

Zaangażowanie Autorów

- A – Przygotowanie projektu badawczego
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Opracowanie piśmiennictwa
G – Pozyskanie funduszy

Author's Contribution

- A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Marta Pawłowska^{1(B,C,D,E,F)}, Celestyna Miła-Kierzenkowska^{1(A,D,E)}, Tomasz Boraczyński^{2(A,B)}, Michał Boraczyński^{2(A,B)}, Paweł Sutkowy^{1(C,D)}, Jarosław Paprocki^{1(E,F)}, Alina Woźniak^{1(A,G)}

¹ Katedra Biologii Medycznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

² Centralne Laboratorium Badawcze, Olsztyńska Szkoła Wyższa im. Józefa Rusieckiego w Olsztynie, Polska

¹ Chair of Medical Biology, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, Toruń, Poland

² Central Research Laboratory, Józef Rusiecki Olsztyn University College, Olsztyn, Poland

WPŁYW KĄPIELI W ZIMNEJ WODZIE NA POWYSIŁKOWĄ AKTYWNOŚĆ α 1-ANTYTRYPSYNY I WYBRANYCH ENZYMÓW LIZOSOMALNYCH WE KRWI ZDROWYCH MĘŻCZYŹN – DONIESIENIA WSTĘPNE

THE EFFECT OF COLD-WATER BATH ON POSTEXERCISE ACTIVITY OF α 1-ANTITRYPSIN AND SELECTED LYSOSOMAL ENZYMES IN HEALTHY MEN'S BLOOD – PRELIMINARY STUDY

Słowa kluczowe: kąpiele zimowe, kwaśna fosfataza, arylosulfataza, katepsyna D, α 1-antytrypsyna

Key words: winter bath, acid phosphatase, arylsulfatase, cathepsin D, α 1-antitrypsin

Streszczenie

Wstęp. Celem pracy było określenie wpływu kąpiele w zimnej wodzie zastosowanej po wysiłku fizycznym na aktywność α 1-antytrypsyny (AAT) oraz wybranych enzymów lizosomalnych: arylosulfatazy (ASA), kwaśnej fosfatazy (AcP) i katepsyny D (CTS D) we krwi zdrowych mężczyzn.

Materiał i metody. 22 mężczyzn poddano dwóm sesjom 30-min. aerobowego wysiłku fizycznego. Po jednym z nich mężczyźni odpoczywali w temperaturze pokojowej, podczas gdy po drugim poddano ich kąpiele w zimnej wodzie (3 min, 8°C; doświadczenie 2). W każdym z etapów krew pobrano trzykrotnie z żyły odłokciowej: przed wysiłkiem fizycznym oraz 2 i 20 min. po zakończeniu wysiłku. W surowicy krwi oznaczono aktywności AAT, ASA, AcP i CTS D. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu ANOVA. Zmiany na poziomie $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Wyniki. Wykazano istotny statystycznie wzrost aktywności AcP i CTS D oraz obniżenie aktywności AAT po wysiłku fizycznym i odpoczynku w temperaturze pokojowej w porównaniu do aktywności oznaczonych parametrów przed wysiłkiem fizycznym. Nie odnotowano natomiast istotnych statystycznie różnic aktywności inhibitora proteaz (AAT) oraz oznaczanych enzymów lizosomalnych po wysiłku fizycznym i kąpiele w zimnej wodzie w porównaniu z ich aktywnością przed 30-minutowym wysiłkiem.

Wnioski. Kąpiel w zimnej wodzie zastosowana po wysiłku fizycznym zwiększa stabilność błon lizosomalnych i może skutkować zmniejszeniem powysiłkowych uszkodzeń mięśni.

Summary

Background. The aim of the study was to determine the effect of winter bath after physical exercise on the activity of α 1-antitrypsin (AAT) and selected lysosomal enzymes: arylsulfatase (ASA), acid phosphatase (AcP) and cathepsin D (CTS D) in healthy males' blood.

Material and methods. 22 males participated in two sessions of aerobic physical exercise. After one session the subjects rested in room temperature while after the other session they bathed in cold water (3 minutes, 8°C; experiment 2). During each stage they had blood taken from the basilic vein prior to physical exercise and 2 and 20 minutes after the exercise. The activity of AAT, ASA, AcP and CTS D was assayed in blood serum. The obtained results were subjected to statistical analysis using ANOVA test. The changes at the level $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

Results. A statistically significant increase in AcP and CTS D activity was found as well as a decrease in AAT activity following physical exercise and resting at room temperature as compared with the activity of the assayed parameters prior to physical exercise. Conversely, no statistically significant differences in protease inhibitor activity (AAT) and lysosomal enzyme activity were noted after physical exercise and cold water bath as compared with their activity measured prior to 30-minute long physical exercise.

Conclusions. Hot water bath applied after physical exercise increases the stability of lysosomal membranes and may result in a decrease of post-exercise muscle damage.

Word count: 6285
Tables: 2
Figures: 0
References: 25

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Marta Pawłowska
Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
tel.: (52) 585 37 37, e-mail: pawlowska.marta.89@gmail.com

Otrzymano / Received 09.05.2017 r.
Zaakceptowano / Accepted 23.08.2017 r.

Wstęp

Kąpiele zimowe polegają na intensywnej, krótkotrwałej ekspozycji organizmu na działanie niskiej temperatury otoczenia w okresie zimowym w zamrzniętych rzekach, jeziorach lub morzach. Praktykowane są one głównie w krajach północnych, charakteryzujących się długimi zimami i niskimi średnimi temperaturami rocznymi. Wyniki wielu badań wskazują na pozytywny wpływ zimowych kąpieł na organizm ludzki. Tego typu zabiegi poprawiają ogólne samopoczucie, a także skutecznie obniżają częstość występowania zakażeń górnych dróg oddechowych, zmniejszają bóle mięśniowo-stawowe i łagodzą objawy stanu zapalnego [1,2]. Coraz większą popularnością wśród sportowców cieszy się stosowanie powysiłkowej kąpieł w zimnej wodzie, w celu zminimalizowania zmęczenia i przyspieszenia regeneracji organizmu po wysiłku. Sportowcy chętnie korzystają z tych zabiegów ze względu na ich efektywność oraz niskie koszty [3,4]. Kąpiel w zimnej wodzie ma na celu redukcję odpowiedzi zapalnej, jak również zmniejszenie powstających po wysiłku fizycznym obrzęków i bólu mięśni [3].

Intensywny wysiłek fizyczny skutkuje wystąpieniem licznych zaburzeń fizjologicznych, takich jak uszkodzenie mięśni, hipertermia, odwodnienie czy wyczerpanie glikogenu [3]. Uszkodzenie błony komórkowej komórek mięśniowych sprawia, że jest ona bardziej przepuszczalna dla różnych substancji [5]. Skutkuje to nagromadzeniem wewnątrzkomórkowego wapnia i zaburzeniem generowania siły mięśniowej [6]. Wzrost stężenia wapnia w komórkach mięśniowych inicjuje odpowiedź zapalną – prowadzi do aktywacji proteaz i uwalniania cytokin prozapalnych, a także promuje powstawanie obrzęku [5]. Zmianom tym może towarzyszyć także wzrost aktywności enzymów należących do grupy kwaśnych hydrolaz – enzymów lizosomalnych [6,7]. Funkcją enzymów lizosomalnych jest przede wszystkim trawienie makrocząsteczek – białek, cukrów, tłuszczów oraz kwasów nukleinowych wewnątrz komórki. Ponadto mogą one uczestniczyć w apoptozie, a także wywierać wpływ na powstawanie stanu zapalnego m.in. po wysiłku fizycznym [8]. Intensywny trening fizyczny może przyczynić się do zwiększenia przepuszczalności błon lizosomalnych i uwolnienia hydrolaz lizosomalnych do krwiobiegu [9]. Wykazano z kolei, że ekspozycja organizmu na niskie temperatury otoczenia korzystnie wpływa na procesy transportu błonowego komórek mięśniowych oraz stabilizuje błony lizosomalne, m.in. przez łagodzenie stresu oksydacyjnego, towarzyszącego wysiłkowi fizycznemu [6].

Celem niniejszych badań było określenie wpływu kąpieł w zimnej wodzie zastosowanej w celu regeneracji po wysiłku fizycznym na aktywność α 1-antytrypsyny oraz wybranych enzymów lizosomalnych: arylosulfatazy, kwaśnej fosfatazy i katepsyny D we krwi zdrowych mężczyzn.

Materiał i metody

W badaniach wzięło udział 22 zdrowych mężczyzn (średnia wieku $43,2 \pm 5,9$ lat), regularnie poddających się kąpielom zimowym. Bezpośrednio przed badaniem ani w jego trakcie osoby badane nie zmieniały swoich nawyków żywieniowych i aktywności fizycznej. Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w Tabeli 1.

Background

Winter baths involve intense, short-term exposure to low ambient temperature in winter, in frozen rivers, lakes or seas. They are mainly practiced in northern countries, where winters and long and average yearly temperatures are low. The results of many studies indicate a favorable effect of winter baths on the human body. Such procedures improve general feeling and effectively reduce the incidence of upper respiratory tract infections and musculo – articular conditions and alleviate the symptoms of inflammatory conditions [1,2]. Post-exercise cold water baths have become increasingly popular among athletes as they minimize fatigue and accelerate body regeneration following exercise. Athletes eagerly take advantage of such procedures due to their effectiveness and low costs [3,4]. Cold water baths are aimed at reduction of inflammatory responses as well as post-exercise swelling and muscle pain [3].

Intense physical exercise results in numerous physiological disorders, such as muscle damage, hyperthermia, dehydration or glycogen deficiency [3]. The damage of muscle cell tissue results in its increased permeability for various substances [5]. This, in turn, results in aggregation of intracellular calcium levels and impaired generation of muscle strength [6]. The increase in calcium levels in muscle cells initiates inflammatory responses, leading to protease activation and to release of pro-inflammatory cytokines, and contributes to swelling development [5]. Such changes can also be accompanied by increased activity of enzymes belonging to acid hydrolase group, namely lysosomal enzymes [6,7]. The function of lysosomal enzymes includes mainly digestion of microparticles – proteins, glucose, fats and nucleic acids inside the cell. Moreover, they may participate in apoptosis and contribute to the development of post-exercise inflammatory conditions [8]. Intense physical exercise can contribute to an increased permeability of lysosomal membranes and to release of lysosomal hydrolases to blood circulation [9]. It was also proved that body exposure to low ambient temperatures favorably affects the processes of membranous transport of muscle cells and stabilizes lysosomal membranes, also by alleviating oxidative stress accompanying physical exercise [6].

The aim of this study was to determine the effect of cold bath for regeneration after physical exercise on the activity of α 1-antitrypsin and selected lysosomal enzymes: arylsulfatase, acid phosphatase and cathepsin D in healthy males' blood.

Material and methods

22 healthy males (the mean age = 43.2 ± 5.9 years), regularly involved in winter bathing, participated in the study. Immediately prior to and during the study the subjects' nutritional habits and physical activity remained unchanged. Characteristics of the study group are presented in Table 1.

Tab. 1. Charakterystyka grupy badanej (wyniki przedstawiono jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe)
 Tab. 1. The characteristics of the study group (the results are shown as average value \pm standard deviation)

Wiek [lata]/ Age [years]	43,2 \pm 5,9
Wzrost/ B ody height [cm]	174,6 = 73
Masa ciała B ody mass [kg]	85,7= 13,9
BMI [kg m ²]	28,06= 13,9

Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Uczestnicy projektu zostali poinformowani o celu badań oraz potencjalnym ryzyku z nimi związanym i wyrazili na nie pisemną zgodę.

Podczas pierwszego etapu badania ochotnicy zostali poddani 30-minutowemu aerobowemu wysiłkowi fizycznemu (o mocy na poziomie 70% maksymalnej częstości skurczów serca) na ergometrze rowerowym (Monark Ergomedic 828 E). Następnie uczestnicy badania odpoczywali w pozycji siedzącej w temperaturze pokojowej. Podczas drugiego etapu (tydzień później) osoby badane wykonały identyczny wysiłek fizyczny, ale 5 minut po jego zakończeniu zostały poddane 3-minutowej kąpieli w basenie z zimną wodą o temperaturze 8°C. Osoby uczestniczące w eksperymencie ubrane były jedynie w kąpielówki i zanurzały w wodzie całe ciało z wyjątkiem głowy i szyi. Podczas obu sesji od każdej osoby badanej trzykrotnie pobrano krew z żyły odłokciowej: przed wysiłkiem fizycznym (próbą kontrolną) oraz 2 min. i 20 min. po zakończeniu wysiłku. Krew pobrano do próbek bez antykoagulantu w celu uzyskania surowicy krwi, w której oznaczono aktywność α 1-antytrypsyny (AAT), arylosulfatazy (ASA), kwaśnej fosfatazy (AcP) i katepsyny D (CTS D).

W celu uzyskania surowicy krwi, krew żylną pobraną od uczestników badania pozostawiono przez 1 godzinę w temp. 37°C, a po jej wykrzepieniu, próbki wirowano przez 10 min. przy 12000 x g. Aktywność kwaśnej fosfatazy oznaczono metodą wg Bessy'a w modyfikacji Krawczyńskiego [10]. Do badań wykorzystano p-nitrofenylofosforan dwusodowy (substrat) w 0,5 M buforze cytrynianowo-winianowo-formaldehydowym o pH 4,9. Miarą aktywności enzymu była ilość uwalnianego p-nitrofenolu podczas enzymatycznej hydrolizy substratu. W celu wykonania oznaczenia do roztworu roboczego substratu dodano badaną surowicę i przez 30 min. inkubowano w temp. 37°C. Reakcję zahamowano przez dodanie 0,1 N NaOH. Absorbancja powstałego barwnego roztworu została zmierzona przy długości fali λ = 405nm. Od otrzymanego wyniku odjęto absorbancję próby kontrolnej, w której roztwór roboczy substratu zastępuje się wodą destylowaną oraz absorbancję próby ślepej, w której surowicę badaną zastępuje się wodą destylowaną. Uzyskaną wartość porównano do absorbancji wzorca. Aktywność kwaśnej fosfatazy wyrażono w nmolach p-nitrofenolu/mg białka/min. Oznaczenie aktywności α 1-antytrypsyny wykonano metodą Erikssona [11]. Zasada oznaczenia polega na pomiarze obniżania się aktywności enzymatycznej trypsyny pod wpływem krótkiej inkubacji z odwłóknioną surowicą krwi. Reakcję zapoczątkowano przez dodanie substratu: benzoilo-DL-arginylo-p-nitroanilidu do mieszaniny zawierającej: bufor 0,1 M TRIS – HCl pH

The study was approved by the Bioethics Committee at L. Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz. The participants were informed about the aim of the study and potential risk, and expressed their written consent to participate in the study.

During the first stage of the study the volunteers were subject to 30-second aerobic exercise (the power level – 70% of maximal heart rate) on a cycle ergometer (Monark Ergomedic 828 E). After that they rested in a seated position at room temperature. During the second stage of the study (a week later) the participants performed an identical physical exercise, however, 5 minutes following the exercise they bathed in a swimming pool with cold water (the temperature = 8°C) for 3 minutes. The participants were dressed in swimming trunks and immersed their bodies in water, except heads and necks. During both sessions each participant had his blood taken from the basilic vein: prior to physical exercise (control group) and 2 and 20 minutes following exercise. The blood was collected to test tubes without the anticoagulant to obtain serum for assaying the activity of α 1-antitrypsin (AAT), arylsulfatase (ASA), acid phosphatase (AcP) and cathepsin D (CTS D). In order to obtain blood serum the venous blood taken from the participants was left for an hour in the temperature of 37°C and after clotting the samples were centrifuged for 10 minutes at 12000 x g. The activity of acid phosphatase was assayed according to Bessy's method, modified by Krawczyński [10]. P-nitrophenyl phosphate disodium (substrate) with 0.5 M citrate formaldehyde buffer 4.9 pH was used for this purpose. The measure of enzyme activity was the amount of the released p-nitrophenyl during enzymatic substrate hydrolysis. For the assay, the tested serum was added to the working solution and incubated for 30 minutes at the temperature of 37°C. The reaction was inhibited by adding 0,1 N NaOH. Absorbance of the prepared colorful solution was measured at the wavelength λ = 405nm. Absorbance of the control group, where the working substrate solution is replaced with distilled water and absorbance of the blind test where the tested serum is replaced with distilled water were subtracted from the obtained result. The obtained value was compared to model absorbance. Acid phosphatase activity was expressed in nmol of p-nitrofenol/mg protein/min. The assay of α 1-antitrypsin was carried out using Eriksson's method [11]. The assay rule involves measuring the decrease of trypsin enzymatic activity under influence of short incubation with defibrinated blood serum. The reaction was initiated by adding substrate: benzoyl DL-arginine-p-nitroanilide containing: buffer 0.1 M TRIS – HCl pH 8.2 containing 0.02 M CaCl₂, trypsin solution and the tested serum. Inhibition of the reaction occurred after 10-minute incubation at the temperature of 25°C

8,2 zawierający 0,02 M CaCl₂, roztwór trypsyny oraz badaną surowicę. Hamowanie reakcji następowało po 10-minutowej inkubacji w temp. 25°C przez dodanie 30% kwasu octowego. Następnie dokonano odczytu absorbancji próby badanej i kontrolnej wobec próby ślepej przy długości fali $\lambda = 410$ nm. Aktywność α 1-antytrypsyny wyrażono w mg zahamowanej trypsyny/ ml surowicy. Aktywność arylosulfatazy oznaczono metodą Roya zmodyfikowaną przez Błęszyńskiego [12]. Do oznaczeń jako substrat wykorzystano 0,01M siarczan 4-nitrokatecholu (4NCS) w 0,5M buforze octanowym o pH 5,6. Miarą aktywności enzymu była ilość uwalnianego 4-nitrokatecholu podczas enzymatycznej hydrolizy substratu. W celu wykonania oznaczenia do 0,9 ml roztworu roboczego substratu dodano 0,1 ml badanej surowicy i inkubowano przez 10 min. w temp. 37°C. Reakcję zahamowano przez dodanie 1 N NaOH. Absorbancję powstałego barwnego roztworu zmierzono przy długości fali $\lambda = 510$ nm. Aktywność arylosulfatazy wyrażono w nmolach 4-NC/mg białka/min. Do oznaczenia aktywności katepsyny D wykorzystano natomiast metodę Ansona [13]. Substrat reakcji stanowiła 2% zdenaturowana hemoglobina wołowa, rozpuszczona w 100 ml 0,1 M buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 3,8. Reakcję zapoczątkowano przez dodanie surowicy badanej do ww. roztworu, a następnie całość inkubowano w temp. 37°C. Hamowanie reakcji przeprowadzono 0,1 N roztworem NaOH. Dodanie odczynnika fenolowego powodowało powstanie niebieskiego zabarwienia, którego poziom oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 660$ nm. Stężenie produktu reakcji obliczono z krzywej wzorcowej dla tyrozyny. Aktywność katepsyny D wyrażono w nmolach tyrozyny /mg białka/min.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programu IBM SPSS Statistics 21. Wykonano test ANOVA z testowaniem post hoc (test Tukey'a). Dla sprawdzenia zgodności rozkładu zmierzonych z rozkładem normalnym wykorzystano test Kołmogorowa-Smirnowa oraz test Levene'a, za pomocą którego analizowano jednorodność wariancji w danej grupie zmiennych. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm odchylenie standardowe (SD). Za istotny statystycznie przyjęto współczynnik istotności o wartości $p < 0,05$.

Wyniki

Wyniki uzyskane w badaniach przedstawiono w Tabeli 2. W pierwszym etapie badania (wysiłek fizyczny i odpoczynek w temperaturze pokojowej) wykazano istotny statystycznie wzrost aktywności AcP o około 9% 2 min. ($p < 0,05$) i o około 33% 20 min. ($p < 0,001$) po wysiłku fizycznym w porównaniu do aktywności tego enzymu przed wykonaniem ćwiczeń (próba kontrolna). Aktywność tego enzymu była ponadto wyższa 20 min. po zakończeniu wysiłku niż po 2 min. ($p < 0,05$). Aktywność CTS D 20 min. po wysiłku fizycznym była ponad dwukrotnie wyższa ($p < 0,001$) w porównaniu do próby kontrolnej. Zaobserwowano też istotny statystycznie wzrost aktywności tego enzymu 20 min. po wysiłku fizycznym w porównaniu do wyników uzyskanych 2 min. po wysiłku ($p < 0,001$). Ponadto odnotowano tendencję wzrostową aktywności ASA po wysiłku fizycznym, ale zmiana ta nie była istotna statystycznie. Również różnica aktywności ASA 2

after adding 30% acetic acid. It was followed by absorbance readout from the studied and the control group and for the blind test at the wavelength $\lambda = 410$ nm. The activity of α 1-antitrypsin was expressed in mg of the inhibited trypsin /ml serum. Arylsulfatase activity was assayed using Roy method, modified by Błęszyński [12]. For substrate assay 0.01M 4-nitrocatechol sulfate (4NCS) was used in 0.5M acetate buffer pH 5.6. The measure of enzyme activity was the amount of the 4-nitrocatechol released during enzymatic substrate hydrolyse. For assaying, 0.1 ml of the tested serum was added to 0.9 ml of working substrate solution and incubated for 10 minutes at the temperature of 37°C. The reaction was inhibited by adding 1 N NaOH. Absorbance of the prepared colorful solution was measured at the wavelength $\lambda = 510$ nm. Arylsulphatase activity was expressed in nmol of 4-NC/mg protein/min. Cathepsin D activity was assayed using Anson method [13]. Reaction substrate was 2% denatured ox blood hemoglobin, dissolved in 100 ml 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 3.8. The reaction was initiated by adding the tested serum to this solution and then the mixture was incubated at the temperature of 37°C. Reaction was inhibited using 0.1 N NaOH solution. Adding the phenol reagent resulted in blue coloration the level of which was assayed by means of spectrophotometry at the wavelength $\lambda = 660$ nm. Concentration of the reaction product was calculated from the model curve for thyroxine. Cathepsin D activity was expressed in nmol/ of tyrosine /mg protein/min.

The obtained results were subjected to statistical analysis using IBM SPSS Statistics 21 program. ANOVA test was applied with post hoc Tukey test. In order to verify the compliance of variable distribution with the normal distribution, Kolmogorov-Smirnov test was used as well as Levene's test to analyze uniformity of variance in a given group of variables. The results are presented as mean values \pm standard deviation (SD). Statistical significance level was set at $p < 0.05$.

Results

The results obtained in this study are presented in Table II. During the first stage of the study (involving physical exercise and rest at room temperature) a statistically significant increase in AcP activity was noted, by about 9% within 2 minutes ($p < 0.05$) and by about 33% within 20 minutes ($p < 0.001$) following exercise, compared with this enzyme activity prior to exercise (control group). Moreover, this enzyme activity was higher 20 minutes after the exercise than 2 minutes after the exercise ($p < 0.05$). CTS D activity was twice as high ($p < 0.001$) 20 minutes following exercise compared with that noted in the control group. A statistically significant increase in this enzyme activity was also noted 20 minutes after physical exercise compared with the results obtained 2 minutes following exercise ($p < 0.001$). Moreover, an incremental tendency was found in ASA activity after physical exercise, although the change was statistically insignificant.

Tab. 2. Aktywności al-antytrypsyny (AAT) i enzymów lizosomalnych (AcP, ASA, CTS D) w surowicy krwi
 Tab. 2. The activity of al-antitrypsin and lysosomal enzymes (AcP: ASA, CTS D) in serum

Badany parametr/ Tested parameter	Etap 1 (wysiłek fizyczny i odpoczynek w temperaturze pokojowej)/ Stage 1 (exercise followed by recovery at room temperature)			Etap 2 (wysiłek fizyczny i kąpiel w zimnej wodzie)/ Stage 2 (exercise followed by cold water bath)		
	Przed wysiłkiem/ Before exercise	2 min. po wysiłku/ 2 min. after exercise	20 min. po wysiłku/ 20 min. after exercise	Przed wysiłkiem/ Before exercise	2 min. po wysiłku/ 2 min after exercise	20 min. po wysiłku/ 20 min. after exercise
Aktywność AcP [nmol p-nitrofenolu/mg białka min x 10 ³]/ The activity of AcP [nmol p-nitrophenol/mg protein min x 10 ³]	1,06 = 020	1,16=031*	1,41 ±0,18** ^A	1,10 = 026	1,17 = 023	1,04=024
Aktywność AAT [mg zahamowaną trypsynę/ml surowicy]/ The activity of AAT [mg inhibited trypsin/ml serum]	0,89 = 0,11	0,75 = 0,13*	0,75 = 0,11*	0,67 = 0,10	0,73 = 0,11	0,74=0,09
Aktywność ASA [nmol 4-NC/mg białka·min x 10 ⁻³]/ The activity of ASA [nmol 4-NC/mg protein·min x 10 ⁻³]	0,79 = 035	1,03 = 0,43	1,19 = 0,48	1,08 = 038	0,95 = 031	1,04=0,66
Aktywność CTS D [nmol tyrozyny/mg białka min x 10 ²]/ The activity of CTS D [nmol tyrosine/mg protein·min x 10 ²]	2,67= 138	22 = 1,02**	5,77 = 0,9S** ^{AA}	3,91 = 1,58	3,49 = 128	6,59= 1,92 ^{AA}

Wyniki przedstawiono jako wartość średnia ± odchylenie standardowe.

* różnica istotna statystycznie versus przed wysiłkiem (p<0,05) ** różnica istotna statystycznie versus przed wysiłkiem (p<0,001)

^A różnica istotna statystycznie versus 2 min. po wysiłku (p<0,05) ^{AA} różnica istotna statystycznie versus 20 min. po wysiłku (p<0,001)

The results are shown as average value ± standard deviation

* Statistically significant difference versus before exercise (p<0,05) ** Statistically significant difference versus before exercise

(p<0,001), ^A Statistically significant difference versus 2 min. after exercise (p<0,05) ^{AA} Statistically significant difference versus 20 min. after exercise (p<0,001)

i 20 min. po wykonaniu ćwiczeń nie była istotna statystycznie. Wykazano ponadto istotne statystycznie obniżenie aktywności AAT o około 13% 2 min. po wysiłku fizycznym (p<0,05) oraz o około 16% (p<0,05) 20 min. po wysiłku w porównaniu do aktywności oznaczonej w pierwszym pobraniu.

Natomiast w drugim etapie badania (wysiłek fizyczny skojarzony z kąpielą w zimnej wodzie) nie wykazano istotnych statystycznie zmian aktywności AAT oraz oznaczanych enzymów lizosomalnych w wyniku wysiłku fizycznego w porównaniu z ich aktywnością przed wysiłkiem. Odnotowano jednak istotny statystycznie wzrost aktywności CTS D pomiędzy 2 a 20 min. po wysiłku fizycznym (p<0,001). Różnice aktywności AcP, AAT i ASA 20 min. po wysiłku fizycznym w porównaniu do wyników uzyskanych 2 min. po wysiłku nie były istotne statystycznie.

Dokonano również porównania wyników otrzymanych w etapie 1 z wynikami uzyskanymi w etapie 2. W badaniach nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic aktywności wszystkich badanych parametrów 2 min. po wysiłku fizycznym między pierwszym a drugim etapem. Z kolei 20 min. po wysiłku fizycznym i odpoczynku w temperaturze pokojowej aktywność AcP była istotnie statystycznie wyższa niż aktywność 20 min. po wysiłku i kąpeli w zimnej wodzie.

Also the difference in ASA activity 2 and 20 minutes after exercise was statistically insignificant. A statistically significant decrease in AAT activity was found 2 minutes after exercise, by about 13% (p<0,05) and 20 minutes after exercise, by about 16% (p<0,05), as compared with the activity determined during the first sampling.

Conversely, during the second stage of the study (physical exercise combined with hot water bath) no statistically significant differences in AAT activity or the assayed lysosomal enzymes were found after physical exercise compared to the corresponding baseline values obtained prior to physical exercise. However, a statistically significant increase in CTS D activity was noted between 2 and 20 minutes following physical exercise (p<0,001). The differences between AcP, AAT and ASA activities 20 minutes following physical exercise, compared with the values obtained 2 minutes after physical exercise were statistically insignificant.

The values obtained during the first stage were also compared with the ones obtained during the second stage of the study. No statistically significant differences were found in the activities of all the studied parameters 2 minutes following physical exercise between the first and the second stage of the study. 20 minutes after physical exercises and rest in room temperature in turn, AcP activity turned out significantly higher in terms of statistics than the activity determined 20 minutes following physical exercise and cold bath.

Dyskusja

W niniejszej pracy zaobserwowano wzrost aktywności enzymów lizosomalnych po wysiłku fizycznym i odpoczynku w temperaturze pokojowej. Woźniak i wsp. [6] w swoich badaniach również odnotowali istotne statystycznie zmiany aktywności enzymów lizosomalnych po wykonaniu intensywnego wysiłku fizycznego u kajakarzy. W swojej pracy zaobserwowali wzrost aktywności AcP, ASA i CTS D. Znaczący wzrost aktywności ASA i AcP po wysiłku fizycznym odnotowali również Drewa i wsp. [14]. Autorzy zbadali aktywność wybranych enzymów lizosomalnych u kajakarzy i wiosłarzy po wykonaniu maksymalnie intensywnego wysiłku fizycznego. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki oraz przytoczone dane literaturowe wskazują, że wysiłek fizyczny wywiera wpływ na aktywność enzymów lizosomalnych we krwi. Hydrolazy lizosomalne są uważane za dobre markery uszkodzeń komórkowych, co zostało udokumentowane w wielu badaniach [15]. Wpływ wysiłku fizycznego na lizosomy udokumentowano także na modelach zwierzęcych. Pilstrom i wsp. [16] zaobserwowali wzrost aktywności CTS D oraz innych wybranych enzymów lizosomalnych po treningu u szczurów. Podczas intensywnego wysiłku fizycznego wzrasta przepuszczalność błon lizosomów, co umożliwia przenikanie hydrolaz lizosomalnych do cytoplazmy, a następnie do układu krwionośnego [9]. Zwiększona aktywność enzymów lizosomalnych w mięśniach, które uległy uszkodzeniom podczas wysiłku fizycznego, przejawia się wzrostem aktywności tych hydrolaz we krwi. Wzrost aktywności enzymów lizosomalnych wynika również z nagromadzenia neutrofilii, monocytów i makrofagów. Fagocyty te uczestniczą w naprawie uszkodzonej tkanki mięśniowej i uwalniają hydrolazy lizosomalne, w tym m. in. AcP [17]. Wysiłek fizyczny wzmagają ponadto wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT). Brak równowagi między wytwarzaniem RFT a ich usuwaniem przez układ antyoksydacyjny prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego, który również jest zaangażowany w powstawanie uszkodzeń mięśni związanych z działaniem enzymów lizosomalnych [18,19].

W pracy wykazano także istotne statystycznie obniżenie aktywności AAT po wysiłku fizycznym i odpoczynku w temperaturze pokojowej. Alfa 1-antytrypsyna to białko ostrej fazy, którego aktywność może zmieniać się w przebiegu odpowiedzi zapalnej. AAT jest jednym z najważniejszych inhibitorów proteaz serynowych w organizmie człowieka. Prawidłowa aktywność tego enzymu warunkuje spowolnienie reakcji zapalnej poprzez hamowanie wydzielania cytokin, enzymów proteolitycznych i mediatorów zapalnych [20]. Schild i wsp. [21] w swoich badaniach zaobserwowali wzrost aktywności AAT po wysiłku fizycznym. Intensywny trening fizyczny indukuje leukocytozę i wzrost uwalniania elastazy (endopeptydaza), produkowanej przez neutrofile. AAT, jako inhibitor elastazy, ogranicza niekorzystne dla organizmu efekty jej działania [21].

W niniejszej pracy nie odnotowano istotnych statystycznie różnic aktywności wybranych enzymów lizosomalnych i AAT po wysiłku fizycznym skojarzonym z kąpielą w zimnej wodzie. Może to świadczyć o stabilizacyjnym działaniu kąpieli w zimnej wodzie na błony lizosomalne, co skutkuje zmniejszonym uwalnianiem hydrolaz lizosomalnych do krwi i zmniejszeniem ich aktywności. Mila-Kierzenkowska i wsp. [15]

Discussion

This study showed an increase in lysosomal enzyme activity after physical exercise and rest at room temperature. Woźniak et al. [6] in their study also noted statistically significant changes in lysosomal enzyme activity after intense physical exercise in kayakers. They found increases in AcP, ASA and CTS D activities. A significant increase in ASA and AcP activity after physical exercise was also noted by Drewa et al [14]. The authors studied the activity of selected lysosomal enzymes in kayakers and rowing competitors after maximally intense physical exercise. The values obtained in this study as well as the cited data from reference sources indicate that physical exercise affects the activity of lysosomal enzymes in blood. Lysosomal hydrolases are believed to be good markers of cell damage, which has been documented in numerous studies [15]. The effect of physical exercise on lysosomes has also been documented using animal models. Pilstrom et al. [16] noted an increase in CTS D activity and the activity of other selected lysosomal enzymes after rat training. During an intense physical exercise, permeability of lysosomal membranes increases, which enables permeation of lysosomal hydrolases to the cytoplasm and next, to the circulatory system [9]. An increased activity of lysosomal enzymes in muscles which were damaged during physical exercise is manifested by the increase in the activity of these hydrolases in blood. The increase of lysosomal enzyme activity also results from accumulation of neutrophils, monocytes and macrophages. These phagocytes participate in reparation of the damaged muscle tissue and release lysosomal hydrolases including AcP [17]. Physical exercise also enhances production of reactive oxygen species (ROS). The lack of balance between production and elimination of ROS by antioxidant system leads to oxidative stress which is also engaged in the development of muscle damage due to the activity of lysosomal enzymes [18,19].

The study also found a significant decrease in AAT activity after physical exercise and rest in room temperature. α 1-antitrypsin is an acute phase protein whose activity can change in the course of an inflammatory reaction. AAT is one of the most important serine protease inhibitor in the human body. A normal activity of this enzyme slows inflammatory responses through inhibition of cytokine, proteolytic enzyme and inflammatory mediator production [20]. Schild et al. [21] in their study noted an increase in AAT activity after physical exercise. Intense physical training induces leukocytosis and enhanced release of elastase (endopeptidase), produced by neutrophils. AAT, which is elastase inhibitor, reduces adverse effects of elastase activity [21].

In this study no statistically significant differences were noted in the activity of selected lysosomal enzymes and AAT following physical exercise, combined with cold water bath. This may be indicative of a stabilizing effect of cold water bath on lysosomal membranes, resulting in a decreased release of lysosomal hydrolases to blood and the decreased activity of lysosomal hydrolases. Mila-Kierzenkowska et al. [15] studied the effect of cold water bath and exposure to high temperatures in saunas on the activity of lysosomal enzymes in healthy volunteers – men re-

badali wpływ kąpiele w zimnej wodzie oraz ekspozycji na wysoką temperaturę w saunie na aktywność enzymów lizosomalnych u zdrowych ochotników – mężczyzn regularnie poddających się kąpielom zimowym oraz mężczyzn wcześniej niekorzystających z kąpiele zimowych. Uczestnicy badań przed ekspozycją na zmiany temperatury otoczenia nie wykonywali wysiłku fizycznego. Autorzy nie odnotowali istotnych statystycznie zmian aktywności AAT oraz wybranych enzymów lizosomalnych po kąpiele w zimnej wodzie. Wyniki te mogą sugerować, że krótkotrwałe kąpiele w zimnej wodzie są bezpieczne dla błon lizosomalnych. Woźniak i wsp. [6] wykazali z kolei, że ekspozycja na działanie skrajnie niskich temperatur stabilizuje błony lizosomalne i przyczynia się do redukcji uszkodzeń mięśni, powstających po intensywnym wysiłku fizycznym. W kolejnej pracy Woźniak i wsp. [22] badali wpływ kriostymulacji na enzymy lizosomalne i biomarkery stresu oksydacyjnego u wioślarzy. Autorzy zauważyli, że kriostymulacja może zmniejszyć ryzyko powstawania stresu oksydacyjnego oraz zminimalizować zakres uszkodzeń mięśni wywołanych przez intensywny trening. Wobec tego stosowanie niskich temperatur zdaje się być skuteczną i bezpieczną metodą regeneracji biologicznej sportowców. Również Banfi i wsp. odnotowali korzystne skutki ogólnoustrojowej kriostymulacji u profesjonalnych zawodników rugby [23]. Otrzymane przez autorów wyniki wskazują na zmniejszenie aktywności enzymów, obecnych w mięśniach poprzecznie prążkowanych takich jak kinaza kreatynowa (CK) czy dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oraz stężenia cytokin prozapalnych przy jednoczesnym wzroście stężenia cytokin przeciwzapalnych. Ponadto Roberts i wsp. [4] zaobserwowali, że kąpiel w zimnej wodzie znacznie zmniejsza stężenie mioglobiny w surowicy krwi po wysiłku fizycznym. Uzyskane przez autorów wyniki dowodzą, że zanurzenie w zimnej wodzie zmniejsza uszkodzenia tkanki mięśniowej.

Oceny wpływu powysiłkowej kąpiele w zimnej wodzie na aktywność enzymów lizosomalnych oraz funkcjonowanie układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego dokonali Sutkowy i wsp. [19]. Autorzy zaobserwowali, że zarówno odpoczynek w temperaturze pokojowej, jak i kąpiel w zimnej wodzie nie wywierają istotnego wpływu na aktywność enzymów lizosomalnych w surowicy krwi oraz równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną. Badania te zostały przeprowadzone na grupie piłkarzy, którzy biorą regularny udział w treningach, zatem u tych osób można zaobserwować wzrost aktywności układu antyoksydacyjnego. Fakt ten zdaje się również wyjaśniać różnicę pomiędzy wynikami uzyskanymi przez autorów a wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Obecnie, w celu złagodzenia niekorzystnych skutków uszkodzeń mięśni wywołanych wysiłkiem fizycznym u sportowców, stosuje się wiele różnych zabiegów, takich jak: powysiłkowe masaże, kąpiele w zimnej wodzie, ogólnoustrojową kriostymulację lub ekspozycję na ciepło. Zabiegi oparte na zanurzeniu w zimnej wodzie (o temp. 4°C do 16°C) lub stosowanie aparatury chłodzącej (lodowe kamizelki, zimne ręczniki lub okłady z lodu) są najnowszymi i najczęściej stosowanymi metodami regeneracyjnymi. Głównym korzystnym wpływem niskiej temperatury jest zwężenie naczyń krwionośnych i obniżenie ich przepuszczalności, a także ograniczenie rozwoju procesów zapalnych [24]. Wykazano,

regularnie kąpiele w zimnej wodzie w zimie i mężczyźni, którzy nie kąpielili w zimie. Uczestnicy nie wykonywali żadnego wysiłku fizycznego przed ekspozycją na zmiany temperatury. Autorzy nie odnotowali istotnych zmian w aktywności AAT i aktywności wybranych enzymów lizosomalnych po kąpiele w zimnej wodzie. Wyniki te mogą sugerować, że krótkotrwałe kąpiele w zimnej wodzie są bezpieczne dla błon lizosomalnych. Woźniak i wsp. [6] wykazali z kolei, że ekspozycja na działanie skrajnie niskich temperatur stabilizuje błony lizosomalne i przyczynia się do redukcji uszkodzeń mięśni, powstających po intensywnym wysiłku fizycznym. W kolejnej pracy Woźniak i wsp. [22] badali wpływ kriostymulacji na enzymy lizosomalne i biomarkery stresu oksydacyjnego u wioślarzy. Autorzy zauważyli, że kriostymulacja może zmniejszyć ryzyko powstawania stresu oksydacyjnego oraz zminimalizować zakres uszkodzeń mięśni wywołanych przez intensywny trening. Wobec tego stosowanie niskich temperatur zdaje się być skuteczną i bezpieczną metodą regeneracji biologicznej sportowców. Również Banfi i wsp. odnotowali korzystne skutki ogólnoustrojowej kriostymulacji u profesjonalnych zawodników rugby [23]. Otrzymane przez autorów wyniki wskazują na zmniejszenie aktywności enzymów, obecnych w mięśniach poprzecznie prążkowanych takich jak kinaza kreatynowa (CK) czy dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oraz stężenia cytokin prozapalnych przy jednoczesnym wzroście stężenia cytokin przeciwzapalnych. Ponadto Roberts i wsp. [4] zaobserwowali, że kąpiel w zimnej wodzie znacznie zmniejsza stężenie mioglobiny w surowicy krwi po wysiłku fizycznym. Uzyskane przez autorów wyniki dowodzą, że zanurzenie w zimnej wodzie zmniejsza uszkodzenia tkanki mięśniowej.

Sutkowy et al. [19] ocenił wpływ kąpiele w zimnej wodzie na aktywność enzymów lizosomalnych i funkcję układu oksydacyjno-antyoksydacyjnego. Autorzy zaobserwowali, że zarówno odpoczynek w temperaturze pokojowej, jak i kąpiel w zimnej wodzie nie wywierają istotnego wpływu na aktywność enzymów lizosomalnych w surowicy krwi oraz równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną. Badania te zostały przeprowadzone na grupie piłkarzy, którzy biorą regularny udział w treningach, zatem u tych osób można zaobserwować wzrost aktywności układu antyoksydacyjnego. Fakt ten zdaje się również wyjaśniać różnicę pomiędzy wynikami uzyskanymi przez autorów a wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Obecnie, w celu złagodzenia niekorzystnych skutków uszkodzeń mięśni wywołanych wysiłkiem fizycznym u sportowców, stosuje się wiele różnych zabiegów, takich jak: powysiłkowe masaże, kąpiele w zimnej wodzie, ogólnoustrojową kriostymulację lub ekspozycję na ciepło. Zabiegi oparte na zanurzeniu w zimnej wodzie (o temp. 4°C do 16°C) lub stosowanie aparatury chłodzącej (lodowe kamizelki, zimne ręczniki lub okłady z lodu) są najnowszymi i najczęściej stosowanymi metodami regeneracyjnymi. Głównym korzystnym wpływem niskiej temperatury jest zwężenie naczyń krwionośnych i obniżenie ich przepuszczalności, a także ograniczenie rozwoju procesów zapalnych [24]. Wykazano,

regularnie kąpiele w zimnej wodzie w zimie i mężczyźni, którzy nie kąpielili w zimie. Uczestnicy nie wykonywali żadnego wysiłku fizycznego przed ekspozycją na zmiany temperatury. Autorzy nie odnotowali istotnych zmian w aktywności AAT i aktywności wybranych enzymów lizosomalnych po kąpiele w zimnej wodzie. Wyniki te mogą sugerować, że krótkotrwałe kąpiele w zimnej wodzie są bezpieczne dla błon lizosomalnych. Woźniak i wsp. [6] wykazali z kolei, że ekspozycja na działanie skrajnie niskich temperatur stabilizuje błony lizosomalne i przyczynia się do redukcji uszkodzeń mięśni, powstających po intensywnym wysiłku fizycznym. W kolejnej pracy Woźniak i wsp. [22] badali wpływ kriostymulacji na enzymy lizosomalne i biomarkery stresu oksydacyjnego u wioślarzy. Autorzy zauważyli, że kriostymulacja może zmniejszyć ryzyko powstawania stresu oksydacyjnego oraz zminimalizować zakres uszkodzeń mięśni wywołanych przez intensywny trening. Wobec tego stosowanie niskich temperatur zdaje się być skuteczną i bezpieczną metodą regeneracji biologicznej sportowców. Również Banfi i wsp. odnotowali korzystne skutki ogólnoustrojowej kriostymulacji u profesjonalnych zawodników rugby [23]. Otrzymane przez autorów wyniki wskazują na zmniejszenie aktywności enzymów, obecnych w mięśniach poprzecznie prążkowanych takich jak kinaza kreatynowa (CK) czy dehydrogenaza mleczanowa (LDH) oraz stężenia cytokin prozapalnych przy jednoczesnym wzroście stężenia cytokin przeciwzapalnych. Ponadto Roberts i wsp. [4] zaobserwowali, że kąpiel w zimnej wodzie znacznie zmniejsza stężenie mioglobiny w surowicy krwi po wysiłku fizycznym. Uzyskane przez autorów wyniki dowodzą, że zanurzenie w zimnej wodzie zmniejsza uszkodzenia tkanki mięśniowej.

że stosowanie 20-minutowych okładów z lodu zmniejsza obrzęki towarzyszące uszkodzeniu tkanek, a także łagodzi odczuwanie bólu mięśni [25].

Dotychczas opublikowane wyniki wskazują, że stosowanie powysiłkowej ekspozycji na działanie niskich temperatur jest bezpieczną i stosunkowo taną metodą regeneracji organizmu. Kąpiele w zimnej wodzie i okłady z lodu przeciwdziałają negatywnym skutkom przeciążeń treningowych oraz wspomagają leczenie kontuzji powstałych podczas treningów fizycznych. Przedstawione w pracy wyniki potwierdzają, że intensywny wysiłek fizyczny powoduje wzrost aktywności enzymów lizosomalnych we krwi zdrowych mężczyzn. Natomiast kąpiel w zimnej wodzie wpływa na zwiększenie stabilności błon lizosomalnych, co może wpływać na redukcję uszkodzeń mięśni związanych z aktywnością hydrolaz lizosomalnych powstałych po intensywnym wysiłku fizycznym. Są to jednak badania wstępne i postawienie jednoznacznych wniosków dotyczących możliwych korzystnych efektów działania niskich temperatur jako zabiegów regeneracyjnych po intensywnym wysiłku fizycznym wymaga kontynuacji badań.

Wnioski

1. Intensywny wysiłek fizyczny skutkuje wzrostem aktywności enzymów lizosomalnych we krwi.
2. Kąpiel w zimnej wodzie zastosowana po wysiłku fizycznym zwiększa stabilność błon lizosomalnych, co może skutkować zmniejszeniem powysiłkowych uszkodzeń mięśni.

training. The results presented in this paper confirm the statement that intense physical exercise results in increased activity of lysosomal enzymes in healthy males' blood. Hot water bath, in turn, improves the stability of lysosomal membranes, which fosters reduction of muscle damage due to lysosomal hydrolase activity after intense physical exercise. This is, however, a preliminary research and drawing unanimous conclusions about a potential favorable effect of low temperatures in regenerative procedures after intense physical exercise requires further studies.

Conclusions

1. Intense physical exercise results in increased activity of lysosomal enzymes in blood.
2. Hot water bath after physical exercise improves the stability of lysosomal membranes which can result in reduction of post-exercise muscle damage.

Piśmiennictwo / References

1. Lombardi G, Ricci C, Banfi G. Effects of winter swimming on hematological parameters. *BiochemiaMedica* 2011; 21 (1): 71-8.
2. Wilcock IM, Cronin JB, Hing WA. Physiological response to water immersion. A method for sport recovery? *Sports Med* 2006; 36 (9): 747-65.
3. Ihsan M, Watson G, Abbiss CR. What are the Physiological Mechanisms for Post-Exercise Cold Water Immersion in the Recovery from Prolonged Endurance and Intermittent Exercise? *Sports Med* 2016; 46 (8): 1095-109.
4. Roberts LA, Nosaka K, Coombes JS, Peake JM. Cold water immersion enhances recovery of submaximal muscle function after resistance exercise. *Am J PhysiolRegulIntegrCompPhysiol* 2014; 307 (8): 998-1008.
5. White GE, Wells GD. Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery and from high-intensity exercise. *ExtremPhysiol Med* 2013; 2: 26-36.
6. Woźniak A, Woźniak B, Drewa G, Mila-Kierzenkowska C, Rakowski A. The effect of whole-body cryostimulation on lysosomal enzyme activity in kayakers during training. *Eur J ApplPhysiol* 2007; 100: 137-42.
7. Kłoska A, Tyłki-Szymańska A, Węgrzyn A. Lizosomalne choroby spichrzeniowe – ogólna charakterystyka. *Post Bioch* 2011; 57 (2): 128-32.
8. Sutkowy P, Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C, Jurecka A. The activity of lysosomal enzymes in the healthy men's blood after single Finnish sauna procedure – preliminary study. *Med BiolSci* 2012; 26 (3): 33-8.
9. Mila-Kierzenkowska C, Woźniak A, Boraczyński T, Jurecka A, Augustyńska B, Woźniak B. The effect of whole-body cryostimulation on the activity of lysosomal enzymes in kayaker women after intense exercise. *J ThermBiol* 2011; 36: 29-33.
10. Krawczyński J. Diagnostyka enzymologiczna w medycynie praktycznej. *Metodyka badań*. Warszawa: PZWL; 1974.
11. Szczeklik E (red.). *Enzymologia kliniczna*. Warszawa: PZWL; 1974.
12. Błeszyński W, Działoszyński LM. Purification of soluble arylsulphatase from ox brain. *Biochem J* 1965; 97: 360-4.
13. Colowick SP, Kaplan NC (reds.). *Methods in enzymology*. Vol. 2 New York: Academic Press; 1955.
14. Drewa G, Maciak R, Woźniak A i wsp. Influence of exercise on arylsulphatase and acid phosphatase activities in blond serum of kayakers and rowers. *Biol Sport* 2000; 17: 289-97.
15. Mila-Kierzenkowska C, Woźniak A, Szpinda M i wsp. Effects of thermal stress on the activity of selected lysosomal enzymes in blood of experienced and novice winter swimmers. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 72: 635-41.
16. Pilström L, Vihko V, Astrom E, Arstila AU. Activity of acid hydrolases in skeletal muscle of untrained, trained and detrained mice of different ages. *ActaPhysiolScand* 1978; 104: 217-24.
17. Fehr HG, Lotzerich H, Michna H. Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. *Eur J ApplPhysiol* 1989; 58: 613-7.
18. Apor P, Rádi A. Physical exercise, oxidative stress and damage. *OrvHetil*. 2006;147:1025–31.

19. Sutkowy P, Woźniak A, Boraczynski T, Boraczynski M, Mila-Kierzenkowska C. The oxidant-antioxidant equilibrium, activities of selected lysosomal enzymes and activity of acute phase protein in peripheral blood of 18-year-old football players after aerobic cycle ergometer test combined with ice-water immersion or recovery at room temperature. *Cryobiology* 2017; 74: 126-31.
20. Popławska B, Jenciauskiene S, Chorostowska-Wynimko J. Genetyczne warianty α -1 antytrypsyny – klasyfikacja i znaczenie kliniczne. *PneumonolAlergol Pol* 2013; 81: 45-54.
21. Schild M, Eichner G, Beiter T i wsp. Effects of Acute Endurance Exercise on Plasma Protein Profiles of Endurance-Trained and Untrained Individuals over Time. Available online at: URL:<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/4851935/> (access: 2017.06.02)
22. Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C, Szpinda M, Chwalbińska-Moneta J, Augustyńska B, Jurecka A. Whole-body cryostimulation and oxidative stress in rowers: the preliminary results. *Arch Med Sci* 2013; 9(2): 303–8.
23. Banfi G, Melegati G, Barassi A. Effects of the whole-body cryotherapy on NTproBNP, hsCRP and troponin I in athletes. *J Sci Med Sport* 2009; 12(6): 609-10.
24. Hauswirth C, Louis J, Bieuzen F i wsp. Effects of Whole-Body Cryotherapy vs. Far-Infrared vs. Passive Modalities on Recovery from Exercise-Induced Muscle Damage in Highly-Trained Runners. Available online at: URL:<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027749> (access: 2017.06.02).
25. Cochran DJ. Alternating hot and cold water immersion for athlete recovery: a review. *Physical Therapy in Sport* 2004; 5(1): 26-32.