statystycznie wzrost stężenia frakcji β -1 globulin. Podobne efekty w zakresie mediatorów zapalenia obserwowali Banfi i wsp. [10]. Inny aspekt procesu zapalnego na równowagę



Rycina 3. Zmiana liczby limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+) przed i po zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej ($p < 0,02$).



Rycina 4. Zmiana liczby limfocytów B (CD3-CD19+) przed i po zabiegu krioterapii ogólnoustrojowej ($p < 0,02$).

peroksydacyjno-oksydacyjną badał zespół Lubkowska i wsp. [16]. Obserwowali oni zakłócenie równowagi prooksydacyjno-oksydacyjnej z towarzyszącym obniżeniem całkowitej zdolności oksydacyjnej (TOS – *Total Oxidative Status*) oraz antyoksydacyjnej (TAS – *Total Antioxidative Status*) osocza po jednorazowym zabiegu w komorze kriogenicznej. Pod wpływem serii zabiegów obserwowali oni zwiększenie

aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz zdolności antyoksydacyjnej osocza. Autorzy podejmowali już próbę oceny wpływu zabiegów krioterapii ogólnoustrojowej na subpopulację limfocytną krwi obwodowej. Pierwsze próby podejmował Zagrobelny i wsp. dokonując pomiarów w mikroskopie fluorescencyjnym po wcześniejszym znakowaniu materiału metodą immunofluorescencji pośredniej.

Porównywali oni trzy grupy pacjentów z grupą kontrolną zdrowych ochotników. Pomiarów dokonywali przed badaniem oraz w 7 i 18 dniu badania. Do znakowania wykorzystali przeciwciała przeciw CD3, CD4, CD8, CD19 i CD56 [14]. Pacjentów chorych na chorobę zwyrodnieniową i jedną grupę pacjentów z rzs poddano terapii w komorze kriogenicznej. Druga grupa chorych na rzs była leczona kinezyterapią i lekami. Stwierdzili oni, że w 7 dniu leczenia zwiększa się liczba i odsetek limfocytów CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ i CD56+ w grupie chorych na rzs, następnie zmniejsza się, ale nie osiąga wartości wyjściowych przed badaniem. Stwierdzili oni również, że zwiększenie się odsetka i liczby komórek NK (CD56) u chorych na rzs i chorobę zwyrodnieniową stawów, u chorych stosujących ruch i krioterapię, wynika prawdopodobnie z hamującego działania obu rodzajów leczenia na wytwarzanie cytokin i prostaglandyn, co zgodnie z ich interpretacją wskazuje na działanie immunomodulujące leczenia ruchem i schładzania. Kolejną próbę oceny działania krioterapii ogólnoustrojowej na subpopulacje limfocytów u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów podjął zespół Oczachowska-Szafkowska i wsp. [13]. Oceny dokonywano metodą cytometrii przepływowej przed krioterapią, po jednym i po serii 12 zabiegów. Istotnie statystycznie zmniejszyła się liczba limfocytów i wszystkich ich mierzonych subpopulacji bezpośrednio po pierwszym zabiegu krioterapii. Po serii zabiegów zmiany istotne statystycznie obserwowano w ilości limfocytów T (CD3+) i limfocytów T pomocniczych (CD3+CD4+). Wyniki uzyskane w naszym badaniu potwierdzają wyniki innych autorów. W naszej próbie dokonaliśmy oceny tylko po jednorazowym zabiegu i w odmiennej grupie, bo u zdrowych pacjentów. W związku z powyższym należy założyć, że parametry procesu zapalnego u tych pacjentów były prawidłowe w przeciwieństwie do chorych z rzs, stąd obserwowane zmiany dotyczące tylko części ocenianych subpopulacji limfocytarnych. Tym niemniej fakt uzyskania istotnych zmian w zakresie liczby limfocytów i ich subpopulacji u zdrowych osób po jednorazowym zabiegu w komorze kriogenicznej potwierdza silne działanie tego zabiegu na komórki układu immunologicznego.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki potwierdzają, że krioterapia ogólnoustrojowa jest silnym czynnikiem stymulującym układ immunologiczny, co przekłada się na zmiany w ilości limfocytów i ich subpopulacji. Zmiany obserwowane są u osób zdrowych już po jednym zabiegu.

Piśmiennictwo

1. Yamauchi T., Nogami S., Miura K.: Various applications of extreme cryotherapy and strenuous exercise program – focusing on chronic rheumatoid arthritis. *Physiother. Rehab.*, 1981, 5, 35-39.
2. Gregorowicz H., Zagrobelny Z.: Krioterapia ogólnoustrojowa: wskazania i przeciwwskazania, przebieg zabiegu i jego skutki fizjologiczne i kliniczne. *Acta Bio-Opt. Inform. Med.*, 1998, 4, 3, 119-131.

3. Jagodziński L., Kubacka M., Wiśniowska B.: Krioterapia ogólnoustrojowa cz. I. Gabinet Prywatny, 2001, 91, 2-3, 39-42.
4. Księżopolska-Pietrzak K.: Miejsce krioterapii w leczeniu chorób narządu ruchu – mechanizm działania, wskazania i przeciwwskazania. *Acta Bio-Opt. Inform. Med.*, 1996, 2, 3-4, 157-160.
5. Sieroń A., Cieślak G. (Red.): Zastosowanie zimna w medycynie – kriochirurgia i krioterapia. *α-medica press*, Bielsko-Biała 2003.
6. Sieroń A. i wsp.: Zachowanie się wybranych parametrów zapalnych u pacjentów z zeszytniającym zapaleniem stawów kręgosłupa pod wpływem krioterapii ogólnoustrojowej – wstępne doniesienie. *Acta Bio-Opt. Inform. Med.*, 2003, 9, 1-2, 39-43.
7. Stanek A. et al.: Influence of cryotherapy on markers of inflammatory process in patients with ankylosing spondylitis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005, 35, Suppl. 2, 26.
8. Stanek A. et al.: Changes in antioxidant status in patients with ankylosing spondylitis during cryotherapy. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2006, 36, Suppl. 1, 20.
9. Banfi G. et al.: Effects of the whole-body cryotherapy on NTproBNP, hsCRP and troponin I in athletes. *J. Sci. Med. Sport.* 2009, 1: 609-610.
10. Banfi G. et al.: Effects of whole-body cryotherapy on serum mediators of inflammation and serum muscle enzymes in athletes. *J. Thermal. Biol.* 2009, 34: 55-59.
11. Woźniak A. i wsp.: Aktywność wybranych enzymów lizosomalnych w surowicy krwi kajakarzy po kriostymulacji ogólnoustrojowej. *Med. Sport.* 2001, 17: 322-327.
12. Woźniak A. et al.: The effect of whole-body cryostimulation on lysosomal enzyme activity in kayakers during training. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2007, 100: 137-142.
13. Oczachowska-Szafkowska S. i wsp.: Wpływ krioterapii ogólnoustrojowej na subpopulacje limfocytów krwi obwodowej u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów. *Acta Balneol.* 2010, 52: 142-150.
14. Zagrobelny Z. i wsp.: Wpływ ogólnoustrojowej krioterapii w komorze niskotemperaturowej oraz leczenia ruchem na subpopulacje limfocytów we krwi obwodowej u chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów i reumatoidalne zapalenie stawów. *Reumatologia*, 34 (4) 1996.
15. Stanek A., Sieroń A.: Współczesna krioterapia ogólnoustrojowa w odnowie biologicznej. *Ann. Acad. Med. Siles.* 2012, 66, 4, 64-70.
16. Lubkowska A. et al.: Acute effect of a signal whole-body cryostimulation on prooxidant-antioxidant balance in blood of healthy, young men. *J. Thermal. Biol.* 2008, 33: 464-467.

Wkład autorów:

Według kolejności

Konflikt interesu:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów

Pracę nadesłano: 28.09.2014 r.

Zaakceptowano: 22.10.2014 r.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Robert Szafkowski

Katedra i Zakład Balneologii i Medycyny Fizykalnej CM UMK

w Ciecchocinku

ul. Leśna 3

87-720 CIECHOCINEK

tel. (054)283 3915

e-mail: szafkowskir@cm.umk.pl