

Szanowny Panie Profesorze, na wstępie chciałbym podziękować za wnikliwą analizę mojej rozprawy doktorskiej, wraz z jej merytoryczną i redakcyjną oceną. Postaram się rzetelnie odpowiedzieć na wymienione uwagi i obronić postawione hipotezy oraz uzasadnić zastosowaną metodologię badań.

Moim celem było nadać zwięzły tytuł, który będzie opisywał stawiane hipotezy oraz informował czytelnika o eksperymentalnym charakterze badań. Tytuł obejmuje zastosowany czynnik eksperymentalny – natężenie hipoksji o trzech różnych stopniach natężenia, grupę badanych -kobiety oraz mężczyzn, oraz parametry podane analizie: metaboliczne – CK, LDH, mleczan; hormony – testosteron, kortyzol, hormon wzrostu. Krew była pobierana trzykrotnie podczas stałej ekspozycji na warunki hipoksji, dlatego podmiotem tytułu jest hipoksja normobaryczna. Tytuł pracy nie obejmuje, jednakże analizowanych zdolności wysiłkowych, dlatego zgodnie z uwagą Pana Profesora tytuł mógłby brzmieć: „Wpływ hipoksji normobarycznej o różnym natężeniu na zdolności wysiłkowe oraz stężenie wybranych zmiennych biochemicznych podczas jednorazowego wysiłku oporowego u mężczyzn i kobiet.”

Rozprawa doktorska powinna charakteryzować się nowatorskim podejściem i podejmować temat, który jest nowy i mało poznany. W mojej ocenie niniejsza praca doktorska podejmuje zagadnienie, które – jak wynika z przeprowadzonego przeze mnie wnikliwego przeglądu literatury, jest mało poznane. W trakcie przygotowania pracy opublikowano jedynie 5 prac dotyczących odpowiedzi hormonalnej w warunkach hipoksji (normobarycznej i hipobarycznej) (Kon i wsp., 2010, Kon i wsp., 2012, Ho i wsp., 2014, Yan i wsp. 2016, Filopoulos i wsp., 2017) różniących się istotnie zastosowanym protokołem wysiłku oporowego. Nie ma obecnie żadnych badań obejmujących wysiłek oporowy lub proces treningowy na wysokości powyżej 4400 m (Filopoulos i wsp., 2017). Nie ma prac porównujących efekty więcej niż dwóch wysokości oraz brak jest badań z uczestnictwem kobiet dotyczących odpowiedzi hormonalnej w warunkach hipoksji. W związku z powyższym w mojej ocenie wstęp do niniejszej pracy opisuje nowatorski charakter badań oraz przedstawia aktualny, ubogi stan wiedzy dotyczący wysiłku oporowego w warunkach hipoksji.

Rozdział 1.3, który obejmuje trening w warunkach hipoksji rzeczywiście odbiega od tematu pracy własnej, jednakże przedstawia aplikacyjny charakter mojej pracy. W literaturze jest niewiele rekomendacji dotyczących treningu oporowego w warunkach hipoksji. Metodologia kilku prac z zastosowaniem procesu treningowego w warunkach hipoksji normobarycznej jest zróżnicowana i nie ma obecnie jednoznacznej odpowiedzi czy taki trening ma przewagę nad tradycyjnym treningiem oporowym. Ponadto rozdział obejmuje rycinę (1), która tłumaczy możliwe mechanizmy (analizowane w niniejszej pracy – odpowiedź

metaboliczna i hormonalna), dla których trening oporowy w środowisku hipoksji może mieć przewagę nad konwencjonalnym.

We wstępie w dwóch krótkich akapitach (str. 14) nadmieniłem o nowych, zaawansowanych eksperymentach z biopsją mięśniową, które rzucają nowe światło na zagadnienie niniejszej pracy i dobitnie pokazują, że temat jest niedostatecznie zbadany, warty uwagi i dalszych prac.

W nawiązaniu do uwag dotyczących wyboru wskaźników biochemicznych i uzasadnienia. Markery CK i LDH są to standardowe markery biochemiczne wykorzystywane w monitoringu treningu. Wzrost aktywności powyższych markerów, jest związany m.in. z wyższym obciążeniem metabolicznym, które z kolei jest pożądane w kontekście treningu ukierunkowanego na hipertrofię mięśniową o czym była mowa we wstępie. Przyznaję, że podczas tłumaczenia ryciny wystąpił błąd: „cellular swelling” powinno zostać przetłumaczone jako „obrzęk komórkowy”, błąd powtarza się również we wspomnianym akapicie.

Natężenie hipoksji było ustalane według symulowanej wysokości i odpowiednio obniżonej zawartości tlenu, która odpowiadała dostępności tlenu w warunkach wysokogórskich (3000 m - $FiO_2=14,4\%$, 4000 m - $FiO_2=12,7\%$, 5000 m - $FiO_2=11,2\%$). Rzeczywiście, nowa praca Soo i wsp. (2020), która została opublikowana po przeprowadzeniu eksperymentu pokazuje, że odpowiedź fizjologiczna na zadany wysiłek w warunkach hipoksji może się różnić w zależności od utlenowania hemoglobiny tlenem. Ustalenie natężenia hipoksji w zależności od osiąganego saturacji dostarczyłoby nowych informacji w tym zakresie, jednakże jest to trudne w realizacji ślepej próby. Ponadto problem ten dotyczy większości badań nad treningiem wysokogórskim, gdzie stosuje się hipoksję hipobaryczną. Zgadzam się, że można było w przeprowadzonych badaniach kontrolować saturację w trakcie ekspozycji w spoczynku i po wykonanej serii, dane te mogły być przydatne w interpretacji wyników.

W nawiązaniu do uwag dotyczących metodologii badań, w rozdziale 3.2 zostało napisane: „Badanie zostało przeprowadzone metodą krzyżową ze ślepą próbą (Rycina 2). Warunki w których wykonywali wysiłek oporowy były dobierane losowo. Doboru kolejności warunków testowych dla poszczególnych uczestników dokonano z wykorzystaniem generatora liczb losowych (Urbaniak i Plous, 2013).” oraz w rozdziale 3.3: „Do wytworzenia warunków hipoksji normobarycznej podczas badań posłużono się systemem klimatycznym LOS-HYP-1/3NU (Lowoxygen Systems, Niemcy).” W nawiązaniu do uwagi dotyczącej uzyskania ślepej próby, doprecyzuję, że uczestnicy badań nie widzieli ustawionej wysokości na programatorze. Ekran był zaślepiiony.

W odpowiedzi na uwagi dotyczące metod statystycznych i określenia liczebności próby: liczbę badanych określono na podstawie statystycznej analizy mocy testu (GPower 3.1). Analiza a priori wykazała, że dla zachowania akceptowalnej mocy testu ($1-\beta = 0,80$) i $\alpha = 0,05$, aby ANOVA z powtarzanymi pomiarami pozwalała na wykrycie wielkości efektu na poziomie 0,50 wymagana jest wielkość próby $n=8$ dla każdej płci.

Zastosowanie delt uważam za zasadne ponieważ takie rozwiązanie umożliwiło porównanie zmian zachodzących pod wpływem różnego stopnia natężenia hipoksji ograniczając zakłócający wpływ wyjściowych wartości badanych zmiennych.

W nawiązaniu do wyników dotyczących kortyzolu i istotnością na poziomie $p<0,07$. Zgadzam się z Recenzentem, że nie był to wynik istotny statystycznie, w odniesieniu do założeń jakie przyjąłem ($p<0,05$). Jednak wielokrotnie w pracy (zarówno w wynikach, jak i w dyskusji) zaznaczyłem ten fakt, wskazując, że był to wynik na granicy przyjętego poziomu istotności statystycznej. Wydaje się, że tendencja zmian (choć nieistotna statystycznie) warta była zauważenia w przypadku badań dotyczących hipoksji i realizowanych z udziałem kobiet, ponieważ badań takich brakuje w dotychczasowej literaturze. Wykazana przeze mnie tendencja zmian w zakresie odpowiedzi kortyzolu na hipoksję (4000 m) jest wskazówką do realizacji przyszłych badań, że w tym obszarze można spodziewać się istotnych różnic, przy przyjęciu innych założeń metodologicznych (np. większej grupy badawczej, co pozwoli na zwiększenie mocy testu statystycznego).

W nawiązaniu do wyników dotyczących zdolności wysiłkowych w ćwiczeniach oporowych u kobiet, to w przeglądzie literatury można odnaleźć badania potwierdzające, jak również zaprzeczające tezie, że faza cyklu wpływa na siłę i moc u miesiączkujących kobiet. We wspomnianych przez Pana Profesora pracach: (Gamberale i wsp., 1975, PMID: 1226506) – nie badano siły mięśniowej, wykonywano testy na ergometrze rowerowym i wykazano wyłącznie różnice w czasie reakcji ze względu na fazę cyklu; (Sarwar i wsp., 1996, PMID: 8735711) – odnotowano różnice w sile izometrycznej chwytu i mięśnia czworogłowego w połowie cyklu w porównaniu z fazą lutealną i folikularną; (Philips i wsp., 1996, PMID: 8910237) – odnotowano wyższą wartość w sile maksymalnej zginacza kciuka w fazie folikularnej w porównaniu do fazy lutealnej; (Kissow i wsp., 2022 PMID: 35471634) praca przeglądowa dotycząca występujących adaptacji treningu oporowego ze względu na fazę cyklu, nie dotyczy bezpośrednio tematu.

Wyniki badań ostatnich lat z dopracowaną metodologią przeczą tezie, aby faza cyklu istotnie wpływa na osiągnięte wyniki siłowe (Romero-Moraleda i wsp., 2019, DOI: 10.2478/hukin-2019-0061; Dasa i wsp., 2021, DOI: 10.3389/fphys.2021.600668; Michalski i wsp., 2020, DOI: 10.29089/2019.19.00092). Ostatni przegląd systematyczny (umbrella review)

Colenso-Semple i wsp. (2023; DOI: 10.3389/fspor.2023.1054542) utwierdza w przekonaniu, że brakuje twardych dowodów potwierdzających, że faza cyklu i wahania hormonów mogą wpływać na osiągnięte wyniki siłowe. Ponadto w pracy własnej nie badano bezpośrednio siły maksymalnej, celem było określenie zdolności wysiłkowych (indywidualnego obciążenia) podczas wykonywania protokołu 10 serii po 12 powtórzeń z intensywnością 70% 1RM dla przysiadu ze sztangą. Co więcej, w ostatnim artykule przeglądowym (Carmichael i wsp., 2021; DOI: 10.3390/ijerph18041667) większość prac nie potwierdziła różnic w wydolności beztlenowej czy pojemności glikolitycznej ze względu na fazę cyklu menstruacyjnego

Niekontrolowana faza cyklu menstruacyjnego jest bezdyskusyjnie dużym ograniczeniem części niniejszej pracy dotyczącej grupy kobiet. Bez względu na płeć, hormony androgenne i steroidowe podlegają dziennym wahaniom z powodu stresu, jakości snu i innych czynników, które nie podlegały kontroli. Ostatnie dwie metaanalizy (Klusmann i wsp., 2022; DOI: 10.1016/j.yfrne.2022.100998, Hamidovic i wsp., 2020; DOI: 10.3389/fendo.2020.00311) potwierdzają, że w przypadku kortyzolu wyższe stężenia obserwuje się w fazie folikularnej w porównaniu z fazą lutealną. Jednakże w pracy własnej analizie i porównaniu nie podlegał spoczynkowy poziom hormonów, a nagła reakcja fizjologiczna w następstwie silnego bodźca jakim jest wysiłek oporowy o dużej intensywności w połączeniu z warunkami hipoksji.

Wspomniana praca Nakamura i wsp. (2011) jest na ten moment jedyną, która przedstawia natychmiastową odpowiedź hormonalną na wysiłek oporowy w trakcie fazy wczesnej folikularnej i później lutealnej. Wyjściowy poziom kortyzolu w fazie folikularnej był nieistotnie o 18,5% wyższy niż w fazie lutealnej, jednakże reakcja pod wpływem wysiłku oporowego była podobna i nie wykazywała istotnych różnic między próbami.

W przypadku testosteronu, w przytoczonej przez Pana Profesora pracy (Bui i wsp., 2013), autorzy konkludują: „Wzrost stężenia testosteronu w połowie cyklu jest istotny statystycznie, chociaż nie ma znaczenia klinicznego, ponieważ zmienność z dnia na dzień jest większa i niezależna od cyklu miesięczkowego.”

W nawiązaniu do zmian hormonu wzrostu podczas cyklu menstruacyjnego w przytoczonej pracy (Hornum i wsp., 1997) uczestniczki badań podzielono na dwie grupy ze względu na poziom estradiolu. Wykazano jedynie istotne różnice jako pole geometryczne pod wynikową krzywą w następstwie wysiłku. Ponadto zastosowano wysiłek wytrzymałościowy o wysokiej intensywności, co znacznie różni się od bodźca zastosowanego w pracy własnej. Z kolei w opozycji do wspomnianych badań, w pracy Sunderland i wsp. (2011, DOI: 10.1139/h11-039) badano wpływ fazy średniej folikularnej i średniej lutealnej na odpowiedź hormonu wzrostu w następstwie 30 s maksymalnego sprintu i nie odnotowano różnic między grupami. W badaniach Jaffe i wsp. (2000, DOI: 10.1507/endocrj.47.549), autorzy nie

odnotowali istotnych różnic w stężeniu hormonu wzrostu pomiędzy fazami: wczesnej folikularnej, okołooowulacyjnej (periovulatory), lutealnej.

W mojej ocenie warto dalej prowadzić prace, które skupiają się na poznawaniu różnic w fizjologii wysiłku fizycznego kobiet, ponieważ literatura w tym zakresie jest ograniczona. Dobrze zaplanowane eksperymenty będą wymagały więcej czasu i więcej oznaczeń hormonów. Niniejsza praca i przeprowadzona dyskusja dają wartościowe informacje, które można wykorzystać w przyszłym, bardziej rozbudowanym projekcie, który będzie uwzględniał fazę cyklu menstruacyjnego i zastosuje dopracowaną metodologię w ocenie odpowiedzi hormonalnej i zdolności wysiłkowych.

Testy siły mięśniowej, zwłaszcza wykonywane na wolnych ciężarach obarczone są pewnym błędem. W przypadku kobiet nie trenujących wyczynowo, może dojść do sytuacji, że nie będą miały wystarczającej motywacji i pewności siebie, aby wykonać rzetelnie powtórzenia do odmowy. W przypadku wyników dotyczących zdolności wysiłkowych kobiet i stężenia mleczanu można było się spodziewać większej redukcji powtórzeń i wyższego stężenia mleczanu na 4000 m. W związku z otrzymanymi wynikami w dyskusji pojawił się jeden z argumentów dotyczących testu 1RM i możliwego niedoszacowania obciążenia popartego literaturą. „W badaniach Benton’a i wsp. (2013) na nietrenujących siłowo mężczyznach i kobietach, w ćwiczeniu na dolne grupy mięśniowe pierwsza próba wyznaczenia 1RM dała wynik istotnie niższy średnio o 9,1 kg w porównaniu do trzeciej próby wyłącznie w grupie kobiet”

W trakcie redagowania części pracy dotyczącej kwasu moczowego nie było badań dotyczących zmian stężenia kwasu moczowego po wysiłku oporowym realizowanym w hipoksji. W 2022 roku została opublikowana wspomniana przez Pana Profesora praca Dunnwald’a wsp., jednak jak sami badacze konkludują, nie wiadomo czy wzrost kwasu moczowego był spowodowany samym wysiłkiem oporowym czy hipoksją czy efektem obu czynników. We wspomnianym badaniu nie było grupy kontrolnej. Jedyna praca (Lou i wsp., 2016; DOI: 10.1089/ham.2013.1130), która dostarcza informacji dotyczących metabolizmu puryn w hipoksji obejmuje pasywną ekspozycję i analizę moczu. We wspomnianej pracy badacze konkludują, że wzrost purynowych produktów przemiany materii (kwasu moczowego, ksantyny i hipoksantyny) wynika z niedotlenienia, wzrost ten można wykorzystać jako wskaźnik stanu niedotlenienia.

W dyskusji w niniejszej pracy pojawił się argument, że nie wykazano spodziewanych różnic w stężeniu hormonu wzrostu w następstwie wysiłku oporowego między wysokościami ze względu na małą grupę badawczą. Recenzet uważa taki argument za bezpodstawny. W założeniach badań przyjęte zostało $\alpha = 0,05$ i moc testu $(1-\beta) = 0,80$, a liczebność badanych

wynosiła $n=8$. Gdyby liczebność próby była większa, zwiększyłaby się moc testu, a co za tym idzie zwiększyłaby się szansa na odrzucenie hipotezy zerowej na korzyść alternatywnej (wykazanie, że istnieją istotne różnice pomiędzy wysokościami lub pomiędzy punktami pomiarowymi). Ponadto należy wziąć pod uwagę pulsacyjną charakterystykę wydzielania hormonu wzrostu, która wpływa na otrzymywane wyniki. Stąd sugestia, że jedną z przyczyn braku różnic/zmian w zakresie analizowanych w mojej pracy zmiennych jest mała liczba badanych i warto wziąć to pod uwagę przy planowaniu przyszłych badań.

W nawiązaniu do fragmentu pracy dotyczącej dehydrogenazy mleczanowej, to rzeczywiście w pracy zostały zawarte błędne informacje, które zostały zaczerpnięte ze wstępu recenzowanego artykułu (IF=2,3 2022) – „*Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Responses after Different Resistance and Aerobic Exercise Protocols*”, Callegari i wsp., 2017; DOI: 10.1515/hukin-2017-0071). Była to niedawno opublikowana praca dotycząca odpowiedzi CK i LDH, stąd miałem nadzieje, że cytowane informacje zawarte w tym artykule dostarczyły nowych informacji z tego obszaru wiedzy, których niestety nie zweryfikowałem. W pracy własnej podałem oryginalne cytowanie zawarte we wspomnianej pracy. W dalszej części pracy porównałem przemiany LDH na poziomie komórkowym do zmian aktywności enzymu na poziomie ogólnoustrojowym, co przyznaje jest istotnym błędem merytorycznym.

W odpowiedzi na uwagi dotyczące części edytorskiej pracy to w pełni się zgadzam, że w ukończonej pracy doktorskiej takie błędy nie powinny mieć miejsca. W pracy naukowej nie powinien być używany żargon treningowy, dlatego prawidłowe sformułowanie powinno brzmieć: „do wyczerpania mięśniowego”. Sformułowanie zostało poprawione na str. 48 przed złożeniem pracy, jednakże niestety w dwóch miejscach pozostało niezauważone. W przypadku wspomnianego przez Pana Profesora akapitu dotyczącego zmęczenia podczas skurczu izometrycznego, źródłem rzeczywiście jest praca Millet'a i wsp. (2016, DOI: 10.1152/jappphysiol.00804.2011), której nie ma w spisie literatury.

Na zakończenie chciałbym jeszcze raz podziękować Panu Profesorowi za uwagi, które przyczyniły się do mojego rozwoju naukowego.

Z poważaniem

Jakub Foltyn