

# **Mappeeksamen IDR4000**

kandidat 513

2024-11-22

# Table of contents

<b>Introduksjon til mappetemplat og Læringsrefleksjon</b>	<b>5</b>
Forord . . . . .	5
<b>1 Assignment 1: Reliability and tools for reproducible data science</b>	<b>6</b>
<b>2 Reliabilitet</b>	<b>7</b>
2.1 Innledning . . . . .	7
2.2 Metode . . . . .	7
2.2.1 Utstyr og kalibrering . . . . .	9
2.2.2 Forberedelse av forsøksperson . . . . .	10
2.2.3 Gjennomføring av test . . . . .	10
2.2.4 Håndtering av data . . . . .	10
2.3 Resultat . . . . .	11
2.4 Diskusjon . . . . .	20
2.5 Konklusjon . . . . .	21
<b>3 Assignment 2: Regression models, predicting from data</b>	<b>22</b>
3.1 Del 1: Laktat terskler . . . . .	22
3.1.1 Introduksjon . . . . .	22
3.1.2 Metode . . . . .	23
3.1.3 Resultat . . . . .	23
3.2 Del 2: Forutsi størrelser på DNA fragmenter eller stiningene i en qPCR- kalibreringskurve . . . . .	33
3.2.1 Introduksjon . . . . .	33
3.2.2 Metode . . . . .	34
3.2.3 Resultater . . . . .	36
3.2.4 Diskusjon . . . . .	37
3.3 Del 3: Tolkning av regresjonsmodell . . . . .	38
3.3.1 Introduksjon . . . . .	38
3.3.2 Metode . . . . .	38
3.3.3 resultat . . . . .	40
3.3.4 Diskusjon . . . . .	41
<b>4 Statistical Inference</b>	<b>43</b>

<b>5</b>	<b>Assignment 3: Drawing inference from statistical models, and statistical power</b>	<b>44</b>
5.1	1. Explain the estimate, SE, t-value, and p-value from the regression models that we created previously (m1 and m2).	45
5.1.1	Estimate	45
5.1.2	Standard Error	46
5.1.3	T-verdi	46
5.1.4	P-verdi	46
5.1.5	Type 1-feil	47
5.1.6	Type 2-feil	47
5.2	2. Discuss what contributes to the different results in the two studies (m1 and m2).	48
5.3	3. Why do we use the shaded area in the lower and upper tail of the t-distribution (see figure @ref(fig:t-dist-fig)).	48
5.4	4. calculate the standard deviation of the estimate variable, and the average of the SE variable for each of the study sample sizes (8 and 40). Explain why these numbers are very similar. how can you define the Standard Error (SE) in light of these calculations?	50
5.5	5. Create a histogram (see example code below) of the p-values from each study sample-size. How do you interpret these histograms, what do they tell you about the effect of sample size on statistical power?	51
5.5.1	n=8	51
5.5.2	n=40	52
5.5.3	Statistisk styrke	52
5.6	6. Calculate the number of studies from each sample size that declare a statistical significant effect (specify a threshold, your significance level).	52
5.7	7. Using the pwr package, calculate the power of a one-sample t-test, with an effect size of 1.5/3, your specified significance level and sample sizes 8 and 40. Explain the results in the light of your simulations.	52
5.7.1	n=8	53
5.7.2	n=40	53
5.7.3	Forklaring av resultatene	53
5.8	8. With a significance level of 5%, how many studies would give you a “false positive” result if you did many repeated studies?	53
5.8.1	Hvor mange studier ville ført til “false positive”	55
<b>6</b>	<b>Assignment-4-Study-Design</b>	<b>56</b>
6.1	Introduksjon	56
6.2	Hovedfunn fra analysen	56
6.3	Styrker og svakheter ved studie-designene	57
6.4	Statistiske analyser: En kritisk vurdering	57
6.5	Anbefalinger for fremtidige studier	58

<b>7</b>	<b>Assignement-5-Study-Design</b>	<b>60</b>
7.1	Innledning . . . . .	60
7.2	Metode . . . . .	61
7.2.1	Deltakere og studieoversikt . . . . .	61
7.2.2	Studie design . . . . .	61
7.2.3	Dataanalyse og statistikk . . . . .	63
7.3	Resultat . . . . .	63
7.3.1	Hypertrofi . . . . .	63
7.3.2	Maksimal styrke . . . . .	63
7.4	Diskusjon . . . . .	63
<b>8</b>	<b>Philosophy of science</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Laboratory Report</b>	<b>69</b>
9.1	Protein ekstraksjon og analyse . . . . .	69
9.1.1	Introduksjon og bakgrunn . . . . .	69
9.2	Metode . . . . .	70
9.2.1	Homogenisering av muskelprøver . . . . .	70
9.2.2	Western blot protokoll . . . . .	72
9.2.3	Resultater . . . . .	76
<b>10</b>	<b>References</b>	<b>77</b>

# Introduksjon til mappetemplat og Læringsrefleksjon

## Forord

Ønsker å takke Daniel for god hjelp og veiledning, innlæring av Rstudio viste seg og være både svært utfordrende og frustrerende for en ung kar som ikke engang forsto seg på Excel.

Ønsker også og rette en takk til, Jens-Henrik, Anders, Sivert og Ole-Kristian for samarbeid i lab-undervisningen, med samarbeid av labrapporter og assignement 1-2. Det har vært en lærerik og morsom opplevelse.

Lenke til repository: <https://github.com/Adrianhaslum/mappeeksamen.git>

Mappeeksamen består av følgende deler:

- Rapport: “Deskriptiv statistikk, reliabilitet og validitet og verktøy for reproducerbar vitenskap”.
- Laborasjonsrapport fra molekylærlabb
- Arbeidskrav i vitenskapsteori
- Rapport: “Statistisk inferens, statistiske modeller og statistisk styrke”
- Rapport: “Studiedesign”
- Rapport: “Analyse av eksperimenter med repeterte målinger”

I templatet organiseres hver del som et kapittel.

Referanser finner du sist i dokumentet (eks. [RN2902])

# **1 Assignment 1: Reliability and tools for reproducible data science**

## 2 Reliabilitet

### 2.1 Innledning

Når vi skal utfører idrettsfysiologiske tester eller undersøkelser, uavhengig om det er for å måle utholdenhet, styrke eller andre fysiologiske prestasjonsindikatorer, er det helt essensielt at resultatene som produseres er både pålitelige og konsistente. Og det er her reliabilitet kommer inn som en sentral faktor, og omfatter graden av repeterbarhet og hvor konsistente målingene er.

Hva er reliabilitet? Reliabilitet beskriver hvor pålitelig en test eller en målemetode er når den blir brukt over gjentatte forsøk på samme populasjon eller utvalg. For å kunne trekke konklusjoner av betydning er dette en forutsetning. Når vi utfører undersøkelser i laboratorierumene tilgjengelig på høyskolen, vil små variasjoner i testforholdene, utstyr eller dagsform til test subjekt føre til differanse i test resultat. Og uten reliabel data kan slike forskjeller medføre feilaktige tolkninger.

Hopkins (2000) beskriver reliabilitet som noe helt essensielt for å kunne skille mellom faktisk endring av prestasjon, og tilfeldig variasjon under målingene. I følge Hopkins (2000), for å kunne forbedringer eller effekt av en intervensjon, må vi sikre at eventuelle endringer i testresultat reflekterer faktiske prestasjonsendringer, og ikke påført av tilfeldig feil underveis i testprotokoll.

### 2.2 Metode

For å undersøke reliabiliteten, er det hentet resultater fra 16 ulike forsøkspersoner, som utførte gjentatte V2max-makstest på ergospirometri på fysiologilaben. Det var etter planen at alle forsøkspersoner skulle gjennomføre testen totalt fire ganger, fordelt på to ulike uker, men det var kun åtte forsøkspersoner som gjennomførte alle fire testene. Før hver test ble det utført mål på forsøkspersonenes antropometri. I Table 2.1 blir det kun tatt utgangspunkt i målingene fra den første testen. Det var kun 14 av 16 forsøkspersoner som hadde baseline målinger inkludert i Table 2.1.

```
library(readxl)
library(tidyverse)
```

```
-- Attaching core tidyverse packages ----- tidyverse 2.0.0 --
v dplyr      1.1.4      v readr      2.1.5
v forcats    1.0.0      v stringr    1.5.1
v ggplot2    3.5.1      v tibble     3.2.1
v lubridate  1.9.3      v tidyr      1.3.1
v purrr      1.0.2
-- Conflicts ----- tidyverse_conflicts() --
x dplyr::filter() masks stats::filter()
x dplyr::lag()     masks stats::lag()
i Use the conflicted package (<http://conflicted.r-lib.org/>) to force all conflicts to become
```

```
library(knitr)

df_all <- read_xlsx("data/plot_data_all_gr.xlsx") %>%
  mutate(w.max = as.numeric(w.max),
         la.max = as.numeric(la.max),
         hr.max = as.numeric(hr.max),
         rer.max = as.numeric(rer.max))
```

Warning: There were 4 warnings in `mutate()`.

The first warning was:

i In argument: `w.max = as.numeric(w.max)`.

Caused by warning:

! NAs introduced by coercion

i Run `dplyr::last\_dplyr\_warnings()` to see the 3 remaining warnings.

```
baseline_df_all <- df_all %>%
  filter(timepoint == "t1") %>% # Filtrer for timepoint == t1
  select(sex, age, weight, height) %>% # Velg kolonner for tabellen
  group_by(sex) %>% # Gruppér etter kjønn
  summarise(
    N = n(), # Antall deltakere (unik for t1)
    Alder = sprintf("%.1f (%.1f)", mean(age, na.rm = TRUE), sd(age, na.rm = TRUE)),
    Vekt = sprintf("%.1f (%.1f)", mean(weight, na.rm = TRUE), sd(weight, na.rm = TRUE)),
    Stature = sprintf("%.0f (%.0f)", mean(height, na.rm = TRUE), sd(height, na.rm = TRUE)),
    .groups = "drop"
  ) %>%
  # Konverter alle kolonnene til karakter for å unngå datatypeproblemer i pivot_longer
  mutate(across(everything(), as.character)) %>%
  pivot_longer(cols = c(N, Alder, Vekt, Stature), names_to = "Variable", values_to = "Value")
  pivot_wider(names_from = sex, values_from = Value)
```



```
# Endre kolonnenavn fra k og m til Kvinne og Mann
baseline_df_all <- baseline_df_all %>%
  rename(Kvinne = k, Mann = m)

# Lag tabellen
kable(baseline_df_all, row.names = FALSE, col.names = c("", "Kvinne", "Mann"))
```

Table 2.1: Karakteristikkene på testpersonene

	Kvinne	Mann
N	3	11
Alder	23.3 (0.6)	25.9 (4.0)
Vekt	71.7 (9.9)	81.2 (11.9)
Stature	171 (8)	182 (6)

Deltakerne ble inndelt i ulike grupper, en skulle være testdeltaker (utføre testen), en skulle være testleder, resterende gruppe-medlemmer var observatører, observatører bistod testleder der det var nødvendig. De ulike rollene under testene ble rullert på mellom gruppe-medlemmene.

## 2.2.1 Utstyr og kalibrering

For å måle den metabolske responsten under testene ble det benyttet et miksekkammer fra Vyntus CPX. Volum og gass ble kalibrert før hver test, dette ble utført i henhold til produsentens retningslinjer ved bruk av utstyr. Ved differanser over 2% under kalibrering av volum, og over 0.2% ved kalibrering av gass, ble det igangsatt ny kalibrering for å komme innenfor akseptabel avvik. Om ny kalibrering fremdeles ikke var tilfredsstillende, ble det igangsatt feilsøking. Feilsøking inkluderte undersøkelse av gasskoblinger, undersøke fukt i sampleslange, eller andre relevante faktorer som kunne påvirke kalibreringen.

Det ble også målt laktatnivå ett minutt etter testens avslutning. Laktat målingene ble hentet ut ved å “stikke” pekefinger med en lansett. Laktatprøven ble så analysert ved hjelp av Biosen fra EKF Diagnostics.

Selve testen ble utført på ergometersykel fra Lode. Tilpassninger på oppsett av sykkel ble gjort til hver forsøksperson, basert på individuelle innstillinger fra første test. Dermed var det standardiserte innstillinger for hver person, slik at dette ikke skulle påvirke eventuelle avvik i testresultat. Hjerterefrekvens ble registrert ved bruk av pulsbelte fra Garmin, og var tilkoblet programvaren SentrySuite fra Vyntusen.

### 2.2.2 Forberedelse av forsøksperson

Før testene skulle utføres ble det dannet retningslinjer for både mat- og væskeinntak, søvn, trening og oppvarming. Forsøkspersonene ble oppfordret til å vedlikeholde deres normale døgnrytme i perioden testene pågikk. Forsøkspersonene ble informert at siste store måltid skulle inntas senest to timer før testens start, men det var tillat med et lavere inntak av karbohydrater inntil 30 min før test. Det ble også oppfordret at forsøkspersonene opprettholdt sitt vanlige koffeininntak, dette for å opprettholde væskebalanse, og den mulige effekten på prestasjon. Oppvarming før test var 5 min på ergometersyssel, og intensiteten økte gradvis. Oppvarmingen var tilpasset hver forsøksperson, og skulle følges ved hver test.

### 2.2.3 Gjennomføring av test

Testen startet på en bestemt watt (motstand), watt ble økt hvert minutt, frem til forsøksperson ikke lenger klarte å opprettholde minimum kadens (60rpm). Start watt, og watt økning varierte mellom forsøkspersonene, basert på deres nåværende prestasjonsnivå og treningshistorikk. Testen skulle gjennomføres sittende. Testen ble avsluttet når forsøksperson ikke lenger klarte å opprettholde 60rpm (rate/rounds per minute) eller om vedkommende reiste seg opp fra setet. Forsøksperson ble informert når økning i watt kom, hvilken watt det ble syklet på, og når det ble utført målinger. Dette var testleder sitt ansvar. Informasjon vedrørende hjerterefrekvens,  $V_{2max}$  og andre parametre, ble ikke delt til forsøksperson underveis i testen. Når intensiteten var svært høy, og det ble visuelt tydelig at forsøksperson begynte å slite, skulle testleder motivere forsøksperson til å presse seg maksimalt. Dette ble gjort for å bedre sikre at testen ble utført helt til utmattelse. Hvordan denne oppgaven ble løst varierte fra de ulike testlederne basert på deres personlighet. Testleder skulle oppføre seg på lik linje mellom hver test slik at han eller hennes motiverende evne ikke varierte fra gang til gang.

Etter testens avslutning skulle testleder spørre forsøksperson hvor de befant seg på Borgs skala (beskrivelse av anstrengelse). Forsøksperson skulle oppgi ett tall mellom 6-20 på hvor anstrengt han/hun er, hvor 6 er "hvile" og 20 er "maksimal anstrengelse". Laktatprøve ble tatt ett minutt etter testens avslutning, overført i et beger og mikset med en standardløsning, videre plasseres prøven i Biosen for måling. Testleder noterte ned varighet av testen og hvilken Watt testen ble avsluttet på.

### 2.2.4 Håndtering av data

Rådata av metabolsk respons ble målt og samlet inn ved hjelp av programvare fra Vyntus, deretter eksportert over til Excel for organisering. Varighet og sluttwatt ble målt manuelt av testleder, og dataen ble loggført i samme Excel-fil. Videre håndtering av innsamlet data, som filtrering, visualisering, og beregninger av gjennomsnitt, standardavvik og "typical error" ble gjort i programvaren Rstudio. Manglende data ble ekskludert.

## 2.3 Resultat

Under gjennomføringen av alle fire VO2max-maks-testene kunne vise til en negativ trend i forsøkspersonenes verdier for maksimal watt fra første til siste test, og dette illustreres i Figure 2.1. Det kommer også frem at spredningen er mer ekstrem fra tredje til fjerde test sammenliknet fra første til andre test. Antall forsøkspersoner som gjennomførte testene viste også en negativ trend fra første til siste fjerde test.

```
library(ggplot2)

summary_data <- df_all %>%
  group_by(timepoint) %>%
  summarise(
    mean_watt = mean(w.max, na.rm = TRUE),
    sd_watt = sd(w.max, na.rm = TRUE)
  )

ggplot(df_all, aes(x = timepoint, y = w.max)) +
  geom_boxplot(fill = "#A8DADC", color = "#457B9D", alpha = 0.9, outlier.shape = 21, outlier)
  stat_summary(fun = mean, geom = "point", color = "#1D3557", size = 4, shape = 18) + # Demp
  geom_text(data = summary_data,
            aes(x = timepoint, y = mean_watt, label = round(mean_watt, 1)),
            vjust = -1.5, color = "#1D3557", size = 4, fontface = "bold") + # Tekst i demper
  labs(
    title = "Maksimal watt per tidsperiode",
    x = "Tidspunkt",
    y = "Maksimal Watt (W)"
  ) +
  theme_minimal(base_size = 14, base_family = "sans") +
  theme(
    plot.title = element_text(face = "bold", hjust = 0.5, color = "black"),
    axis.title = element_text(face = "bold"), # Tydelige aksetitler
    axis.text = element_text(size = 12), # Større aksetekst
    panel.grid.major = element_line(color = "grey90", size = 0.5), # Diskrete gridlinjer
    panel.grid.minor = element_blank() # Fjern mindre gridlinjer
  )
```

Warning: The `size` argument of `element\_line()` is deprecated as of ggplot2 3.4.0.  
i Please use the `linewidth` argument instead.

Warning: Removed 1 row containing non-finite outside the scale range  
(`stat\_boxplot()`).

Warning: Removed 1 row containing non-finite outside the scale range  
(`stat\_summary()`).

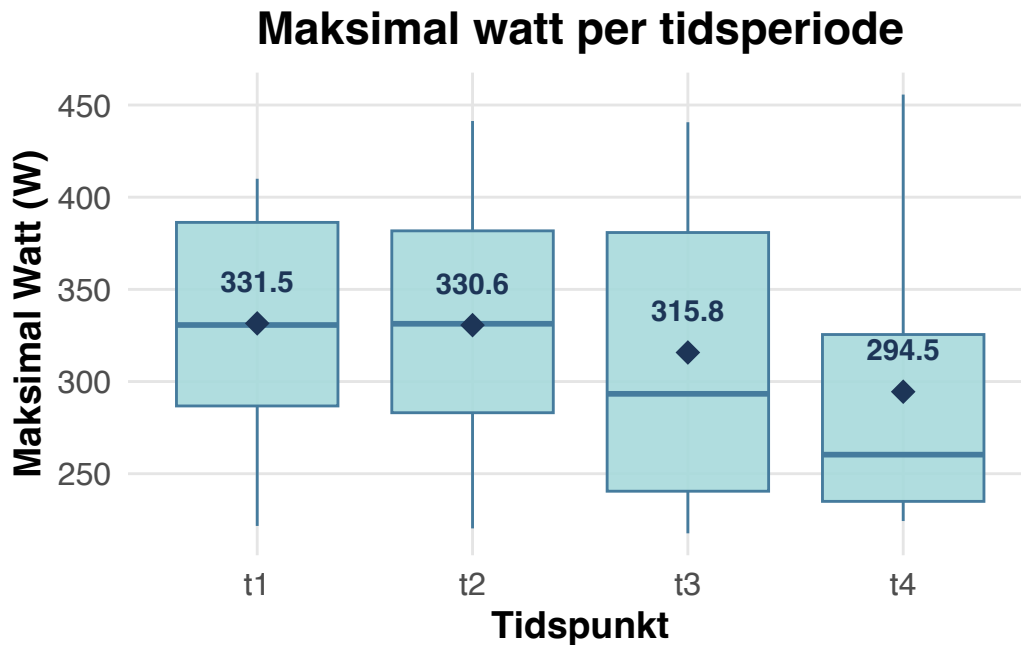


Figure 2.1: Gjennomsnittlige watt-verdier for hele gruppen for hver testforsøk.

For å kunne tolke variasjon på et individuelt nivå, ble maks watt analysert for alle forsøkspersoner, og visualiseres i Figure 2.2. Her kan vi se gjennomsnittlig watt for hvert individ, og sorteres i rekkefølgen lavest til høyest. Feilstengene representerer typiske feil, dette medvirker til visualisering av variasjon mellom ulike målinger for hver enkelt forsøksperson. Typisk feil brukes i dette tilfelle til å produsere indikasjon av forventet variasjon i oppnådd watt ved en ny test. Ved å benytte fargekoding kan det enkelt angis høy ( $CV \leq 3\%$ ), moderat ( $3\% < CV \leq 5\%$ ) eller lav ( $CV > 5\%$ ) reliabilitet (@RN130). Majoriteten av alle forsøkspersoner kunne vise til en høy reliabilitet, men ved noen tilfeller kunne det observeres både større variasjon og lavere reliabilitet på tvers av målingene. Det må presiseres at Figure 2.2 ekskluderer forsøkspersoner som ikke har fullført minimum to tester, da dette er helt essensielt for å kunne finne typisk feil.

```
library(dplyr)
library(readxl)

df_all <- read_xlsx("data/plot_data_all_gr.xlsx") %>%
  mutate(
```

```

    w.max = as.numeric(w.max),
    la.max = as.numeric(la.max),
    hr.max = as.numeric(hr.max),
    rer.max = as.numeric(rer.max)
  )

```

Warning: There were 4 warnings in `mutate()`.

The first warning was:

i In argument: `w.max = as.numeric(w.max)`.

Caused by warning:

! NAs introduced by coercion

i Run `dplyr::last\_dplyr\_warnings()` to see the 3 remaining warnings.

```

# Beregn differanser mellom tidspunkter
df_typical <- df_all %>%
  arrange(id, timepoint) %>%
  group_by(id) %>%
  mutate(
    diff_watt = w.max - lag(w.max), # Beregn differanser
    time_pair = paste(lag(timepoint), timepoint, sep = " -> ") # Parvise tidspunkter
  ) %>%
  filter(!is.na(diff_watt)) %>% # Fjern NA i differanser
  ungroup()

# Beregn typisk feil og CV basert på parvise tidsperioder
typical_error_summary <- df_typical %>%
  group_by(id) %>%
  summarise(
    mean_watt = mean(w.max, na.rm = TRUE), # Gjennomsnittlig watt
    typical_error = sd(diff_watt, na.rm = TRUE) / sqrt(2), # Typisk feil basert på differanser
    cv = (typical_error / mean_watt) * 100, # CV i prosent
    .groups = "drop"
  ) %>%
  mutate(
    typical_error = ifelse(is.na(typical_error), 0, typical_error), # Sett typisk feil til 0
    cv = ifelse(is.na(cv), 0, cv) # Sett CV til 0 hvis NA
  ) %>%
  arrange(mean_watt) %>%
  mutate(ID = factor(id, levels = id)) # Bevar sorteringsrekkefølgen

# Klassifiser reliabilitet basert på CV
typical_error_summary <- typical_error_summary %>%

```

```

mutate(reliability = case_when(
  cv <= 5 ~ "Høy Reliabilitet",          # CV 5%
  cv > 5 & cv <= 10 ~ "Moderat Reliabilitet", # CV > 5% og 10%
  cv > 10 ~ "Lav Reliabilitet"          # CV > 10%
))

# Filtrer kun deltakere med gyldige verdier
typical_error_summary <- typical_error_summary %>%
  filter(!is.na(mean_watt))

# Plottet
ggplot(typical_error_summary, aes(x = ID, y = mean_watt, color = reliability)) +
  geom_point(size = 3) +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean_watt - typical_error, ymax = mean_watt + typical_error),
    width = 0.2) +
  scale_color_manual(values = c("Høy Reliabilitet" = "#1B9E77",
    "Moderat Reliabilitet" = "#F9C74F",
    "Lav Reliabilitet" = "#E63946")) +
  labs(
    title = "Reliabilitet av maksimal watt i VO2-max-Tester",
    subtitle = "Farger viser reliabilitetsnivå basert på typisk feil ('Typical Error')",
    x = "Deltaker (Sortert etter gjennomsnittlig maksimal watt)",
    y = "Gjennomsnittlig watt (W)",
    color = "Reliabilitet"
  ) +
  theme_minimal(base_size = 14) +
  theme(
    plot.title = element_text(face = "bold", hjust = 0.5, color = "black"),
    plot.subtitle = element_text(hjust = 0.5, color = "grey30"),
    axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1)
  )

```

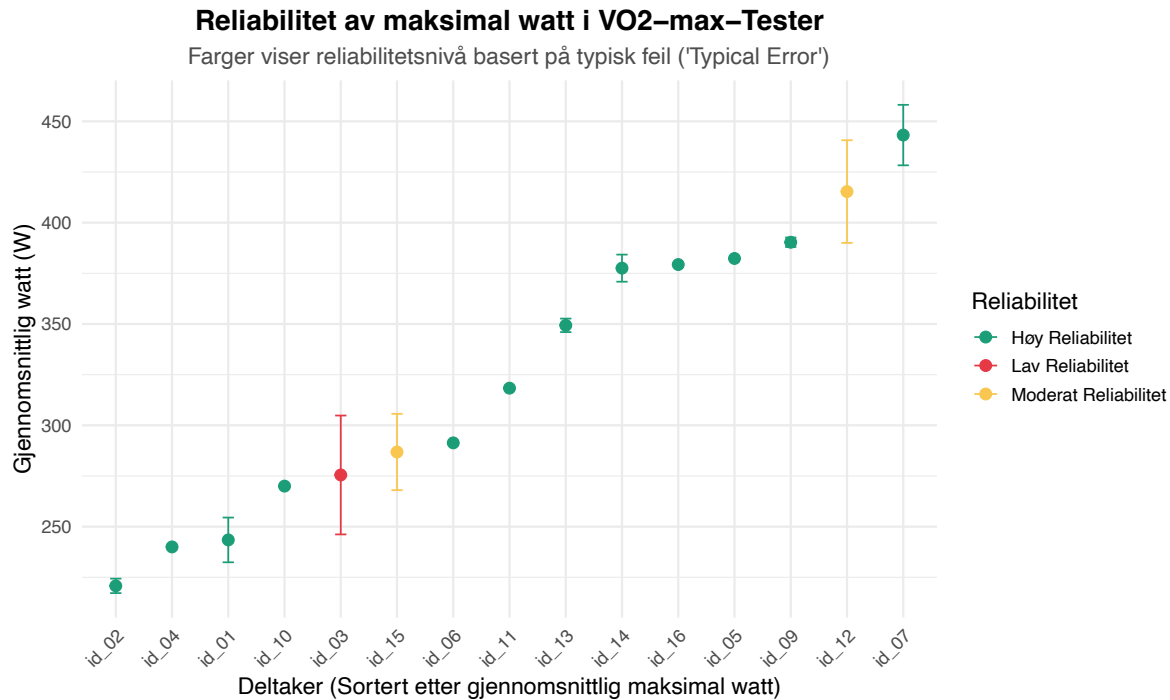


Figure 2.2: Gjennomsnittlige wattverdier med typisk feil fra alle testforsøk for samtlige testpersoner.

For å kunne få en detaljert oversikt av både typisk feil og CV for hver enkelt forsøksperson kan vi se til Table 2.2. og tabellen baseres på alle individuelle tester gjennomført. Disse sorteres etter den gjennomsnittlige watten, og fargekoding følger sortering mellom høy (grøn), moderat (gul) og lav (rød) reliabilitet.

```
library(gt)

# Beregn gjennomsnitt, typisk feil og CV for hver deltaker
summary_tf_cv <- df_all %>%
  group_by(id) %>%
  summarise(
    mean_watt = mean(w.max, na.rm = TRUE),
    typical_error = sd(w.max, na.rm = TRUE) / sqrt(2), # Typisk feil
    cv = (typical_error / mean_watt) * 100, # Typisk prosentfeil (CV)
    .groups = "drop"
  ) %>%
  mutate(
    mean_watt = round(mean_watt, 1),
    typical_error = round(typical_error, 2),
```

```

    cv = round(cv, 2)
  ) %>%
  arrange(desc(mean_watt)) # Sorter etter CV i synkende rekkefølge

summary_tf_cv %>%
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Sammenligning av typisk feil og CV",
    subtitle = "Hver rad representerer en deltaker"
  ) %>%
  cols_label(
    id = "Deltaker-ID",
    mean_watt = "Gj.snitt watt",
    typical_error = "Typisk feil",
    cv = "CV (%)"
  ) %>%
  fmt_number(
    columns = c(mean_watt, typical_error, cv),
    decimals = 2
  ) %>%
  data_color(
    columns = cv,
    colors = scales::col_bin(
      bins = c(0, 3, 5, Inf), # Definer intervallene for fargekoding
      palette = c("#1B9E77", "#F4A261", "#E63946") # Grønn, oransje, rød
    )
  ) %>%
  tab_style(
    style = cell_text(weight = "bold"),
    locations = cells_column_labels()
  ) %>%
  tab_options(
    table.font.size = "medium",
    table.border.top.style = "solid",
    table.border.bottom.style = "solid"
  )

```

Warning: Since gt v0.9.0, the `colors` argument has been deprecated.  
 \* Please use the `fn` argument instead.  
 This warning is displayed once every 8 hours.



Table 2.2: Testpersonenes typiske feil (typical error) og koeffisient av variasjon (CV).

Sammenligning av typisk feil og CV  
Hver rad representerer en deltaker

Deltaker-ID	Gj.snitt watt	Typisk feil	CV (%)
id_07	434.90	13.53	3.11
id_12	406.90	20.68	5.08
id_09	389.10	1.52	0.39
id_05	386.70	4.33	1.12
id_16	381.50	2.17	0.57
id_14	379.50	4.04	1.06
id_13	346.60	4.91	1.42
id_11	318.30	0.00	0.00
id_15	292.90	8.73	2.98
id_03	290.40	30.50	10.50
id_06	286.00	5.33	1.86
id_10	269.40	0.82	0.31
id_01	242.70	8.99	3.71
id_04	231.00	9.00	3.90
id_08	230.00	NA	NA
id_02	221.00	1.96	0.89

Det ble utført sammenligninger av målinger på to spesifikke tidspunkter i par, dette ble gjort for å kunne tolke reliabiliteten og konsistensen av målingene over en tidsperiode. Table 2.3 refererer testpar til sammenligningen denne parvise målingen. Denne analysen undersøker påfølgende tester, altså første til andre test, andre til tredje test og tredje til fjerde test. Her blir både typisk feil og koeffisient av variasjon beregnet på grunnlag av differansen mellom målingene i hvert par, dette i tråd med Hopkins et al. (2000) sine anbefalinger (@RN130, s.11).

```
library(dplyr)
library(gt)
library(readxl)

# Les inn data og filtrer for relevante variabler og målepunkter
df_filtered <- read_xlsx("data/plot_data_all_gr.xlsx") %>%
  filter(timepoint %in% c("t1", "t2", "t3", "t4")) %>%
  select(id, timepoint, w.max) %>%
  mutate(w.max = as.numeric(w.max))
```

Warning: There was 1 warning in `mutate()`.

i In argument: `w.max = as.numeric(w.max)`.

Caused by warning:

! NAs introduced by coercion

```
# Fyll inn manglende tidspunkter for hver deltaker
df_complete <- df_filtered %>%
  complete(id, timepoint, fill = list(w.max = NA)) # Fyller inn NA for manglende tidspunkter

# Beregn typisk feil og CV mellom testpar
df_pairwise <- df_complete %>%
  arrange(id, timepoint) %>%
  group_by(id) %>%
  mutate(
    diff_watt = w.max - lag(w.max), # Differanse mellom tester
    mean_watt_pair = (w.max + lag(w.max)) / 2, # Gjennomsnitt for testparet
    test_pair = paste(lag(timepoint), timepoint, sep = " -> ")
  ) %>%
  filter(!is.na(diff_watt)) %>% # Fjern rader uten gyldige verdier
  ungroup()

# Beregn typisk feil og CV på gruppenivå
summary_gruppe <- df_pairwise %>%
  group_by(test_pair) %>%
  summarise(
    typical_error = sd(diff_watt, na.rm = TRUE), # SD av differansene
    mean_cv = mean((abs(diff_watt) / mean_watt_pair) * 100, na.rm = TRUE), # Gjennomsnittlig CV
    .groups = "drop"
  )

# Lag tabell med gt
summary_gruppe %>%
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Typisk feil og koeffisient av variasjon (CV) per testpar",
    subtitle = "Kun basert på w.max for tidspunktene t1, t2, t3 og t4"
  ) %>%
  cols_label(
    test_pair = "Testpar",
    typical_error = "Typisk Feil",
    mean_cv = "Gj.snitt CV (%)"
  ) %>%
  fmt_number(
```

```

columns = everything(),
decimals = 2
) %>%
data_color(
columns = mean_cv,
colors = scales::col_bin(
  bins = c(0, 3, 5, Inf), # Definer intervallene for fargekoding
  palette = c("#1B9E77", "#F4A261", "#E63946") # Grønn, oransje, rød
)
) %>%
tab_style(
  style = cell_text(weight = "bold"),
  locations = cells_column_labels()
) %>%
tab_options(
  table.font.size = "medium",
  table.border.top.style = "solid",
  table.border.bottom.style = "solid"
) %>%
as_latex()

```

Table 2.3: Gjennomsnittlig typisk feil og CV av alle testpersonen for hvert testpar.

Typisk feil og koeffisient av variasjon (CV) per testpar

Kun basert på w.max for tidspunktene t1, t2, t3 og t4

Testpar	Typisk Feil	Gj.snitt CV (%)
t1 -> t2	12.59	2.53
t2 -> t3	29.53	5.45
t3 -> t4	8.96	4.43

Ser vi til Table 2.3 så kan vi se at testpar t1 -> t2 viser lavest CV (2,53%), og dette forteller oss at disse målingene kan vise til en høy reliabilitet. Videre ble det oppdaget høyest CV mellom t2-3 (5,45%), og viser dermed til en større variasjon og lavere reliabilitet. Som nevnt tidligere var det ikke ett likt antall forsøkspersoner i alle tester, da ikke alle gjennomførte alle fire. Dette medførte at i testpar t1 -> t2 var det 14 forsøkspersoner, 10 forsøkspersoner for t2 -> t3, og kun 6 forsøkspersoner for t3 -> t4. En slik variasjon kan bidra til å påvirke utregning av både typisk feil og CV.

## 2.4 Diskusjon

I dinne rapporten ble det undersøkt reliabiliteten ved våre målinger av VO<sub>2</sub>max-maks. Videre fokus ved rapporten var typisk feil og koeffisient av variasjon, som representerte reliabilitet. Resultatene av våre undersøkelser kunne vise til en generell høy reliabilitet, men det oppsto noe variasjon på tvers av de ulike testparene. På bakgrunn av dette kan det tenkes at reliabiliteten kan påvirkes av både fysiologiske faktorer, som “fatigue”, eller av teknologiske faktorer, som variasjon av anvendt utstyr eller av de ulike testledere.

Typisk feil viser til at variasjon kan forekomme fra flere ulike kilder. Disse kildene kan være fysiologiske, eller teknologiske (Hopkins et al., 2000) (@RN130, s.2; @RN1739). Fysiologiske faktorer som kan påvirke resultatene våres er spesielt utmattelse, ettersom VO<sub>2</sub>max-maks testene ble utført under en kortere tidsperiode. Teknologiske faktorer som kan være medvirkende er kalibrering av utstyr, og testleders evne til å anvende utstyret tilgjengelig. Med tanke på at dette var for mange av deltakernes første møte med å operere med slikt utstyr selv, som testleder, kan det ikke utelukkes at reliabiliteten kunne svekkes som resultat. Til tross for at protokoller, testforhold og oppvarming ble standardisert, kan det likevel ikke utelukkes alle faktorer til variasjon. På bakgrunn av dette vil det typisk feil et være svært nyttig verktøy, da det kan gi oss et mål av variasjonen ved gjentatte målinger. Relevant til denne rapporten ble typisk feil kalkulert som standardavviket av differansen ved utførte målinger.

Det ble benyttet denne tilnærmingen for å kunne rette fokus på variasjon på tvers av målinger, uavhengig av gjennomsnittsverdi for maks watt (@RN130, s.3). Ved å eliminere påvirkningen medført av prestasjonen til de ulike forsøkspersonene, vil en slik tilnærming medføre et mer korrekt grunnlag når vi skulle undersøke reliabiliteten på tvers av de ulike testparene.

Det er ingen tvil på at typisk feil kan være et nyttig verktøy, men det kommer også med sine begrensninger. Typisk feil vil øke med målverdien, og dette vil føre til at det blir mer utfordrende å kunne sammenlikne reliabilitet på tvers av forsøkspersonene som viser til forskjellig prestasjon. Dette kommer til syne om vi har en forsøksperson som kan vise til en høy maks watt, og vil dermed medføre en høyere absolutt typisk feil. Men på motsatt side vil en forsøksperson som viser til en lavere maks watt, vil dette medføre til en lavere absolutt typisk feil (@RN130). Dette kan derimot jobbes rundt, og kan gjøres ved å benytte CV som supplerende mål.

CV produserer et mål på variasjon i prosent av gjennomsnittet, og dette tillater oss i å kunne sammenligne reliabilitet på tvers av forsøkspersonene, forhold under testene og utstyr (@RN130, 3). Og det viste seg at dette var svært relevant for denne rapporten for å kunne tyde systematiske differanser av reliabilitet, både over tid og mellom testparene.

Variasjonen i antall forsøkspersoner og testpar viser seg å være en svakhet i denne undersøkelsen, og det kan ha medført mindre presisjon av utregning i typisk feil og CV. I tillegg til dette vil biologisk faktor som prestasjonsevne og “readiness” (dagsform), og tekniske faktorer som testleders fremgangsmetode eller kalibrering av utstyr, være bidragsytende til variasjon.

Til tross for at det er flere faktorer som er sentrale, og kunne påvirket reliabiliteten til testene, så vil den innførte standardiseringen medvirke til å minimere for påvirkelsen av eksterne faktorer. Og ved å benytte både CV og typisk feil, vil dette kunne være medvirkende for å kunne danne et mer nyansert bilde av variasjon i målingene.

## 2.5 Konklusjon

I denne rapporten var hensikten å undersøke reliabiliteten av egne målinger av maks watt hentet fra VO2max-maks tester ved å anvende verktøyene typisk feil og CV. Resultatene av undersøkelsen kan i stor grad vise til en høy reliabilitet, men med noe variasjon vedrørende testparene. Det kan tyde på at variasjonen kan være av innflytelse fra både biologiske eller tekniske faktorer, uten at det kan konkretiseres spesifikt nøyaktig hva. Standardisering av protokoller, oppvarming og forsøkspersons “vaner” før test, medvirket til å redusere variasjon, og en økt reproducerbarhet.

## 3 Assignment 2: Regression models, predicting from data

Denne oppgaven er delt inn tre separate deler som tar for seg konsepter innenfor analyse av data og regresjon. I del 1 kalkulerer vi laktat terskler, og ser nærmere på reliabiliteten mellom to ulike terskelnivåer. Del 2 bruker vi molekyllær data til å predikere størrelsen på DNA-fragment ved hjelp av en veileder. I del 3 skal vi se nærmere på om det finnes en lineær sammenheng mellom to valgte variabler fra datasettet `hypertrophy` i datapakken `exscidata`

### 3.1 Del 1: Laktat terskler

#### 3.1.1 Introduksjon

Laktat terskel er en variabel som er godt brukt for å forutsi prestasjon innenfor utholdenhets idretter, og brukes til å styre intensiteten av treningsøkter og evaluere trenings effekt [Machado2012; Poole2021]. Laktat terskel er den intensiteten hvor produksjon av laktat overgår kroppens kapasitet til å eliminere den. Når denne terskelen overstiges medfører det dermed til akkumulering av laktat i blodbanen (Poole2021, s.738).

Metodene for å undersøke et individs laktat terskel er det mange av, men en av de mer brukte metodene utføres ved å måle intensitet ved faste laktatnivåer i blodet, som som 2 og 4 mmol/L, og ved bidrag fra regresjonsmodeller som gir oss predikasjoner om intensiteten ved disse verdiene (Kindermann1979; RN2511). Machado et al. (2012) beskriver videre at “maximal-deviation method” kan gi oss analyser som bedre kan forklare underliggende mekanismer som virker bestemmende for prestasjonen vår [Machado2012].

Laktat terskel er en helt essensiell parameter innenfor fysiologien for å kunne tyde sammenheng av intensitet og den metabolske responsen. I denne deloppgaven skal det sammenliknes reliabilitet til 2 og 4 mmol/L. Reliabiliteten vil bli målt som typisk feil oppført i prosenten av gjennomsnittet.

### 3.1.2 Metode

Vår datainnsamling fra reliabilitetsforsøket har ikke en tilfredstillende mengde data. På bakgrunn av dette benyttes datasettet `cyclingstudy` som datagrunnlag for videre analyse. Datasettet inneholder et mangfold av anvendbare fysiologiske variabler fra en tidligere utført sykkelstudie (@sylta2016). Dette datasettet ble grunnlaget for uthentet informasjon vedrørende intensitet målt i watt og konsentrasjon av blodlaktat. Det ble tatt i bruk lineære og polynomiske modeller for å beregne to laktat terskler 2 mmol/L og 4 mmol/L, for å kunne undersøke forholdet til intensitet og akkumulering av laktat. Prediskjoner for hver modell ble tatt i bruk for å kunne undersøke wattverdi nærmest tersklene. Tredjegradspolynomiske modellen ble utvalgt for å visualisere oppnådde resultater mer detaljert.

Data filtreres for en forsøksperson (subject = 10) ved et bestemt tidspunkt i studien (pre). konsentrasjoner av laktat ved 225 til 375 watt omformeeres til et lengre format, dette for å enklere kunne visualisere og analysere resultatene. laktatnivåene analyseres slik at vi kan observere intensiteter som er nærmest 2 mmol/L og 4 mmol/L.

Resterende verdier (residuals) fra hver enkelt modell blir beregnet for å kunne vurdere modellenes egenskaper til å beskrive produsert data. Restverdiene visualiseres i Figure 3.2, for å kunne illustrere modellens avvik fra observert verdi ved ulike intensitet. Viderre ble de ulike modellene, inkludert lineær, andre-, tredje- og fjerdegradspolynomiske tilpasninger, benyttet til å sammenligne hvordan de ulike modellene forklarer sammenheng av watt og konsentrasjon av blodlaktat.

For å kunne analysere reliabiliteten til tersklene, ble typisk feil beregnet  $TE = \frac{SD_{diff}}{\sqrt{2}}$ , som prosentandel av gjennomsnittsverdi, med andre ord koeffisienten av variasjon (cv)  $CV(\%) = \frac{\text{Typical Error}}{\text{Mean}} \times 100$ .

### 3.1.3 Resultat

Figure 3.1 fremstiller sammenheng av intensitet (watt) og konsentrasjon av blodlaktat, kombinert tilpasninger som tar utgangspunkt på ulike modeller.

```
### laste ned nødvendige packages
library(tidyr)
library(tidyverse)
```

```
-- Attaching core tidyverse packages ----- tidyverse 2.0.0 --
v dplyr      1.1.4      v purrr      1.0.2
v forcats    1.0.0      v readr      2.1.5
v ggplot2    3.5.1      v stringr    1.5.1
v lubridate  1.9.3      v tibble     3.2.1
-- Conflicts ----- tidyverse_conflicts() --
```

```
x dplyr::filter() masks stats::filter()
x dplyr::lag()      masks stats::lag()
i Use the conflicted package (<http://conflicted.r-lib.org/>) to force all conflicts to become
```

```
library(ggplot2)
library(exscidata)

###laste inn data
data("cyclingstudy")

### Estimering av laktatterskelen og treningsintensiteten ved 4mmol L-1

cyclingstudy %>%
  # utvalg av nødvendige kolonner i analysen.
  select(subject, group, timepoint, lac.225:lac.375) %>%
  # Kun ein deltaker og ett tidspunkt.
  filter(timepoint == "pre", subject == 10) %>%
  # lang format ved å bruke laktatkolonnene.
  pivot_longer(names_to = "watt",
               values_to = "lactate",
               names_prefix = "lac.",
               names_transform = list(watt = as.numeric),
               cols = lac.225:lac.375) %>%
  # Plotte data, group = subject nødvendig for å sammenkoble punktene.
  ggplot(aes(watt, lactate, group = subject)) +
  geom_line(lty = 2) +
  geom_point(shape = 21, fill = "lightblue", size = 2.5) +
  # Linjer på spesifikke punktene for 2mmol og 4mmol, samt skjæringspunktet mellom linjene.
  geom_hline(yintercept = 4, color = "red") +
  geom_hline(yintercept = 2, color = "gold") +
  geom_vline(xintercept = 341.5, color = "blue") +
  geom_vline(xintercept = 308, color = "green") +
  # legge til en strak linje fra den lineære modellen.
  geom_smooth(method = "lm", se = FALSE, formula = y ~ x, color = "#e41a1c") +

  # poly(x, 2) Legger til en andregradspynomisk modell.
  geom_smooth(method = "lm", se = FALSE, formula = y ~ poly(x, 2), color = "#377eb8") +
  # poly(x, 3) Legger til en tredjegradspynomisk modell.
  geom_smooth(method = "lm", se = FALSE, formula = y ~ poly(x, 3), color = "#4daf4a") +
  # poly(x, 4) Legger til en fjerdegradspynomisk modell.
```



lineære modellenm viser større avvik på høyere wattverdi. Andregradspolynomiske modellen ligger mellom disse to ytterpunktene.

```
lactate <- cyclingstudy %>%
  # utvalg av nødvendige kolonner i analysen.
  select(subject, group, timepoint, lac.225:lac.375) %>%
  # Kun ein deltaker og ett tidspunkt.
  filter(timepoint == "pre", subject == 10) %>%
  # lang format ved å bruke laktatkolonnene.
  pivot_longer(names_to = "watt",
               values_to = "lactate",
               names_prefix = "lac.",
               names_transform = list(watt = as.numeric),
               cols = lac.225:lac.375) %>%
  # Fjerne dei ugyldige verdiene NA for å hindre feilmeldinger.
  filter(!is.na(lactate))

# Legger til en strak linje fra modellen.
m1 <- lm(lactate ~ watt, data = lactate)

# Legger til en andregradspolynomisk modell.
m2 <- lm(lactate ~ poly(watt, 2, raw = TRUE), data = lactate)

# Legger til en tredjegradspolynomisk modell.
m3 <- lm(lactate ~ poly(watt, 3, raw = TRUE), data = lactate)

# Legger til en fjerdegradspolynomisk modell.
m4 <- lm(lactate ~ poly(watt, 4, raw = TRUE), data = lactate)

# Lagre alle restverdiene som nye variabler.
lactate$resid.m1 <- resid(m1)
lactate$resid.m2 <- resid(m2)
lactate$resid.m3 <- resid(m3)
lactate$resid.m4 <- resid(m4)

lactate %>%
  # Samle all data fra modellemer.
  pivot_longer(names_to = "model",
               values_to = "residual",
               names_prefix = "resid.",
               names_transform = list(residual = as.numeric),
               cols = resid.m1:resid.m4) %>%
  # Plotte verdiene fra den observerte watten på x aksen og restverdiene på y aksen
```

```
geom_smooth(method = "lm", se = FALSE, formula = y ~ poly(x, 4), color = "#ff7f00")
```

Warning: Removed 1 row containing non-finite outside the scale range (`stat\_smooth()`).  
Removed 1 row containing non-finite outside the scale range (`stat\_smooth()`).  
Removed 1 row containing non-finite outside the scale range (`stat\_smooth()`).  
Removed 1 row containing non-finite outside the scale range (`stat\_smooth()`).

Warning: Removed 1 row containing missing values or values outside the scale range  
(`geom\_line()`).

Warning: Removed 1 row containing missing values or values outside the scale range  
(`geom\_point()`).

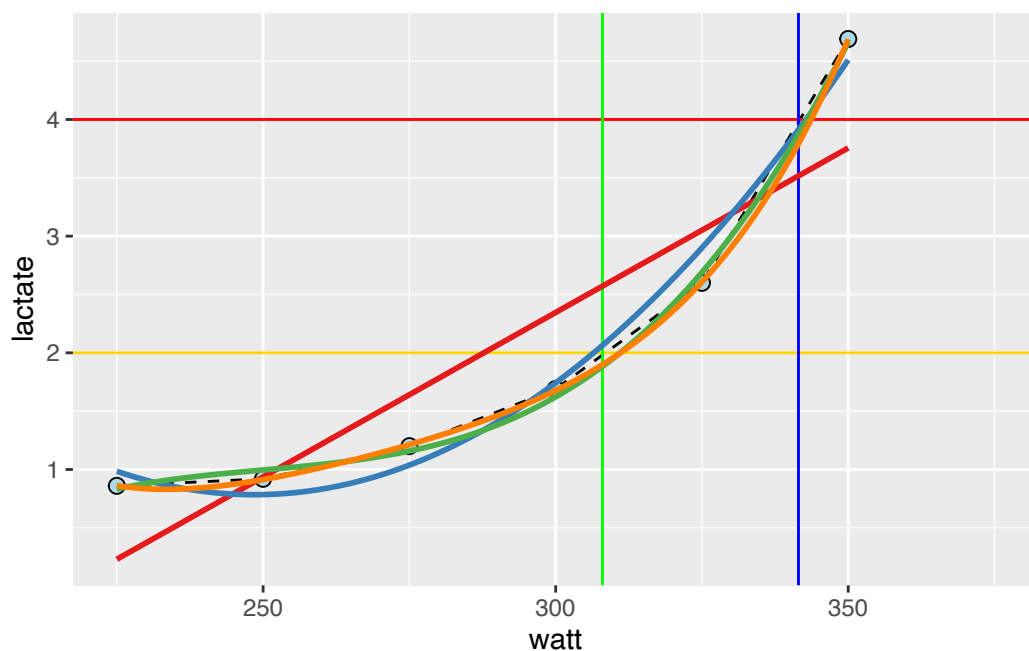


Figure 3.1: Tilpasning av ulike modeller til sammenhengen mellom treningsintensitet (watt) og blodlaktatkonsentrasjon. Grafen viser lineær modell (rød linje), andregradspolynomisk modell (blå linje), tredjegradspolynomisk modell (grønn linje), og fjerdegradspolynomisk modell (oransje linje), sammen med de observerte dataene (punkter). Tersklene ved 2 mmol/L (gul linje) og 4 mmol/L (rød linje) er indikert.

Modellene sammenliknes av hensyn til hvordan dataene beskrives, og videre observert ved restverdier (Figure 3.2). Sammen gir de tredje- og fjerdegradspolynomiske modellene de hensiktsmessige tilpassninger, spesielt nær tersklene ved 2 mmol/L og 4 mmol/L, og hvor den

```
ggplot(aes(watt, residual, fill = model)) + geom_point(shape = 21, size = 3) +  
  
# For å ha samme farger som over, bruker me scale fill manual.  
scale_fill_manual(values = c("#e41a1c", "#377eb8", "#4daf4a", "#ff7f00"))
```

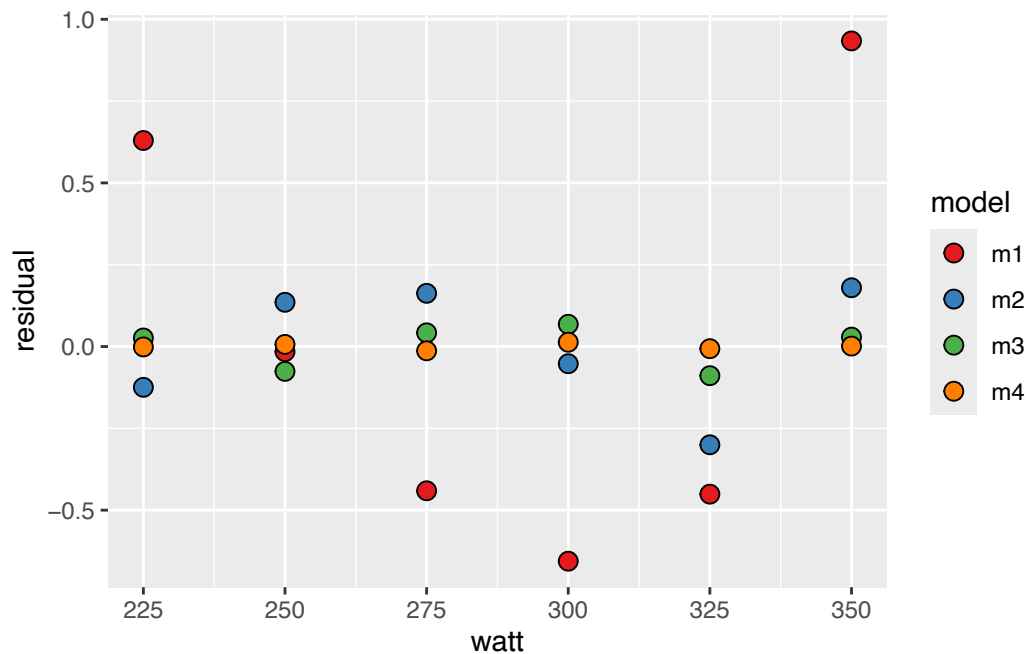


Figure 3.2: Restverdier for de ulike modellene (lineær, andregradspolynomisk, tredjegradspolynomisk og fjerdegradspolynomisk). Grafen viser hvordan modellene avviker fra de observerte verdiene over treningsintensiteter (watt), med hver modell representert av forskjellige farger.

Table 3.1 og Table 3.2 fremstiller estimert watt verdier ved begge laktatverdier, som baseres modellene. gjennomsnitt av intensitet for begge terskler er inkludert. Prediksjonene ble beregnet ved interpolasjon på tvers av observerte datapunkter for konsentrasjon av blodlaktat.

```
library(gt)  
  
# Ny dataramme for prediksjoner  
ndf <- data.frame(watt = seq(from = 225, to = 350, by = 0.1))  
  
# Prediksjoner fra modellene  
ndf$predictions_m1 <- predict(m1, newdata = ndf) # Lineær modell  
ndf$predictions_m2 <- predict(m2, newdata = ndf) # Andregradspolynomisk modell
```

```

ndf$predictions_m3 <- predict(m3, newdata = ndf) # Tredjegradspolynomisk modell
ndf$predictions_m4 <- predict(m4, newdata = ndf) # Fjerdegradspolynomisk modell

# Beregn terskel 2 mmol/L
lactate_threshold_2mmol <- data.frame(
  Model = c("m1", "m2", "m3", "m4"),
  Watt = c(
    ndf %>% filter(abs(predictions_m1 - 2) == min(abs(predictions_m1 - 2))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m2 - 2) == min(abs(predictions_m2 - 2))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m3 - 2) == min(abs(predictions_m3 - 2))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m4 - 2) == min(abs(predictions_m4 - 2))) %>% pull(watt)
  )
)

# Beregn terskel 4 mmol/L
lactate_threshold_4mmol <- data.frame(
  Model = c("m1", "m2", "m3", "m4"),
  Watt = c(
    ndf %>% filter(abs(predictions_m1 - 4) == min(abs(predictions_m1 - 4))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m2 - 4) == min(abs(predictions_m2 - 4))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m3 - 4) == min(abs(predictions_m3 - 4))) %>% pull(watt),
    ndf %>% filter(abs(predictions_m4 - 4) == min(abs(predictions_m4 - 4))) %>% pull(watt)
  )
)

# Kombiner tersklene i en tabell
lactate_thresholds <- data.frame(
  Terskel = c(rep("2 mmol/L", 4), rep("4 mmol/L", 4)),
  Modell = c(lactate_threshold_2mmol$Model, lactate_threshold_4mmol$Model),
  Watt = c(lactate_threshold_2mmol$Watt, lactate_threshold_4mmol$Watt)
)

# Beregn gjennomsnitt for hver terskel
mean_2mmol <- mean(lactate_threshold_2mmol$Watt)
mean_4mmol <- mean(lactate_threshold_4mmol$Watt)

# Opprett separate datarammer for tersklene
threshold_2mmol <- lactate_thresholds %>%
  filter(Terskel == "2 mmol/L") %>%
  bind_rows(data.frame(
    Terskel = "Gjennomsnitt",

```

```

    Modell = "Gjennomsnitt",
    Watt = mean(lactate_threshold_2mmol$Watt)
  ))

threshold_4mmol <- lactate_thresholds %>%
  filter(Terskel == "4 mmol/L") %>%
  bind_rows(data.frame(
    Terskel = "Gjennomsnitt",
    Modell = "Gjennomsnitt",
    Watt = mean(lactate_threshold_4mmol$Watt)
  ))

# Lag tabell for 2 mmol/L
table_2mmol <- threshold_2mmol %>%
  select(Modell, Watt) %>% # Fjerner overflødige kolonner
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Laktatterskel ved 2 mmol/L",
    subtitle = "Treningsintensitet per modell og gjennomsnitt"
  ) %>%
  cols_label(
    Modell = "Modell",
    Watt = "Treningsintensitet (Watt)"
  ) %>%
  fmt_number(
    columns = "Watt",
    decimals = 1
  ) %>%
  tab_style(
    style = cell_text(weight = "bold"),
    locations = cells_body(
      rows = threshold_2mmol$Modell == "Gjennomsnitt"
    )
  ) %>%
  tab_source_note(
    source_note = "Tabellen viser modellene og gjennomsnittet for terskelen ved 2 mmol/L."
  ) %>%
  as_latex()

# Vis tabellen
table_2mmol

```

Table 3.1: De estimerte treningsintensitetene ved laktatterskel 2mmol/L basert på de fire ulike modellene: lineær (m1), andregradspolynomisk (m2), tredjegradsolynomisk (m3), og fjerdegradspolynomisk (m4).

Laktatterskel ved 2 mmol/L Treningsintensitet per modell og gjennomsnitt	
Modell	Treningsintensitet (Watt)
m1	287.7
m2	306.5
m3	311.0
m4	311.1
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>304.1</b>

Tabellen viser modellene og gjennomsnittet for terskelen ved 2 mmol/L.

```
# Lag tabell for 4 mmol/L (uten duplikatkolonner)
table_4mmol <- threshold_4mmol %>%
  select(Modell, Watt) %>% # Fjerner overflødige kolonner
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Laktatterskel ved 4 mmol/L",
    subtitle = "Treningsintensitet per modell og gjennomsnitt"
  ) %>%
  cols_label(
    Modell = "Modell",
    Watt = "Treningsintensitet (Watt)"
  ) %>%
  fmt_number(
    columns = "Watt",
    decimals = 1
  ) %>%
  tab_style(
    style = cell_text(weight = "bold"),
    locations = cells_body(
      rows = threshold_4mmol$Modell == "Gjennomsnitt"
    )
  ) %>%
  tab_source_note(
    source_note = "Tabellen viser modellene og gjennomsnittet for terskelen ved 4 mmol/L."
  ) %>%
  as_latex()
```

```
# Vis tabellen
table_4mmol
```

Table 3.2: De estimerte treningsintensitetene ved laktatterksel 2mmol/L basert på de fire ulike modellene: lineær (m1), andregradspolynomisk (m2), tredjegradspolynomisk (m3), og fjerdegradspolynomisk (m4).

Laktatterskel ved 4 mmol/L	
Treningsintensitet per modell og gjennomsnitt	
Modell	Treningsintensitet (Watt)
m1	350.0
m2	342.8
m3	343.0
m4	343.7
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>344.9</b>

Tabellen viser modellene og gjennomsnittet for terskelen ved 4 mmol/L.

Estimatene utført viser noe variasjon av modellene for begge undersøkte terskler. Ved terskel 2 mmol/L ser vi en variasjon fra 287.7 watt (W) (lineær modell) til 311.1 W (fjerdegradspolynomisk), gjennomsnitt var 304.1 W. Ved 4 mmol/L ble det observert variasjon fra 342.8 W (andregradspolynomisk modell) opp til 350 W (lineær modell), gjennomsnitt var 344.9 W

Under presenteres **?@tbl-reliabilitet**, tabellen fremstiller mål på reliabiliteten ved både terskel 2 mmol/L og 4 mmol/L. Det observeres en høyere typisk feil og CV ved terskel 2 mmol/L, enn motpart 4 mmol/L. På bakgrunn av dette tyder det dermed at det er økt reliabilitet ved større terskel.

```
library(dplyr)
library(gt)

# Beregn gjennomsnitt direkte for 2 mmol/L og 4 mmol/L
mean_2mmol <- mean(lactate_threshold_2mmol$Watt)
mean_4mmol <- mean(lactate_threshold_4mmol$Watt)

# Beregn standardavviket (SD_diff) for hver terskel
sd_diff_2mmol <- sd(lactate_threshold_2mmol$Watt)
sd_diff_4mmol <- sd(lactate_threshold_4mmol$Watt)

# Beregn typisk feil (TE)
```

```

te_2mmol <- sd_diff_2mmol / sqrt(2)
te_4mmol <- sd_diff_4mmol / sqrt(2)

# Beregn koeffisient av variasjon (CV %)
cv_2mmol <- (te_2mmol / mean_2mmol) * 100
cv_4mmol <- (te_4mmol / mean_4mmol) * 100

# Kombiner alt i en dataramme
reliability_data <- data.frame(
  Terskel = c("2 mmol/L", "4 mmol/L"),
  Mean_Watt = c(mean_2mmol, mean_4mmol),
  SD_diff = c(sd_diff_2mmol, sd_diff_4mmol),
  Typical_Error = c(te_2mmol, te_4mmol),
  CV_Percent = c(cv_2mmol, cv_4mmol)
)

# Lag en tabell med gt
reliability_table <- reliability_data %>%
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Reliabilitet ved ulike terskler",
    subtitle = "Typisk feil og koeffisient av variasjon"
  ) %>%
  cols_label(
    Terskel = "Terskel (mmol/L)",
    Mean_Watt = "Gjennomsnitt (Watt)",
    SD_diff = "SD Diff (Watt)",
    Typical_Error = "Typisk Feil (Watt)",
    CV_Percent = "CV (%)"
  ) %>%
  fmt_number(
    columns = c(Mean_Watt, SD_diff, Typical_Error, CV_Percent),
    decimals = 2
  ) %>%
  tab_source_note(
    source_note = "Tabellen viser beregnet reliabilitet ved tersklene 2 mmol/L og 4 mmol/L."
  ) %>%
  as_latex()

# Vis tabellen
reliability_table

```



Table 3.3: Beregnede verdier av gjennomsnittlig treningsintensitet (watt), standardavvik for differanser (watt), typisk feil (watt), og koeffisient av variasjon (CV %), ved 2 mmol/L og 4 mmol/L

Reliabilitet ved ulike terskler  
Typisk feil og koeffisient av variasjon

Terskel (mmol/L)	Gjennomsnitt (Watt)	SD Diff (Watt)	Typisk Feil (Watt)	CV (%)
2 mmol/L	304.07	11.13	7.87	2.59
4 mmol/L	344.88	3.44	2.43	0.70

Tabellen viser beregnet reliabilitet ved tersklene 2 mmol/L og 4 mmol/L.

## 3.2 Del 2: Forutsi størrelser på DNA fragmenter eller stiningene i en qPCR-kalibreringskurve

### 3.2.1 Introduksjon

Prestasjonsevnen vår vil påvirkes av flere faktorer, for å nevne noen så kan vi trekke inn både miljø og genetiske faktorer (@Tucker555). Et gen som virker sentralt for dette er ACTN3, som koder for proteinet alpha-actinin-3. Alpha-actinin-3 observeres nærmest utelukkende i høy-terskel muskelceller, og har dermed en sentral rolle for idretter som stiller store krav til kraftutvikling. (@Mikami2014; @NORTH1996; @Schadock2015). Det må videre nevnes at genet kan muteres, og resultatet er en variasjon som ikke er funksjonell. Dette er mer pressist kjent som R577X-polymorphism (@North1999). Vi kan observere genotyper som inneholder R allelet eller Y allelet, hvor førstnevnte assosieres med gunstige forhold for å maksimal kraft eller “Rate of Force Developement” (RFD), i motsatt ende assosieres Y allelet med gunstige forhold for prestasjon i utholdenhetsidretter (@Mikami2014; @Yang2003, s.629-630).

For å kunne analysere genotypene til ACTN3-genet, benyttes det molekylære teknikker som polymerasekjedereaksjon (PCR) og elektroforese. Ved å benytte PCR er det mulig å utføre spesifikke amplifisering av DNA-sekvenser, og på denne måten kan det identifiseres genetisk variasjon (@Schadock2015). Elektroforese i agarosegel benyttes i neste steg for å kunne separere DNA-fragmentene basert på deres størrelse, og gir grunnlag for å kunne visualisere en representasjon av genotypene (@Schadock2015).

I denne delen undersøkte vi ACTN3-genet ved å utføre en DNA-analyse. DNA-analysen ble utført som en del av undervisningen i molekylærlaboratoriet. Det ble gjort av PCR og elektroforese, hvor vi forsøkte å separere, og analysere fragmentstørrelse til ACTN3-genet for å kunne kartlegge genotype i de ulike prøvene.

## 3.2.2 Metode

### 3.2.2.1 DNA-ekstrasjon

DNA ble uthentet fra blodprøver, blodprøvene ble ført over i prøverør etylendiamintetraeddiksyre (EDTA). Protokollen benyttet var en modifisert versjon som baserers på Bartlett og Stirlings protokoll (@bartlett2003, kap 6). Etter overførelsen av 3 mL blod til 15 mL rør, lyserte vi cellene med Reagens A og videre sentrifugert for å kunne isolere en cellepellet (3000 g i 5 min). Videre ble pelleten resuspendert i Reagens B, DNA ble deretter frigjort etter tilsetning av natriumperklorat (250 µL av 5 M sodium perchlorate) og inkubert på 65 °C. Prøven ble deretter nedkjølt i romtemperatur, etter nedkjøling ble det tilført iskald 2 mL kloroform for å kunne skille DNA fra andre tilstedeværende cellekomponenter. Deretter ble prøven mikset ved hjelp av rotasjon i en tidsperiode fra 30-60 min. Neste steg ble å sentrifugere prøven (2400 g i 2 min), slik at det var mulig å ekstrahere den øvre delen av prøven. DNA ble så ekstrahert med kald 100% 2-3 mL etanol, tørket og så resuspendert i 200 µL TE-buffer. Konsentrasjonen i prøvene ble målt ved å benytte et spektrofometer, verdiene lå mellom 200 og 500 ng/µL.

### 3.2.2.2 Bestemmelse av ACTN3-genotypen

ACTN3-genotypen ble bestemt ved bruk av en fire-primer PCR-protokoll tilpasset Schadock et al. (2015) (@Schadock2015). PCR-reaksjonen ble satt opp i totalvolum på 20 µL, og besto av 10 µL 2X master mix, 5 µL primermiks og 5 µL DNA-prøve. PCR-syklusen PCR-syklusen inkluderte initial denaturering ved 95 °C i 2 minutter, etterfulgt av 35 sykluser med 95 °C i 10 sekunder, og 72 °C i 45 sekunder, og til slutt ved 72 °C i 2 minutter.

### 3.2.2.3 Elektroforese for analyse av PCR-produkter

PCR produktene ble analysert ved å benytte agarseelektroforese i en 2% agarosegel. Vi fremstilte gelen ved å løse 2 g agarose i 100 mL 1X TBE-buffer, med tilsetning av 10 µL Sybr Safe for å kunne visuelt fremstille DNAet. Løsningen ble varmet opp frem til den var helt "gjennomsiktig", og deretter kjølt ned til 60 °C, etterfulgt ble den overført i støpeform med et gelkammer. Gelen stivnet etter 1 time, deretter ble den plassert i en horisontal elektroforeseenhet tilsatt med 1X TBE-buffer.

DNA-prøvene ble blandet med 6X farge (1 µL per 5 µL DNA-prøve), og 2-5 µL av hver prøve ble tilført over i egne brønner med en DNA-stige for referanse. Elektroforesen ble utført på 150 V i en time, slik at fargen kunne vandre ut på langs av gelen (ca. 80%). Gelen med prøvene ble visualisert i en G ved bruk av UV-lys og Sybr Green-instillinger.

### 3.2.2.4 Analyse av PCR-produkter med lamge J og R

For å kunne bestemme størrelsen av PCR-produktene, utførte vi en bildeanalyse ved hjelp av ImageJ Fiji. Videre inverterte, roterte og trimmet bilde, slik at vi kunne isolere prøvene og DNA-stige. For å kunne markere stigen og prøvene, ble det benyttet et rektangelverktøy, slik at intensitetsgrafen kunne registreres. Disse punktene representerte DNA-fragmentenees migrasjonsavstand, og deretter ble dataene videreført til Excel for analyse.

I R ble en kalibreringskurve laget basert på DNA-stigen (Figure 3.3), hvor logaritmen av molekylvekten ble plottet mot migrasjonsavstanden. For å kunne kalibrere ble det brukt en polynommodell for å kunne sikre bedret presisjon. Modellen ble grunnlaget for estimeringen av molekylstørrelse til de ukjente prøvene. Modellen ble vurdert basert på  $R^2$ -verdien fra lineær regresjon.

```
library(readxl)

dat <- read_excel("data/resultat_dna_analyse.xlsx")

New names:
* `` -> `...1`

# lage dataramme for å finne avstand og molekylærvekt

ladder <- data.frame(dist = c(36, 59.5, 86.5,
                             119.5, 159.5, 208.5,
                             269.5, 351.5, 396.5,
                             455.5, 521.5, 599.5, 701.5),
                    mw = c(1000, 900, 800,
                           700, 600, 500,
                           400, 300, 250,
                           200, 150, 100, 50))

# lage ny dataramme med ukjente variabler

unknown <- data.frame(dist = c(258.5, 262.5, 265.5, 335.5))

# lage en kalibreringsmodell ved hjelp av stigen

library(tidyverse)

ggplot(data = data.frame(x = c(36, 59.5, 86.5,
```

```

      119.5, 159.5, 208.5,
      269.5, 351.5, 396.5,
      455.5, 521.5, 599.5, 701.5),
  y = c(1000, 900, 800,
        700, 600, 500,
        400, 300, 250,
        200, 150, 100, 50)),
  aes(x, y)) + geom_point() +

  geom_smooth(method = "lm", formula = y ~ poly(x, 2),
             color = "green", se = FALSE)+

  scale_y_continuous(limits = c(0, 1000)) +

  scale_x_continuous(limits = c(0, 750))

```

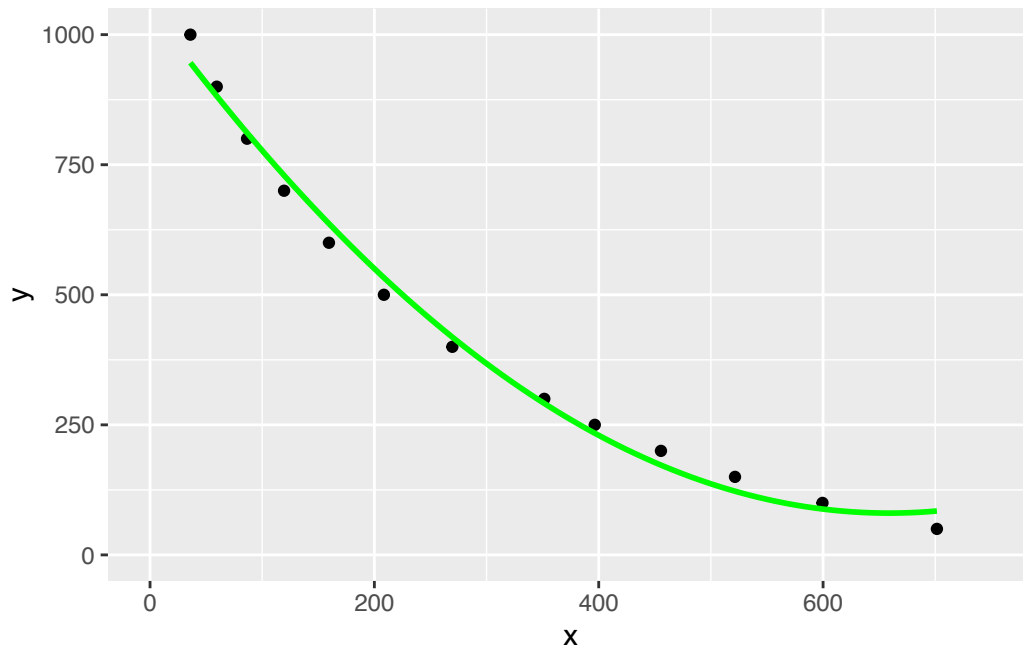


Figure 3.3: Kalibreringskurve basert på DNA-stigen.

### 3.2.3 Resultater

I analysen av PCR-produktene ble det fremstilt at DNA-fragmentene i brønn 1 (prøve 1) kunne vise til estimert båndstørrelse på 407 bp, i brønn 2 (prøve 2) viste til fragmentstørrelse

på 401bp. Over til brønn 3 (prøve 3) ble det oppdaget to fragmenter, med størrelse på 396 og 296 bp. Resultatene ble beregnet basert på kalibreringskurven som ble fremstilt ved DNA-stigen- Fragmentstørrelse viser til migrasjonsmønstre som ble observert i gelanalysen.

```
# Last inn nødvendig pakke
library(gt)

# Opprette data
resultater <- tibble(
  Brønn = c(1, 2, 3),
  `Båndstørrelse (bp)` = c("407", "401", "396, 296")
)

# Lage en tabell med gt
resultater %>%
  gt() %>%
  tab_header(
    title = "Resultater fra PCR-analyse"
  ) %>%
  cols_label(
    Brønn = "Brønn",
    `Båndstørrelse (bp)` = "Båndstørrelse (bp)"
  ) %>%
  fmt_number(
    columns = everything(),
    decimals = 0
  )
```

Table 3.4: Resultater fra PCR-analyse: Estimert båndstørrelse for DNA-fragmenter basert på agarosegelelektroforese.

Resultater fra PCR-analyse	
Brønn	Båndstørrelse (bp)
1	407
2	401
3	396, 296

### 3.2.4 Diskusjon

Denne analysen viser at ingen av DNA-fragmentene var av den forventede størrelsen 413 bp (R/R) eller 318 bp (X/X) (@Schadock2015). Fragmentstørrelsene i brønn en og 2 er rett i

nærhet av genotypen R/R, brønn 3 derimot kan indikere mot en heterozygot genotype (R/X) (@Schadock2015). Avviket oppdaget i analysen kan forklares med ulike faktorer, og inkluderer tekniske feil eller menneskelig svikt under gjennomføring av forsøket.

Tekniske feil som kan medvirke til avviket er kvalitet på gelbildet, og kan bidra til usikkerhet av målingene. Ved bilde oppløsning som ikke er tilfredsstillende, kan det bli mer utfordrende å oppdage tilstrekkelig kontrast for å kunne båndenes plassering presist.

Menneskelige feil er en essensiell faktor som kan påvirke utfall av resultat. Pipeteres det feil mengder eller unøyaktig, vil dette medvirke til variasjon i konsentrasjonen av DNA, og dette kan videre påvirke amplifiseringen. Ved elektroforesen er det essensielt å få like konsentrasjoner DNA-prøve i hver brønn. Ved variasjon i konsentrasjonen av DNA-prøve, vil dette kunne medvirke til båndenes intensitet og plassering. Vår evne til å tolke gelbildet uten digitale verktøy være medvirkende til feiltolkninger av resultat.

### 3.3 Del 3: Tolkning av regresjonsmodell

#### 3.3.1 Introduksjon

Muskulære adaptasjoner påført av trening påvirkes av individets genetikk og miljømessige faktorer. I musklene våre kan vi finne noe som kalles muskelcellekjerner (myonuclei), disse befinner seg i muskelfibre, og har en essensiell rolle for regulering av musklens proteinsyntese, og derfor også sentralt for vår evne til kraftutvikling og styrken vår. Mengden myonuclei i type-II fibre er derfor svært viktig. Disse muskelfibrene har en bedre egenskap til “Rate of Force Development” (RFD), og er ansett som gunstige for også maksimal styrke [McCardle2014, kap 22]. McCardle forteller at det er noe uklart hvor mye treningserfaring vil påvirke antallet myonuclei. Derfor skal det undersøkes om det finnes en lineær sammenheng mellom antallet myonuclei i type-II fibre og treningsalder.

#### 3.3.2 Metode

For å kunne undersøke sammenheng mellom antall myonuclei i type-II fibre og treningsalder (antall år med systematisk trening), ble variablene `FAST_NUCLEI_T1` og `TRAINING_AGE` i datasettet `hypertrofi` fra `exscidata` undersøkt. Det ble utført en lineær regresjon, tatt i betraktning at denne metoden egnes godt når vi skal undersøke en potensiell lineær relasjon mellom en avhengig variabel, og en uavhengig variabel [RN2902, s.128-129].

Første steg var å filtrere datasettet, dette ble gjort for å ekskludere observasjoner med manglende verdier. Det ble kun inkludert de relevante verdiene for påfølgende analyse. Videre ble dataene visualisert ved gjennom et scatterplott og en tilhørende regresjonslinje. Regresjonslinjen viser oss en indikasjon på hvordan variablene relateres til hverandre. Konfidensintervallet rundt linjen reflekterer usikkerhet i modellen.

```

# Laster inn nødvendige biblioteker
library(exscidata)
library(tidyverse)
library(gt)
library(broom)

# Laster inn data
data("hypertrophy")

# Filtrerer ut NA-verdier før du velger variabler
ds <- hypertrophy %>%
  filter(!is.na(TRAINING_AGE) & !is.na(FAST_NUCLEI_T1)) %>%
  select(PARTICIPANT, GROUP, TRAINING_AGE, FAST_NUCLEI_T1)

# Plotter data uten NA-verdier
ds %>%
  ggplot(aes(TRAINING_AGE, FAST_NUCLEI_T1)) +
  geom_point(size = 2, fill = "red") +
  geom_smooth(method = "lm", se = TRUE) +
  labs(
    title = "Sammenheng mellom treningserfaring og myonuklei",
    x = "Treningsår",
    y = "Myonuklei per fiber CSA i Type II") +
  theme_minimal()

```

`geom\_smooth()` using formula = 'y ~ x'

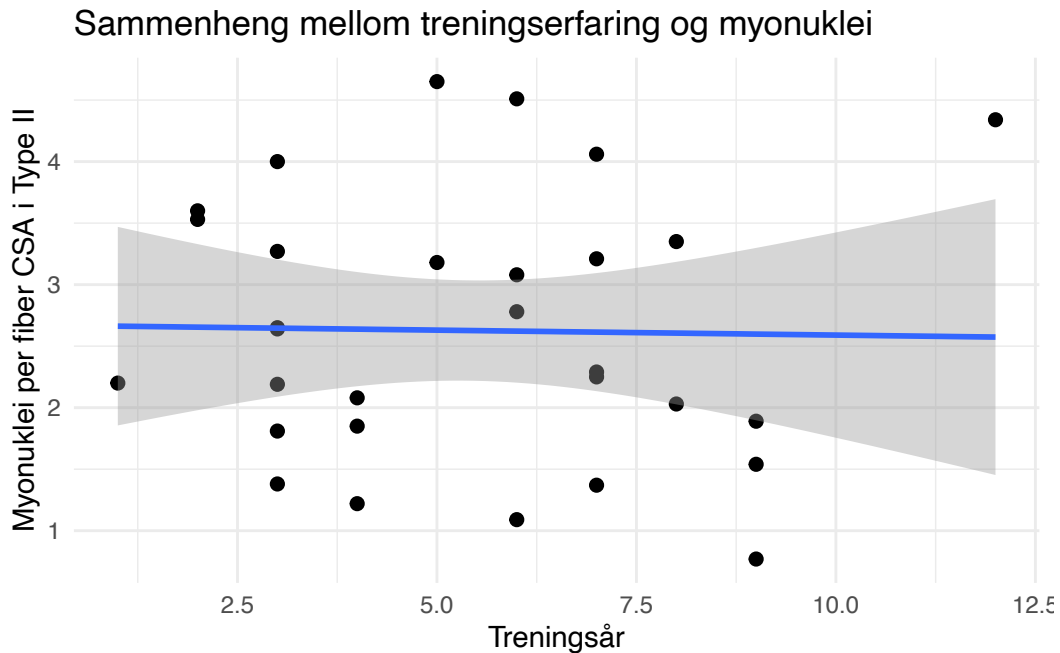


Figure 3.4: Sammenheng mellom treningsalder og myonuclei per fiber CSA i Type-II

### 3.3.3 resultat

Tabellen under oppsummerer statistiske parametre fra den lineære modellen, inklusivt estimert koeffisienten, standardfeil t-verdi og p-verdi. Denne statistiske innsikten gir oss et mer presist bilde vedrørende styrken og usikkerheten til sammenhengen av begge variabler.

```
# Lager lineær modell med ds uten NA-verdier
mod1 <- lm(FAST_NUCLEI_T1 ~ TRAINING_AGE, data = ds)

# Henter ut koeffisienter og deres statistikker
model_summary <- tidy(mod1)

# Tilpasser p-verdier og runder av, og fjerner interceptet
model_summary <- model_summary %>%
  mutate(
    term = ifelse(term == "(Intercept)", "Intercept (Konstantledd)", "Treningserfaring (år)"),
    p.value = ifelse(p.value < 0.001, "< 0.001", round(p.value, 3)),
    estimate = round(estimate, 3),
    std.error = round(std.error, 3),
    statistic = round(statistic, 3)
```



```

) %>%
# Filtrer ut interceptet
filter(term != "Intercept (Konstantledd)")
# Velger å filtrere ut intercept da det ikke er aktuelt når vi kun skal se om
# det er en lineær sammenheng mellom dei to variablene

# Lager regresjonstabell med forklarende radnavn
regression_table <- model_summary %>%
  select(term, estimate, std.error, statistic, p.value) %>%
  gt() %>%
  fmt_auto() %>%
  cols_label(
    term = "Term",
    estimate = "Estimert koeffisient",
    std.error = "Standardfeil",
    statistic = md("*t*-verdi"),
    p.value = md("*p*-verdi")
  ) %>%
  tab_source_note(
    source_note = "Notat: p-verdier mindre enn 0.05 anses som statistisk signifikante."
  )

# Vis resultatene
regression_table

```

Table 3.5: Sammenheng mellom treningserfaring og myonuklei per muskelfiber type-II

Term	Estimert koeffisient	Standardfeil	<i>t</i> -verdi	<i>p</i> -verdi
Treningserfaring (år)	-0.008	0.077	-0.104	0.918

Notat: p-verdier mindre enn 0.05 anses som statistisk signifikante.

### 3.3.4 Diskusjon

Tabellen visualiserer verdiene for estimert koeffisient, standardfeil, *t*-verdi og *p*-verdi. Den estimerte koeffisienten til treningsår viser antydninger til at FAST\_NUCLEI\_T1 reduseres med 0.008 per år. Denne nedgangen er riktig nok svak, og standardfeil er ganske stor sammenlignet med koeffisienten. Dette kan tyde på usikkerheter ved estimatet [RN2902 s.230-232]

Standardfeil viser hvor mye en estimert koeffisient kan forventes å variere mellom et ulikt utvalg av data [RN2902 s.230-232]. Til tross for at selve standardfeilen er lav i dette tilfellet,

vil forholdet mellom standardfeil og koeffisient være mest relevant for tolkningen. Det vil si at selv en lav standardfeil kan være av signifikans om koeffisienten også er liten. Det vil dermed være gunstig å være varsom med å tolke estimatet som helt presist, på bakgrunn av at det kan være koblet usikkerhet til resultatet.

T-verdien viser til hvor mange standardavvik estimert koeffisient avviker fra null. En høy t-verdi, positiv eller negativ, bidrar til å styrke argumentet for at koeffisienten er signifikant forskjell fra null [RN2902 s.275-276]. I dette tilfellet er t-verdien 0,104, og det gir indikasjon på at vi ikke har et tilfredstillende grunnlag for å kunne konkludere med en signifikant lineær korrelasjon mellom myonuclei funnet i type-II fibre og treningsalder.

P-verdien gir oss en måte for å kunne vurdere t-verdien våre har statistisk signifikans. Den viser sannsynligheten for å få en teststatistikk som er like ekstrem, eller mer, enn hva observert t-verdi viser til, men dette forutsetter at nullhypotese er korrekt [RN2902 s.264-265]. Analysen vår kunne vise til en p-verdi på 0,918. Med andre ord, det tilsier en 91,8% sannsynlighet for å observere en tilsvarende t-verdi, om det ikke skulle eksistere noen differanse på tvers av variablene. Med en slik høy p-verdi har vi dermed ingen grunnlag til å forkaste nullhypotese, og kan ikke konkludere med en signifikant effekt av treningsalder på myonuclei i type-II fibre. Videre viser dette ikke til at det er noen lineær sammenheng mellom disse variablene.

Det må påpekes at p-verdi utelukkende forteller den statistiske signifikansen, og produserer ikke noen informasjon om størrelsen av effekten, eller den praktiske betydningen [RN2902 s.285]. Når det blir tatt et grunnlag på et mindre datasett, slik som vårt tilfelle, kan det forekomme høy p-verdi til tross for en reell effekt. Dette er forårsaket at mindre utvalg ofte kan medføre lavere statistisk styrke, og gir en redusert evne til å oppdage reelle sammenhenger [RN2902 s.285].

Denne undersøkelsen har prøvd å kartlegge korrelasjon mellom treningserfaring og antall myonuclei i hver type-II fiber. Det ble ikke oppdaget en signifikant lineær korrelasjon av disse variablene. Til tross for at p-verdien viser til lav statistisk signifikans, må det understrekes at dette kan være forårsaket for lite datagrunnlag.

## 4 Statistical Inference

## 5 Assignment 3: Drawing inference from statistical models, and statistical power

```
library(tidyverse)
```

```
-- Attaching core tidyverse packages ----- tidyverse 2.0.0 --
v dplyr      1.1.4      v readr      2.1.5
v forcats    1.0.0      v stringr    1.5.1
v ggplot2    3.5.1      v tibble     3.2.1
v lubridate  1.9.3      v tidyr      1.3.1
v purrr      1.0.2
-- Conflicts ----- tidyverse_conflicts() --
x dplyr::filter() masks stats::filter()
x dplyr::lag()     masks stats::lag()
i Use the conflicted package (<http://conflicted.r-lib.org/>) to force all conflicts to become
```

```
set.seed(1)
population <- rnorm(1000000, mean = 1.5, sd = 3)

samp1 <- data.frame(y = sample(population, 8, replace = FALSE))

samp2 <- data.frame(y = sample(population, 40, replace = FALSE))

m1 <- lm(y ~ 1, data = samp1)
m2 <- lm(y ~ 1, data = samp2)

summary(m1)
```

Call:

```
lm(formula = y ~ 1, data = samp1)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-6.5322	-1.2523	-0.0883	1.3540	4.8692

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1.840	1.251	1.47	0.185

Residual standard error: 3.539 on 7 degrees of freedom

```
summary(m2)
```

Call:

```
lm(formula = y ~ 1, data = samp2)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-5.6557	-2.2883	0.2636	2.2549	6.4212

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1.5642	0.4774	3.276	0.00221 **

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3.019 on 39 degrees of freedom

## 5.1 1. Explain the estimate, SE, t-value, and p-value from the regression models that we created previously (m1 and m2).

### 5.1.1 Estimate

Estimate er alltid basert på et utvalg, og dermed kan det legges til rette for en usikkerhet. Usikkerheten som er koblet til et estimat kan som oftest kvantifiseres, dette ved å anvende hjelpemidler som Standard Error eller å beregne konfidensintervall. Estimat brukes også ofte for å representere en populasjon basert på et mindre utvalg. I denne undersøkelsen representerer gjennomsnittsverdien av forskjellen av de to ulike regresjonsmodellene (m1 og m2).

Regresjonsmodell m1 baseres et mindre utvalg ( $n=8$ ), og produserte et estimat på 1,840. Derimot gir modellen m2 ( $n=40$ ) et estimat på 1.5642. Forskjellen mellom de to ulike estimatene skyldes differansen i utvalget.

### 5.1.2 Standard Error

Standard Error (SE) er et mål på estimatet/gjennomsnittet varierer fra den egentlige populasjonsverdien, og gir et innblikk av usikkerheten eller presisjonen til et estimat. For eksempel hadde m1 et målt SE på 1.251, og vi kan derav forvente rundt 1.251 enheter i gjennomsnitts avvik fra populasjonsgjennomsnittet ved hver repetisjon av undersøkelsen. Av regresjonsmodellen m2 kan vi forvente 0.4774 enheter i avvik fra populasjonsgjennomsnittet. Ettersom m2 har en lavere spredning, vil det føre til en mindre usikkerhet til resultatene sammenliknet med m1.

### 5.1.3 T-verdi

T-verdi er en statistisk måling som brukes til å teste en hypotese opp mot en null-hypotese, og bidrar til å avgjøre om observert forskjell mellom to observasjoner skyldes tilfeldigheter eller statistisk signifikans. I følge Spiegelhalter (2019) kan t-verdien tolkes som hvor langt fra 0, målt i antall SE. Med verdier lengre fra null, er det en indikasjon at det er en forskjell mellom observasjonene.

Observasjon m1 er basert på et mindre utvalg ( $n=8$ ), dette resulterer til en lavere t-verdi (1.47), denne t-verdien er ikke langt nok unna null til å være av en statistisk signifikans. Observasjon m2 baserer seg derimot på et større utvalg, noe som gjør utslag på t-verdien (3.276). Denne t-verdien er signifikant større sammenliknet med m1,

### 5.1.4 P-verdi

P-verdien er sannsynligheten for å få en t-verdi som er like ekstrem, eller mer ekstrem som den observerte, på bakgrunn at null-hypotesen er sann (Spiegelhalter, 2019).

I observasjonene er p-verdiene henholdsvis 0.185 (m1) og 0.00221 (m2). I observasjon m1 ser vi en noe høyere p-verdi (0.185), dette tilsvarer en 18,5% sannsynlighet for å oppnå en lik t-verdi, gitt at null-hypotesen er valid, og er derfor av liten statistisk signifikans. I observasjon m2 ser vi en lavere p-verdi (0.00221), og dette utgjør en 0,221% sannsynlighet for en lik t-verdi, gitt at null-hypotesen er valid, og utgjør dermed en statistisk signifikans.

### 5.1.5 Type 1-feil

Type 1-feil er det vi kaller for falsk positiv. Dette vil si at vi konkluderer en effekt eller forskjell finnes, til tross for at den faktisk ikke gjør det. For eksempel, vi ønsker å undersøke om ett nytt type kosttilskudd forbedrer prestasjonen for langdistanse løpere. Vi har 40 deltakere som deles inn i to grupper. Gruppe 1 blir tildelt kosttilskudd, og gruppe 2 blir tildelt placebo. I post test løper gruppe 1 gjennomsnittlig 1 minutt lenger sammenliknet med gruppe 2. Vi utfører deretter en statistisk test (f.eks. t-test) for å undersøke signifikansen.

Nullhypotesen ( $H_0$ ): Kosttilskuddet har ingen effekt på utholdenheten til løperne.

Alternativ hypotesen ( $H_a$ ): Kosttilskuddet forbedrer utholdenheten til løperne.

Signifikansnivået settes til 0,05 (5%). Viser testen at p-verdien er mindre enn 0,05, avviser vi nullhypotesen, og konkluderer med at tilskuddet har en signifikant effekt på prestasjon.

Men i virkeligheten kan det være at tilskuddet i seg selv ikke har en reell effekt på prestasjon. Prestasjons forskjellen kan ha oppstått ved tilfeldigheter, genetisk variasjon mellom deltakere, dagsformen på test dag(ene), eller andre faktorer som ikke ble kontrollert nøyaktig nok i undersøkelsen. Type 1-feil oppstår dermed av at vi blir "lurt" av tilfeldige variasjoner som ikke er tatt med i betraktning.

For å motvirke type 1-feil kan vi senke signifikansnivå, men for lavt signifikansnivå vil føre til økt risiko for type 2-feil. På bakgrunn av dette, vil den mest effektive og reliable måten å begrense type 1-feil være ved å inkludere nok deltakere og utvalgsstørrelse.

### 5.1.6 Type 2-feil

Type 2-feil er det vi kaller for en falsk negativ, vi finner ingen statistisk signifikant forskjell, til tross for at det faktisk er det. Ved å benytte samme eksempel som i forklaring av type 1 feil, etter avsluttet intervensjon oppdager vi ingen statistisk signifikant forskjell på prestasjonen mellom gruppene. I realiteten hadde kosttilskuddet faktisk en reell effekt på prestasjon, uten at den ble oppdaget.

Hva kunne føre til en slik feil? Utvalg spiller en sentral rolle, med et for lavt utvalg øker risiko for å ikke observere effekter som er til stedet. Sammen med utvalgsstørrelse, vil stor variasjon av prestasjonsnivå på deltakere kunne påvirke risikoen for type 2-feil (og type-1). Ved en stor varians kan effekten fra tilskuddet bli oversett ettersom det allerede var en stor variasjon mellom deltakernes prestasjonsevne før intervensjonen.

## 5.2 2. Discuss what contributes to the different results in the two studies (m1 and m2).

I regresjonsmodellen m1 blir det brukt et lite utvalg ( $n=8$ ), og m2 ble det anvendt ett større utvalg ( $n=40$ ). Dette resulterte i en koeffisient på 1.840 (m1) og 1.5642 (m2), og dette representerer den gjennomsnittlige forskjellen mellom regresjonsmodellene. På bakgrunn av at m2 inneholdt et større utvalg, vil dette estimatet gi oss en mer korrekt gjennomsnitt for den representative populasjonen. Dette skyldes at et større utvalg produserer et mer nøyaktig gjennomsnitt. Ved et lavere utvalg vil det resultere i større variabilitet i dataene, dette vil bidra til en høyere SE. Konfidensintervallet til m1 og m2 påvirkes i stor grad av utvalget, og dermed ser vi en større statistisk signifikans i m2 sammenliknet med m1.

## 5.3 3. Why do we use the shaded area in the lower and upper tail of the t-distribution (see figure @ref(fig:t-dist-fig)).

De mørkere delene av “t-distribution” av m1 representerer regresjonsmodellens p-verdi (0.185). I senter av kurven finner vi  $t = 0$ , og dette representerer null hypotesen. Dette betyr at 18,5 % av kurven, både høyre og venstre side, viser oss sannsynligheten for å oppnå en t-verdi som like- eller mer ekstrem enn den observerte t-verdien ( $t = 1.47$ ) avhengig av at null-hypotesen er valid. Verdiene til m1 er dermed ikke statistisk signifikante, og vi kan ikke kaste null-hypotesen.

```
# Create data frames to store the model estimates
results_8 <- data.frame(estimate = rep(NA, 1000),
                        se = rep(NA, 1000),
                        pval = rep(NA, 1000),
                        n = 8)

results_40 <- data.frame(estimate = rep(NA, 1000),
                        se = rep(NA, 1000),
                        pval = rep(NA, 1000),
                        n = 40)

# A for loop used to sample 1000 studies, each iteration (i) will draw a new sample
# from the population.

for(i in 1:1000) {

  # Draw a sample
  samp1 <- data.frame(y = sample(population, 8, replace = FALSE))
  samp2 <- data.frame(y = sample(population, 40, replace = FALSE))
```



```

# Model the data
m1 <- lm(y ~ 1, data = samp1)
m2 <- lm(y ~ 1, data = samp2)

# Extract values from the models
results_8[i, 1] <- coef(summary(m1))[1, 1]
results_8[i, 2] <- coef(summary(m1))[1, 2]
results_8[i, 3] <- coef(summary(m1))[1, 4]

results_40[i, 1] <- coef(summary(m2))[1, 1]
results_40[i, 2] <- coef(summary(m2))[1, 2]
results_40[i, 3] <- coef(summary(m2))[1, 4]

}

```

```

# Save the results in a combined data frame

results <- bind_rows(results_8, results_40)

```

```

# Beregn standardavviket av estimate og gjennomsnittet av SE for n = 8
sd_estimate_8 <- sd(results_8$estimate)
mean_se_8 <- mean(results_8$se)

# Beregn standardavviket av estimate og gjennomsnittet av SE for n = 40
sd_estimate_40 <- sd(results_40$estimate)
mean_se_40 <- mean(results_40$se)

# Skriv ut resultatene
cat("For n = 8:\n")

```

For n = 8:

```

cat("Standard deviation of estimate:", sd_estimate_8, "\n")

```

Standard deviation of estimate: 1.070843

```
cat("Average SE:", mean_se_8, "\n\n")
```

Average SE: 1.021374

```
cat("For n = 40:\n")
```

For n = 40:

```
cat("Standard deviation of estimate:", sd_estimate_40, "\n")
```

Standard deviation of estimate: 0.4838475

```
cat("Average SE:", mean_se_40, "\n")
```

Average SE: 0.4696954

**5.4 4. calculate the standard deviation of the estimate variable, and the average of the SE variable for each of the study sample sizes (8 and 40). Explain why these numbers are very similar. how can you define the Standard Error (SE) in light of these calculations?**

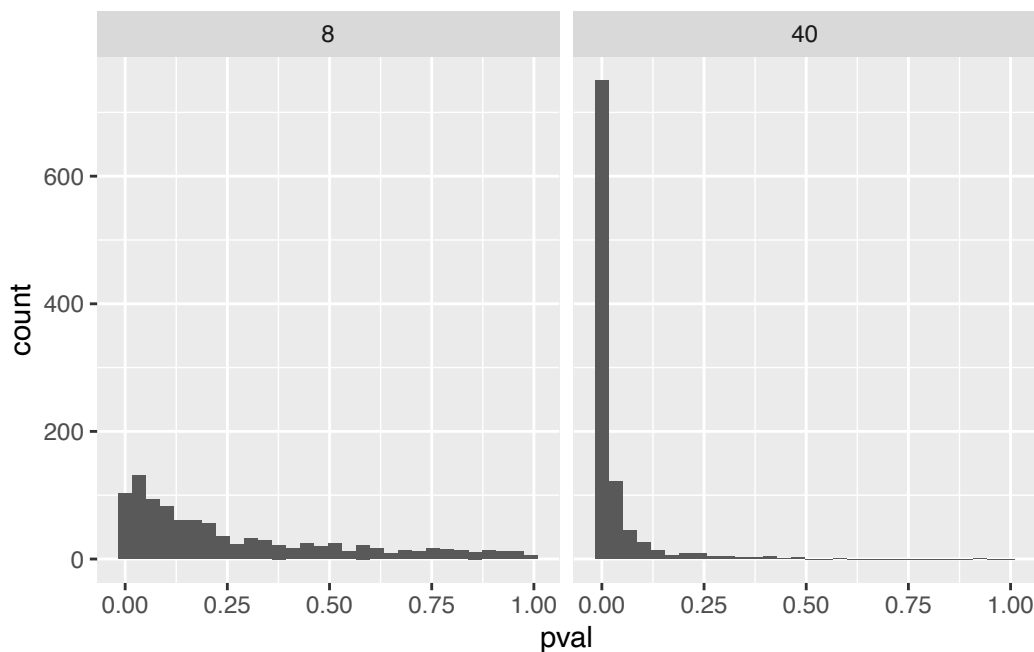
Standard avviket av estimat måler variasjonen i de ulike gjennomsnittene vi oppnår av alle de tilfeldige utvalgene. Alle 1000 studier vil generere et estimat, og standardavviket måler variasjonen av estimatene rundt populasjonsgjennomsnittet.

I observasjonene ble standardavviket av estimat og gjennomsnitt av SE ganske like. Likhetene av verdiene skyldes at standardavviket av estimat beskriver den faktiske variasjonen i de observerte gjennomsnittene, og SE er en predikasjon av denne variasjonen. Resultatene i denne observasjonene ble henholdsvis; for  $n=8$ , standardavvik av estimat: 1.068155, og gjennomsnittlig SE: 1.008706. For  $n=40$ , standardavvik av estimat: 0.4743506, og gjennomsnittlig SE: 0.4704552

## 5.5 5. Create a histogram (see example code below) of the p-values from each study sample-size. How do you interpret these histograms, what do they tell you about the effect of sample size on statistical power?

```
# A two faceted histogram can be created with ggplot2
results %>%
  ggplot(aes(pval)) +
  geom_histogram() +
  facet_wrap(~ n)
```

`stat\_bin()` using `bins = 30`. Pick better value with `binwidth`.



Ved å se på histogrammene ser vi en tydelig fordeling av p-verdiene mellom  $n=8$  og  $n=40$ .

### 5.5.1 $n=8$

Histogrammet viser mange p-verdier fordelt over et bredt spekter, og at majoriteten av p-verdiene overgår 0.05. Denne observasjonen viser at det er en utfordring å oppnå statistisk signifikante resultater med et utvalg som er mindre.

### 5.5.2 n=40

Dette histogrammet viser en større konsentrasjon av p-verdier mot 0.00, og hvor flere er under 0.05. Dette forteller oss at ved observasjoner som inkluderer et større utvalg øker sannsynligheten for å oppnå statistiske signifikante resultater.

### 5.5.3 Statistisk styrke

Statistisk styrke refererer til sannsynligheten for å kunne avvise null-hypotesen uten type-1 feil. Histogrammene i denne observasjonen viser oss ett tydelig bilde på hvordan et utvalg vil påvirke den statistiske styrken. Dette er synlig ettersom n=8 har et større andel p-verdier som overgår 0.05 sammenliknet med n=40.

## 5.6 6. Calculate the number of studies from each sample size that declare a statistical significant effect (specify a threshold , your significance level).

```
# Count the proportion of tests below a certain p-value for each
results %>%
  filter(pval < 0.05) %>%
  group_by(n) %>%
  summarise(sig_results = n()/1000)
```

```
# A tibble: 2 x 2
      n sig_results
<dbl> <dbl>
1     8      0.227
2    40      0.865
```

## 5.7 7. Using the pwr package, calculate the power of a one-sample t-test, with a effect size of 1.5/3, your specified significance level and sample sizes 8 and 40. Explain the results in the light of your simulations.

```
# Using the pwr package
library(pwr)

pwr.t.test(n = 40, sig.level = 0.05, d = 1.5/3, type = "one.sample")
```

One-sample t test power calculation

```
      n = 40
      d = 0.5
sig.level = 0.05
  power = 0.8693981
alternative = two.sided
```

### 5.7.1 n=8

power = 0.232077

### 5.7.2 n=40

power = 0.8693981

### 5.7.3 Forklaring av resultatene

I denne delen av observasjonen er det blitt beregnet statistisk power for en enveis t-test. Power i dette tilfelle refererer til sannsynligheten for å korrekt forkaste null-hypotesen når hypotesen er sann, og en høyere power utgjør en bedret sjanse for å kunne observere en reell effekt om det er forekommet. Resultatene i denne delen av observasjonen viser til en signifikant lavere power verdi ved et lavere utvalg.

## 5.8 8. With a significance level of 5%, how many studies would give you a “false positive” result if you did many repeated studies?

```

population <- rnorm(1000000, mean = 0, sd = 3)

# Create data frames to store the model estimates
results_8 <- data.frame(estimate = rep(NA, 1000),
                        se = rep(NA, 1000),
                        pval = rep(NA, 1000),
                        n = 8)

results_40 <- data.frame(estimate = rep(NA, 1000),
                        se = rep(NA, 1000),
                        pval = rep(NA, 1000),
                        n = 40)

# A for loop used to sample 1000 studies, each iteration (i) will draw a new sample
# from the population.

for(i in 1:1000) {

  # Draw a sample
  samp1 <- data.frame(y = sample(population, 8, replace = FALSE))
  samp2 <- data.frame(y = sample(population, 40, replace = FALSE))

  # Model the data
  m1 <- lm(y ~ 1, data = samp1)
  m2 <- lm(y ~ 1, data = samp2)

  # Extract values from the models
  results_8[i, 1] <- coef(summary(m1))[1, 1]
  results_8[i, 2] <- coef(summary(m1))[1, 2]
  results_8[i, 3] <- coef(summary(m1))[1, 4]

  results_40[i, 1] <- coef(summary(m2))[1, 1]
  results_40[i, 2] <- coef(summary(m2))[1, 2]
  results_40[i, 3] <- coef(summary(m2))[1, 4]

}

# Save the results in a combined data frame

```

```
results_null <- bind_rows(results_8, results_40)
```

### 5.8.1 Hvor mange studier ville ført til “false positive”

Ved et signifikansnivå på 5 % er det til å forvente at omkring 5 % av studiene gir såkalte “false positive”, og dette er uavhengig av utvalgsstørrelse. “False positive” vil her representere Type 1-feil. For observasjonene våres utvalg vil dette sannsynligvis føre til 50 “false positive” (5 % av 1000 studier).

## 6 Assignment-4-Study-Design

### 6.1 Introduksjon

Styrketrening er en bredt utbredt treningsmetode for å påvirke muskelhypertrofi. På bakgrunn av dette vil det være av stor interesse å bedre forstå hvordan ulike treningsintensiteter vil være påvirkende for både adaptasjoner til hypertrofi og muskelstyrke. Mange studier har undersøkt nærmere hvordan ulik intensitet (omtalt som høy vs. lav belastning) kan medvirke til muskulære adaptasjoner.

Denne rapporten skal undersøke styrketrening og hvilken effekt det kan påføre muskelhypertrofi og styrke, og tar utgangspunkt på et utvalg av fem ulike studier. De inkluderte studiene omfatter et bredt spekter av studiedesign, populasjoner og treningsprotokoll, samt ulike statistiske fremgangsmetoder. Disse forskjellene kan gi et godt innsikt for både muligheter og begrensninger ved metodene som brukes til å undersøke effektene av styrketrening.

### 6.2 Hovedfunn fra analysen

Til tross for variasjoner i resultatene, viser studiene flere fellestrekk. Alle benytter et randomisert kontrollert studie design (RCT). RCT er ansett som “gullstandarden” for å undersøke årsakssammenheng. Ved randomisert fordeling av forsøkspersoner i ulike grupperinger, reduserer RCT-studier risiko for systematiske feil, og bidrar dermed til mer pålitelige konklusjoner om effekten medført av treningsintensitet. De fleste studiene benytter seg også av standardiserte metoder for å måle hypertrofi, som ultralyd, CT-skann eller muskelbiopsi, i tillegg til 1RM tester for å måle endring av maksimal styrke.

Vedrørende statistiske analyser, finner vi noe variasjon mellom studiene. For eksempel benytter Grgic et al. (2021) en ANOVA-test for å sammenligne effekt av høy- og lavintensitetstrening, men Bradley et al. (2023) benytter derimot seg av t-tester og regresjonsanalyser for å undersøke sammenhengen av treningsmetoder for hypertrofi og muskelstyrke. Lasevicius et al. (2018) benytter ANCOVA, som justerer for differanser i utgangspunkt mellom de ulike gruppene. Dette bidrar til å kunne produsere en mer presis evaluering på hvordan treningsintensitet medvirker til muskulære adaptasjoner.



Til tross for noen variasjoner i metodikk og fokusretning, peker studiene mot betydningen bak intensiteten for muskulære adaptasjoner, og på samme tid fremhever at ulike analysemetoder kan avdekke nyanserte aspekter av treningsrespons.

### **6.3 Styrker og svakheter ved studie-designene**

Alle inkluderte studier benytter seg av randomiserte kontrollgrupper, noe som er ansett som “gullstandard” for å undersøke årsakssammenheng. En slik tilnærming bidrar til å styrke validitet av resultater ved å minimere bias og sikre en rettferdig fordeling av variabler mellom gruppene. Majoriteten av studiene tar forbehold om tidligere treningshistorikk, noe som bidrar til at resultatene mer spesifikt reflekterer effekten til aktuell intervensjon. Det benyttes også pålitelige og relevante målemetoder, noe som tillater å kunne sammenligne effekt av trening på hypertrofi og styrke på en systematisk måte.

Det må understrekes at det er enkelte begrensninger som burde bli tatt i betraktning. Flere av studiene baseres på mindre utvalgsstørrelser, og dette kan dekke over statistisk styrke, og gjøre det mer utfordrende å trekke generelle konklusjoner. For eksempel har Grgic et al. (2021) kun et utvalg av 30 forsøkspersoner, og dette bidrar til økt risiko for tilfeldig feil, og kan redusere påliteligheten av resultatene. I tillegg er treningsintervensjonene ofte korte (8-12 uker), som gir begrenset innsikt i langvarige effekter ved styrketrening på muskulære adaptasjoner. For å kunne fortelle noe om varige resultater, vil studier som strekker seg over lengre tidsperioder vært av stor verdi.

En annen utfordring er forsøkspersonenes treningsbakgrunn. Flere av de inkluderte studiene viser til forsøkspersoner med treningsbakgrunn. Dette kan være med på å gi verdifull informasjon på allerede trente personer, men kan medvirke til utfordringer til å kunne fortelle om funnene kan videreføres til den generelle befolkningen eller utrente. For å styrke ekstern validitet ville det vært gunstig med inkludering av mer variert utvalg av forsøkspersoner.

### **6.4 Statistiske analyser: En kritisk vurdering**

Majoriteten av studiene i denne rapporten benytter enten ANOVA eller t-tester for å kunne vurdere effekten av ulike intensiteter. Disse metodene er effektive for å identifisere signifikante differanser mellom grupper, og for eksempel om en treningsintensitet viser til bedre resultater sammenliknet med en annen. Det må likevel bemerkes at slike statistiske analyser kommer med sine begrensninger. De gir oss ikke en innsikt i mer komplekse relasjoner, som hvordan individuelle differanser eller spesifikke faktorer påvirker responsen.

Regresjonsanalyser kan være et nyttig verktøy for å kunne undersøke sammenheng mellom intensitet og styrke adaptasjoner. Slike metoder kan inkledere en rekke variabler samtidig, for eksempel treningsbakgrunn, eller andre individuelle kjennetegn. På bakgrunn av dette kan det

danne et mer nyansert bilde på faktorenes innvirkning på hypertrofi og maksimal styrke. På samme måte kan blandede modeller benyttes til å analysere variasjoner på et individuelt nivå. Dette kan medvirke til å forklare enkelte responderer ulikt på samme treningsopplegg, en slik innsikt vil være svært nyttig for å kunne tilby individuelt tilpasset treningsprogrammer.

I kontrast til ANOVA, som kun ser på forskjeller mellom gruppens gjennomsnitt, tillater regresjons- og blandede modeller en dypere undersøkelse av hvordan ulike på samme tid kan medvirke til adaptasjoner. Slike metoder kan avdekke hvordan genetisk prediskjon, intensitet og tidligere treningserfaring påvirker de muskulære responsene.

Lasevicius et al. (2018) benyttet seg av både regresjonsmodeller og blandede modeller i sine undersøkelser. Dette resulterte i mer detaljrik innsikt sammenlignet tradisjonelle statistiske metoder som ble anvendt i flere av de andre studiene. Slike tilnærminger kan hjelpe forskere med å identifisere hvordan treningen kan optimaliseres for individer med ulik forutsetning, samt for en generell “masse”.

Ved å kombinere bruken av både tradisjonelle metoder med både regresjons- og blandede modeller, kan fremtidige studier bidra til en dypere forståelse av underliggende mekanismer, som er medvirkende på hypertrofi og maksimal styrke, og utvikling av mer optimaliserte treningsstrategier.

## 6.5 Anbefalinger for fremtidige studier

For å kunne styrke påliteligheten og reproduserbarheten i fremtidig forskning på styrketrening og muskulære adaptasjoner, er det flere viktige områder som kan forbedres.

Alle de inkluderte studiene har relativt små til moderat utvalgsstørrelse, noe som kan medføre utfordringer. Mindre utvalg vil lede til en større standardavvik (SD) og mindre presise standardfeil (SE), og dette medvirker til utfordringer for å påvise små, men reelle effekter. I tillegg til dette, reduserer mindre utvalg den statistiske styrken (power), og dette øker risikoen for falsk negative funn. Ved å øke antall forsøkspersoner i fremtidige studier, kan man oppnå mer solide resultater og bidra til bedre forståelse på hvordan intensitet kan påvirke ulike populasjoner.

De fleste studiene som er gjennomgått, har en intervensjonsperiode på kun 8-12 uker. Dette er tilstrekkelig med tid for å identifisere tidlige adaptasjoner som hypertrofi eller økning av muskelstyrke, men det gir begrenset innsikt i langsiktige virkninger. Langsiktige studier kan belyse både vedvarende positive tilpasninger, og potensielle negative konsekvenser. Slike studier vil kunne undersøke hvordan ulike treningsprotokoller påvirker utholdenhet og muskelstyrke over en lengre tidsperiode.

Majoriteten av inkluderte studier benytter seg av enkle statistiske analyser som ANOVA og t-tester. Dette er svært nyttige verktøy, men de produserer kun en begrenset innsikt i mer komplekse sammenheng av variabler. Fremtidige studier kan med fordel implementere regresjon-

sanalyser og multivarierte metoder, for å utforske ulike faktorer som genetisk utgangspunkt, alder, eller treningshistorikk vil påvirke treningsutbyttet.

## 7 Assignment-5-Study-Design

### 7.1 Innledning

Styrketrening er vist seg å være en effektiv fremgangsmåte for å både øke tverrsnittsarealet i skjelettmuskulaturen vår, samt øke egenskapen til å generere maksimal kraft, også omtalt som styrken vår. Styrketrening spiller en viktig rolle for svært mange, uavhengig av forutsetning eller målsetning med treningen. Blandt annet er tung styrketrening meget effektivt for å motvirke enkelte sykdommer eller lidelser, som for eksempel osteoporose. Videre er denne treningsformen en viktig del av treningen for de aller fleste idrettsutøvere, uavhengig om utøveren konkurrerer i en styrkeidrett eller utholdenhetsidrett. Men hva er egentlig styrketrening? Kort forklart er styrketrening all trening som er tiltenkt å bedre eller vedlikeholde vår evne til å produsere maksimal kraft (Raastad et al. s, 13).

Om vi trener for enten økning i styrke, muskelmasse eller for egen helse, så er treningsvolum en essensiell faktor som kan virke bestemmende for progresjon. Treningsvolum omfatter det totale arbeidet som utføres, og bestemmes av belastning, antall serier, repetisjoner og treningsfrekvensen. Treningsvolum har i lang tid vært et viktig tema, dette skyldes at det vil være svært fordelaktig å finne et optimalt volum som maksimerer styrkeøkning og muskelvekst, men som samtidig minimerer risiko for skader eller tap av prestasjon (Schoenfeld et al., 2017).

Schoenfeld (2013) forteller at treningsvolum er en av de mest essensielle faktorene som fører til muskelvekst, og hvor et høyere volum medfører økt vekst. Videre forteller Krieger (2010) at et høyere treningsvolum kan medføre både positive og negative konsekvenser, bestemt av individets nåværende treningsstatus. Det virker å være et vippepunkt ved et høyere treningsvolum, uten at det enkelt kan konkretiseres hva som er nok eller for mye. Høyere treningsvolum kan bidra til å øke rekruttering av motoriske enheter, og vil kunne virke gunstig for både muskelvekst og styrkeøkning. Men ved for høyt volum kan det medføre muskelødem og økt restitusjonstid (Häkkinen et al., 1998; Kraemer et al., 2002).

For mange er prestasjonen en svært essensiell faktor, og her kan treningsvolum være faktor som kan påvirke denne. Et høyere volum kan medføre mer muskelvekst, men dette på bekostningen av mer “delayed onset muscle soreness” (DOMS), og det kan medføre en økt restitusjonstid (Schoenfeld et al., 2017) I kontrast til dette kan det virke som at et lavere treningsvolum kan virke mindre belastende for kroppen vår. Og dette kan ifølge Schoenfeld et al. (2017) være gunstig for å øke motorenhetrekruttering per repetisjon, og dette kan derav være gunstig for maksimal styrke. Videre på dette vil lavere treningsvolum ifølge Krieger (2010) kunne åpne opp for en høyere treningsfrekvens.

## 7.2 Metode

### 7.2.1 Deltakere og studieoversikt

Undersøkelsen inkluderte totalt 41 voksne deltakere, både kvinner og menn i alderen 18-40 år. For å kunne sikre et pålitelig resultat, måtte forsøkspersonene være ikke-røykere, og ha en begrenset tidligere treningshistorikk med styrketrening. Ingen av de inkluderte forsøkspersonene hadde gjennomført mer enn en styrkeøkt per uke innenfor en tidsramme på 12 måneder før intervensjonen. Individer med tidligere eller nåværende muskel- eller skjelettskader som kunne medføre til reduksjon av styrke, ble ekskludert. Dette gjaldt også ved bruk av faste medikamenter som kunne påvirke treningsadaptasjon.

Underveis i intervensjonen ble totalt syv forsøkspersoner ekskludert fra dataanalysene. Dette skyldtes manglende oppfyllelse av kravene til protokoll for minimum 85% deltagelse av alle treningsøkter. Årsakene til frafall skyldtes ubehag eller smerter i underekstremitetene i trening ( $n = 5$ ), en skade ikke relatert til undersøkelsen ( $n = 1$ ), og manglende overholdelse av studieprotokoll ( $n = 1$ ).

Ved baseline hadde alle forsøkspersoner en form for bakgrunn av idrettsaktivitet. Aktivitetene varierte mellom lagidrett, langrenn eller turn. Av de 41 inkluderte forsøkspersonene ble det rapportert fra 20 forsøkspersoner at de deltok i regelmessig fysisk aktivitet, inntil to økter per uke, hvor 10 av disse trente styrke sporadisk.

Table 7.1: Deltakeroversikt

	Age (years)	Stature (cm)	Body mass (kg)
Female $n = 18$	22 (1.3)	167.7 (6.9)	64.4 (10.4)
Male $n = 16$	23.6 (4.1)	182.9 (5.9)	75.8 (10.7)

### 7.2.2 Studie design

#### 7.2.2.1 Mål av muskelmasse

Tverrsnittsarealet (CSA) for muskelgruppen quadriceps ble målt både før og etter intervensjonen. Dette ble gjort ved bruk av magnetisk resonansavbildning (MRI). Undersøkelsene ble utført ved bruk av en S-scan (Esaote Europe B.V., Maastricht, Nederland), og ble utført i tråd med produsentens egne spesifikasjoner. Bildematerialene ble analysert anonymt av en tekniker. Til dette ble analyseverktøyet OsiriX (v.5.6, Pixmeo Sarl, Bernex, Sveits). For å tilrettelegge til nøyaktighet ble CSA standardisert i samme avstand fra kneledd for alle forsøkspersoner. Minimum fire sammenhengende snittbilder (5 mm tykkelse med 10 mm mellomrom) ble inkludert i analysen.

I tillegg til måling av CSA, ble det også målt kroppssammensetning, dette ble gjort med hjelp av DXA (Dual-energy X-ray Absorptiometry) med et Lunar Prodigy-system GE Healthcare, Oslo, Norge). Også denne prosedyren ble utført i henhold til etablert protokoll.

For å tilrettelegge for konsistente resultater, ble forsøkspersonene instruert om å faste minimum to timer før både MRI- og DXA-undersøkelsene, de skulle også unngå høy fysisk aktivitet 48 timer før testene. Etter intervensjonens avslutning ble det tilrettelagt for to dager hvile før postintervensjonsmålinger.

#### **7.2.2.2 Mål av maksimal styrke**

Maksimal styrke i muskelgruppen quadriceps ble utført ved hjelp av en 1RM-test (1 repetisjon maks) i øvelsen unilateral beinpress. Testing fulgte en streng strukturert protokoll, for å kunne sikre sammenlignbare resultater mellom alle forsøkspersoner. Testingen startet med en standardisert oppvarmingsprotokoll, forsøkspersonene utførte 10 repetisjoner på 50% av antatt 1RM, etterfulgt av 6 repetisjoner på 75%, deretter 3 repetisjoner på 85%.

Etter oppvarming ble belastning økt gradvis frem til de oppnådde en vekt de ikke lenger klarte å utføre etter testens krav. Den maksimale belastningen forsøkspersonene klarte å løfte med full bevegelsesbane ble loggført som 1RM.

#### **7.2.2.3 Treningsprotokoll**

Intervensjonen pågikk i 12 uker, og var bygget opp av et strukturert styrketreningsprogram for hele kroppen. Øvelsene for beina ble utført unilateralt, dette ble gjort for å sikre et balansert treningsvolum mellom beina. I forkant ble det tilfeldig inndelt hvilket bein som skulle gjennomføre single-sett protokoll (ett sett) og multiple sett protokollen (tre sett).

Oppvarming for alle økter var standardisert, forsøkspersonene startet oppvarmingen med å sykle i 5 min på ergometersykel. Deretter utførte de 10 repetisjoner i kroppsvektøvelser som push-ups, sit-ups, rygghev og knebøy (øvelsene ble tilpasset etter deres utgangspunkt). Siste del av oppvarmingen besto av ett oppvarmingssett i hver øvelse fra dagsplanen, med belastning på 50% av 1RM.

Styrketreningen for bein inkluderte tre hovedøvelser; unilateral beinpress, lår curl og kneekstensjon. Øvelsene ble utført etter spesifikk rekkefølge, med enten ett eller tre sett, avhengig av protokoll. Single sett ble utført mellom andre og tredje sett fra beinet anvist multiple-sett protokollen. Treningen av overkropp inkluderte øvelser som unilateral benkpress, nedtrekk, og øvelsene sittende roing og skulderpress ble vekslet mellom annenhver treningsøkt.

Intervensjonen startet med en belastning på 10RM de to første ukene. Uke 3-6 ble belastning økt opp til 8RM, og økt ytterligere til 7RM fra uke 7-12. Treningsfrekvensen gjennom ukene varierte, dette ble gjort for å øke totalvolum gjennom intervensjonen; to økter i uke 1, 3, 5, 9 og 12; tre økter uke 2, 4, 6, 8, 10 og 11. Treningsukene hvor frekvensen var 3 økter ukentlig, ble

intensiteten redusert i en av øktene (90% av forrige økt). Maksimale økter skulle ha minimum 48 t mellomrom, og økter med redusert belastning hadde minimum 24 t hvile.

Forsøkspersonene ble utdelt en standardisert restitusjonsdrikk etter hver treningsøkt, næringsinnholdet i denne besto av 0,15 g protein, 1,2 g karbohydrat og 0,05 g fett standardisert etter forsøksperson sin kroppsvekt.

Noen økter kunne utføres uten veiledning, men 91% av alle treningsøkter ble utført under oppsyn og veiledning. Treningsøktene som ble utført uten oppsyn ble detaljert loggført, og ble regelmessig gjennomgått av forskerne sammen med forsøksperson. Dette ble gjort for å sikre nøyaktighet og en konsistent gjennomføring, for å bedre kunne produsere reliable og repiterbare resultater.

### **7.2.3 Dataanalyse og statistikk**

All data inkludert i denne rapporten presenteres som gjennomsnitt og standard avvik (mean  $\pm$  SD), med mindre noe annet presiseres. For å kunne undersøke hypertrofi og styrke påvirkes av ulikt treningsvolum, ble gjennomsnitts differanse i endring mellom single-sett protokoll (SSP) og multiple-sett protokoll (MSP) beregnet. Resultatene visualiseres gjennom modeller under resultat kapittelet, og forsøkspersonenes utvikling blir illustrert for begge protokoller.

Hypotesetesting for å kunne vurdere eventuelle differanser mellom SSP og MSP ble utført i programvaren R ved bruk av lme4-pakken. Nullhypotese, som forutsetter ingen differanse, ble satt på prøve med en signifikansgrense på  $\alpha = 0.05$ . Alle statistiske analyser ble utført gjennom programvaren R.

## **7.3 Resultat**

### **7.3.1 Hypertrofi**

### **7.3.2 Maksimal styrke**

## **7.4 Diskusjon**

Undersøkelsen viste forsøkspersonene en større gjennomsnittlig økning i CSA ved MSP sammenliknet med SSP. Dette samsvarer med funnene til Krieger (2010) og Schoenfeld (2013). Funnene våre oppnådde også en statistisk signifikans, videre må det presiseres at enkelte forsøkspersoner responderte tilsynelatende bedre med SSP sammenliknet MSP. Dette motstrider til dels tidligere forskning, og gjennomsnittsverdiene i vår egen undersøkelse. Årsaken bak dette ligger trolig i individuelle fysiologiske og genetiske faktorer, som virker favoriserende ovenfor et lavere treningsvolum.

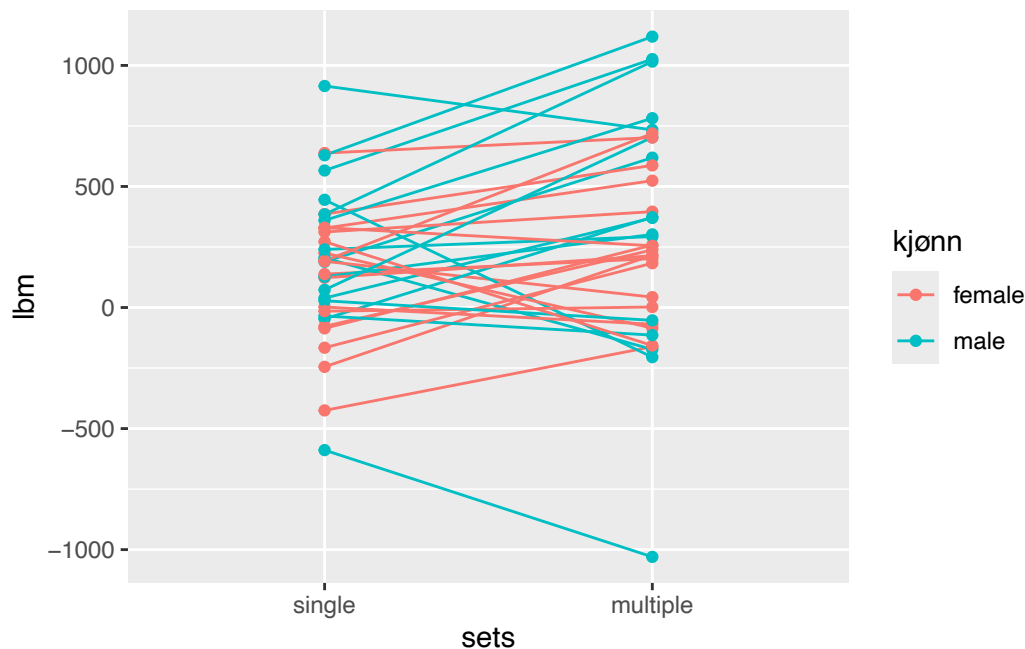


Figure 7.1: Forskjell på endring av muskelmasse under intervensjonen mellom SSP og MSP hos manlige og kvinnelige deltakere

For maksimal styrke (1RM) var resultatene gjenspeilende til økning i CSA. MSP kunne vise til en bedre gjennomsnittss økning sammenliknet SSP, og oppnådde statistisk signifikans med  $p = 0.025$ . Raastad et al. (2013) forteller at CSA er en av de mer sentrale faktorene som virker bestemmende på maksimal styrke, og det virker derfor logisk at det er en koorelasjon i våres funn sett i lys av økning i CSA.

Det virker dermed at ved økt treningsvolum, vil dette medføre bedre progresjon for både utvikling av maksimal styrke og CSA, uten at det kan presiseres et “tak” for hvor utbyttet stopper. Det er også viktig å ta i betraktning eventuelle restitusjonsutfordringer ved svært høye treningsvolum (Schoenfeld et al., 2017; Häkkinen et al., 1998; Kraemer et al., 2002). På bakgrunn av dette kan det være hensiktsmessig å starte opp en treningsperiode med en mer moderat treningsmengde, og øke mengden ved behov underveis. Dermed så begrenser vi risikoen for å utsette oss selv eller utøveren for restitusjonsvansker.



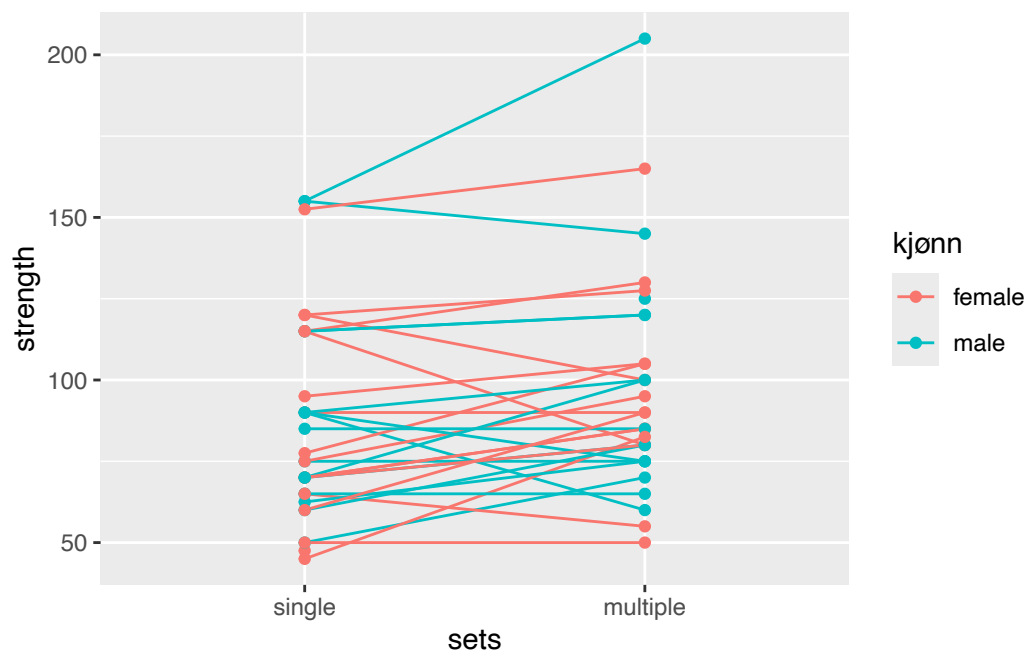


Figure 7.2: Forskjell på endring i styrke i legpress under intervensjon mellom SSP og MSP hos mannlige og kvinnelige deltakere

## 8 Philosophy of science

1. Ifølge Hume er det umulig å rasjonelt begrunne bruken av induksjon. Hva er argumentet for denne konklusjonen? Gi en innvending mot ett av premissene i Humes argument og prøv å svare på denne innvendingen på Humes vegne.

Hva er induksjon? Induksjon kan for eksempel være generaliseringer, hvor det generaliseres utifra noe som er blitt observert til å fortelle om noe som enda ikke har skjedd. Induksjon kan også være en slutning til den beste forklaringen, hvor det utgjøres en hypotese eller påstand på bakgrunn tilgjengelig informasjon (Holmen, 2024). David Hume var en av flere vitenskapsfilosofer som stilte seg kritisk til denne typen «vitenskap», og ifølge han selv kunne ikke induksjon forsvares med logikk eller rasjonelt, ettersom et induktivt argument forutsetter uniformitetsprinsippet (Vassend, 2024). Dette skyldtes at han mente at det hverken var logisk eller rasjonelt å trekke antagelser eller konklusjoner for fremtiden basert på fortiden. Videre utdypet kan dette forklares med at vi må forvente en kontinuitet i naturen, og at den følger stabile lover. Ifølge Hume kan som nevnt fremtiden ikke forklares basert på fortiden, og at det ikke ligger noe rasjonelt bak dette, og ifølge Hume er en slik antagelse et sirkulært argument eller begrunnelse. Med andre ord så blir det da brukt induksjon for å forsvare bruken av induksjon. Hume mener også at grunnen til at vi stoler på induksjon er fordi det er noe vi er vant med, ikke på grunn av at det er noe rasjonell begrunnelse (Vassend, 2024).

En normalisert innvending mot Humes argument er; til tross for at induksjon i seg selv ikke kan begrunnes rasjonelt, så kan det fremdeles rettferdiggjøres. Et eksempel er ved å si at solen kommer til å være der neste dag, så må vi stole på at den vil være der på bakgrunn av at den har vært der i milliarder av år. Til tross for at det er manglende bekreftende rasjonell begrunnelse, så er det liten grunn til å ikke stole på at solen kommer til å være der i morgen.

Humes sitt svar på denne innvendingen kunne potensielt erkjent at det ville vært en sannsynlighet for at solen var der i morgen også, men at dette ikke kunne forsvares hverken rasjonelt eller logisk. Og til tross for at induksjon kan være av nytte på enkelte områder, at det til tider fungerer, så betyr det derimot ikke at dette kan baseres på valide argumenter. På bakgrunn av dette ville han nok også trolig hevdet at innvendingen ikke tar til rette for hans hovedargument om at induksjon ikke kan rettferdiggjøres logisk og rasjonelt.

2. Gi en kort beskrivelse av falsifikasjonisme og si litt om hvorfor Popper var motivert til å utvikle denne teorien. Presenter så ett problem med teorien og vurder hvorvidt problemet kan løses.

Hva er falsifikasjonisme? Falsifikasjon er et sentralt begrep innenfor vitenskapsfilosofi, og var en meget sentral del i synspunktene til Karl Popper. Karl Popper videreførte deler av Humes ideologi rundt induksjonsproblemet, og mente at det ikke kunne løses. Induksjon var ikke noe mer enn et mislykket prosjekt, hvor Popper strakk det så langt som å sammenlikne det å etter-søke bekreftelse på en hypotese med pseudovitenskap. Videre mente han at en vitenskapelig påstand er kun vitenskapelig om den er falsifiserbar. At en hypotese er falsifiserbar betyr at gjennom deduksjon så kan den undersøkes empirisk, dersom en hypotese motbevises, skal den enten forkastes eller revideres. Dersom en påstand eller hypotese ikke ble falsifisert under den empiriske utprøvelsen, så blir den fremdeles ikke bekreftet ifølge Popper (Vassend, 2024).

Poppers motivasjon for utvikling av denne teorien stammer fra hans ønske om å finne en løsning på det såkalte avgrensningsproblemet. Avgrensningsproblemet bygger på grunnlaget til hvordan man kan differensiere mellom faktisk vitenskap og pseudovitenskap (Haraldsen, 2021). Det oppstår dog noen utfordringer med falsifikasjonisme, disse utfordringene kommer til lys når falsifikasjonisme kobles opp mot påstander rundt sannsynlighet. Det er et mangfold av vitenskapelige teorier som tar i bruk sannsynligheter, men disse kan ikke alltid forventes å være falsifiserbare. Utfordringer kommer da av at ifølge Popper, så er en påstand kun vitenskapelig hvis den er falsifiserbar, og det uten unntak. På bakgrunn av dette utsagnet kan ikke sannsynlighetsteorier bli sett på som vitenskapelige teorier (Vassend, 2024). Men det finnes områder innenfor vitenskapen hvor sannsynlighetsteorier er svært sentrale, spesielt om vi ser i retningen kvantemekanikk.

Kvantemekanikk omhandler fenomener som ikke kan observeres med det nakne øyet, det omhandler fenomener som skjer på atomnivå, og kvantemekanikkens mange essensielle prediksjoner uttrykkes gjennom sannsynligheter. Og motstridende til Poppers utsagn, har mange av sannsynlighetsteoriene innenfor kvantemekanikk vist å være vitenskapelige, da de kan settes på prøve gjennom empiriske tester som samsvarer med prediksjonene (linder, 2019; Vassend, 2024).

Dette var noe Popper også la merke til, og kom derfor med en løsning til utfordringen, en konvensjon hvor vi forkaster en hypotese der det observeres et utfall som er usannsynlig (Vassend, 2024). Videre utfordring for falsifikasjonisme er idealet om at deduktiv logikk er logikken som styrer vitenskapen, men kan denne alene danne et komplett bilde? Duhem mente at deduktiv logikk alene ikke kunne gjøre dette, og ved en mislykket prediksjon kan det være en viss nødvendighet for induksjon.

Kan da problemet løses? Det viser seg at hverken induksjon eller deduksjon er helt feilfrie metoder innenfor vitenskapen, en mulig løsning kan dermed å benytte oss av de viktigere elementene i begge teorier. I praksis kan dette gjøres ved å utforme en støttehypotese som har sine egne prediksjoner opp mot hoved hypotesen og dens prediksjoner. Dermed kan vi lettere identifisere hvor feil oppstår, uavhengig om den ligger i teorien eller ikke. På bakgrunn av dette kan det tilsynelatende virke som at falsifikasjon kan i enkelte tilfeller kreve former for bekreftelse, uavhengig av Poppers ståsted (Vassend, 2024).

Referanser:

Holmen, H. A. (5. mars. 2024). Induksjonsproblemet Hentet fra: <https://snl.no/induksjonsproblemet>  
Vassend, O. (2024). «Vitenskapsfilosofi dag 2». Forelesning ved Høgskolen i innlandet. Linder.  
J. (14. nov. 2019). Kvantemekanikk. Hentet fra: <https://snl.no/kvantemekanikk>

# 9 Laboratory Report

## 9.1 Protein ekstraksjon og analyse

### 9.1.1 Introduksjon og bakgrunn

I jakten på å bedre forstå de molekulære reaksjonene som er involvert i reguleringen av transkripsjon og translasjon ved trening, ernæring, sykdom og aldring, har også interessen og bruken av Western blot (WB) innenfor treningsfysiologi økt. WB har flere bruksområder for undersøkelse av regulatoriske molekulære reaksjoner, som for eksempel kvantifisere proteinmengde og protein-protein-interaksjoner, som er avgjørende for å kunne konstatere fysiologiske adaptasjoner til trening (Bass et al., 2017). Prosessen i WB deles inn i følgende steg:

- 1) Ekstraksjon av protein fra en sammensatt mikstur av intracellulær og ekstracellulær protein
- 2) Kvantifisering av proteinkonsentrasjon og elektroforese av protein
- 3) Overføring til en stabil membran med høy binding av proteiner
- 4) “Blokking” av membranen for å redusere bindingen av ikke-ønskede molekyler
- 5) Binding av antistoffer til de spesifikke proteinene man ønsker å undersøke
- 6) Binding av et sekundært antistoff, med en markør, til det første antistoffet
- 7) Utvikling og gjenkjenning av markøren
- 8) Kvantifisering av de resulterende båndene med hjelp av densitometriprogramvare

Tidligere har WB kun blitt assosiert med selve prosessen med å overføre proteinet fra en gel til en mer stabil membran, mens nå referer man til WB når man skal forklare hele prosessen (Bass et al., 2017, s.2).

Formålet med vårt eksperimentet er å benytte seg av WB for å se på den totale mengden av p70S6K (t-p70) og mengden fosforisert p70S6K fra muskelvev. Med dette kan vi si noe om fosforyleringsnivået av p70S6K i muskulaturen, som reflekterer hvor stor andel av p70S6K som er aktiv i forhold til den totale proteinmengden i vevet. Muskelprøvene er hentet fra høyre og venstre ben til ulike testpersoner, der alle har gjennomgått styrketrening av de ene beinet ved ulike tidspunkt før selve biopsien:

- FP 1 (HE) = 10 min før biopsi
- FP 2 (LØ) = 30 min før biopsi
- FP 3 (T) = 60 min før biopsi FP = forsøksperson

Prøven ble homogenisert forut for WB-analysen, som vil si at vi har frigjort proteinene gjennom mekanisk eller kjemisk nedbryting av cellemembranen. Selve protokollen og hvordan vi har utført homogeniseringen og WB er beskrevet under, samt presentasjon og diskusjon av resultatene.

## 9.2 Metode

### 9.2.1 Homogenisering av muskelprøver

Vi benyttet oss av fryst vev av m.vastus lateralis som var blitt ekstrahert fra både det høyre og venstre låret til en av prøvedeltakerne. Vekten på de ulike prøvene var:

Høgre bein (HE-R): 14,0 g Venstre bein (HE-L): 14,5 g Til homogeniseringen benyttet vi oss av en plastpistill, og tilsatte 600 l med lysat-buffer som var satt sammen av 594 l t-per og 6 l pink for å visualisere om vevet var fullstendig homogenisert.

For å måle proteinkonsentrasjonen i prøven vår, brukte vi Bradford Assay-metoden. Denne metoden bruker et fargestoff, Coomassie Brilliant Blue G-250, som vil binde seg til proteiner og skape en reaksjon der prøven vil skifte farge til blå i proporsjon med proteinkonsentrasjonen mengden protein. For å kvantifisere proteinkonsentrasjonen laget vi en standardkurve med bovint serumalbumin som referanse, slik at vi kunne sammenligne blåfargen i vår prøve med kjente proteinkonsentrasjoner. Vi måler deretter, med hjelp av et spektrofotometer, hvor mye av prøvene som blir absorbert ved 595 nm for å kunne bestemme om prøvene våre inneholder lave eller høge konsentrasjoner av proteiner (Noble & Bailey, 2008). Protokollen under er en generell fremgangsmåte for homogenisering av vev, og avvik og sentrale anmodninger er kommentert under de ulike punktene.

Definisjoner: - BSA = Bovint serumalbumin, et protein som blir utvunne fra blodplasmaet til storfe. Ofte brukt som standard for proteinkonsentrasjon.

#### 9.2.1.1 Utstysliste

- Microfuge tubes (1.5 ml Eppendorf)
- Plastic pestle
- Centrifuge (capable of 10 000 g and 4°C)
- Ice

- Lysis buffer (e.g. Hepes-buffer, Ripa-buffer)

### 9.2.1.2 Protokoll

1. Prepare the tissue by dissection away any connective tissue and blood. If you are working with wet tissue, this step should be done prior to freezing. Freeze dried tissue can be dissected in room temperature under the microscope. Use 10-50 mg wet-weight tissue or 2-10 mg freeze-dried tissue
2. Add protease/phosphatase inhibitors to the ice-cold lysis buffer (10  $\mu$ l/ml).
3. Keep the sample on dry ice or cooling block until you add the ice cold lysis buffer of choice. Use 20  $\mu$ l/mg wet-weight or 80  $\mu$ l/mg dry weight.

Dry: 2 mg  $\rightarrow$  160  $\mu$ l, 5 mg  $\rightarrow$  400  $\mu$ l, 10 mg  $\rightarrow$  800  $\mu$ l

4. Quickly disrupt the tissue by hand using the plastic pestle until there are no visible pieces.
5. Keep the sample on ice, vortex or rotate the sample for 20-60 min. Varighet av roteringen var var 33min.
6. Spin the sample 10 min, 10 000 g, 4°C
7. Carefully remove the supernatant to a new tube without disrupting the pellet. Dette leddet gikk veldig bra, liten sannsynlighet for feilkilder.
8. Aliquot the sample to a tube for protein concentration determination (1:10 dilution, 4  $\mu$ l to 36  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Keep a known volume for later normalization of the protein concentration (e.g. to 3  $\mu$ g/ $\mu$ l) keep on ice.

Myo homogenat ofte utenfor standard. Bruker 1:6 fortynner for å komme innenfor standard. 12  $\mu$ l prøve og 60  $\mu$ l vann. Pipetering gikk nokså bra også i dette leddet, liten sannsynlighet for feilkilde, men skal aldri utelukkes.

9. Determine protein concentration with Bradford Assay. 10  $\mu$ l sample + 250  $\mu$ l reagent. Make BSA (bovint serumalbumin) standards according to Thermo Sci guidelines (ref. 23209).

Igjen ble pipeteringen godt utført, liten sannsynlighet for feilkilder, men skal ikke utelukkes.

Mulige avvik:

- Punkt 2: Feil ved pipetering

## 9.2.2 Western blot protokoll

Selv om gruppen jobbet med en prøve, er WB-analysen blitt gjort på flere prøver fra 3 ulike testpersoner. For elektroforesen brukte vi Bio-Rad Criterion og en ferdiglaget gel. Selv om det ikke ble brukt en kalibreringskurve for å kvantifisere absolutt mengde p70S6K, ble intensitetsverdiene normalisert mot total proteinmengde og deretter brukt som en indikator for proteinaktivitet. Fosforyleringsnivået (p-p70/t-p70p) ble beregnet for å gi et relativt mål på aktivisering av mTOR-signalveien.

### 9.2.2.1 Solutions

```
library(knitr)
library(kableExtra)

# Lag en dataframe med buffer informasjon
buffer_data <- data.frame(
  Buffer = c("TBS 1L 10x, pH 7.6 (HCl adjust)",
            "Running buffer 1L 10x, pH 8.3",
            "Transfer buffer 1L 10x"),
  Component = c("Tris Base, NaCl",
                "Tris Base, Glycine, SDS",
                "Tris Base, Glycine"),
  Concentration_mM = c("20 mM x 10 = 200 mM, 137 mM x 10 = 1.37 M",
                       "25 mM x 10 = 250 mM, 192 mM x 10 = 1.92 M, 3.5 mM x 10 = 35 mM",
                       "25 mM x 10 = 250 mM, 192 mM x 10 = 1.92 M"),
  Mass_g = c("0.2 x 121.1 = 24.22 g, 1.37 x 58.44 = 80.06 g",
             "0.25 x 121.1 = 30.28 g, 1.92 x 75.07 = 144.1 g, 0.035 x 288.38 = 10.09 g",
             "0.25 x 121.1 = 30.28 g, 1.92 x 75.07 = 144.1 g")
)

# Generer tabell for PDF med LaTeX
kable(buffer_data, format = "latex",
      col.names = c("Buffer Solution", "Components",
                    "Concentration (mM)", "Mass (g)")) %>%
kable_styling(latex_options = c("striped", "hover", "condensed"))
```

- 1 x Transfer buffer = 100 ml TB stock x 10 + 100 ml methanol + 800 ml dH<sub>2</sub>O



Buffer Solution	Components	Concentration (mM)
TBS 1L 10x, pH 7.6 (HCl adjust)	Tris Base, NaCl	20 mM x 10 = 200 mM, 137 mM x 10 = 1.37 M
Running buffer 1L 10x, pH 8.3	Tris Base, Glycine, SDS	25 mM x 10 = 250 mM, 192 mM x 10 = 1.92 M
Transfer buffer 1L 10x	Tris Base, Glycine	25 mM x 10 = 250 mM, 192 mM x 10 = 1.92 M

### 9.2.2.2 Sample preparation

- Muscle samples should be prepared in an appropriate sample buffer
- Dilute samples to a final concentration of 1.5-2 g/l in Laemmlibuffer (Bio-Rad)
- Boil samples for 5 min, 95°C (denaturation). Cool to room temp. prior to loading. Spin down condensate

### 9.2.2.3 Sample loading, gel electrophoresis

- Assemble electrophoresis chamber on ice, add buffer to limit-mark

Det ble brukt Running buffer - Add protein ladder/standard (5 l)

Proteinstige: Precision Plus Protein Dual Color Standards, 500 µl #1610374 Pipetering gikk fint - Load samples according to pre-written load scheme (max. Loading capacity in GTX precast gels: 30 l)

Pipeteringsfeil i brønn 5: trakk prøven tilbake i pipetten en gang. Fikk alt ut igjen, men kan ha blitt blandet.

```
library(knitr)

# Opprett en dataframe med tallene som kolonnenavn

tabell_data <- data.frame(
  "1" = "M",
  "2" = "HE-L",
  "3" = "HE-R",
  "4" = "T-L",
  "5" = "T-R",
  "6" = "LØ-R",
  "7" = "M",
  "8" = "M",
  "9" = "HE-L",
  "10" = "HE-R",
  "11" = "T-L",
  "12" = "T-R",
```

```

"13" = "LØ-R",
"14" = "M"
)

# Generer tabell med kable

kable(tabell_data,
      col.names = 1:14,
      align = "c",
      caption = "Prøver fordelt på posisjoner")

```

Table 9.1: Prøver fordelt på posisjoner

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
M	HE- L	HE- R	T-L	T-R	LØ- R	M	M	HE- L	HE- R	T-L	T-R	LØ- R	M

Brønn 2-6 er p-p70 og brønn 9-13 er t-p70.

- Move electrophoresis chamber into 4 C. Top up buffer. Put on top lid.
- Run gels: constant voltage, 30 min, 300 volt

#### 9.2.2.4 Protein transfer (blotting)

- Disassemble gels and place them in transferbuffer 15-30 min
- Prepare sandwich:

Put sponges in dH<sub>2</sub>O to get rid of bubbles Put membranes (cut in upper left corner) in methanol to activate (5-10 min on shaker) Avklippet hjørne er ved brønn 18.

Place sandwich in assembly tray – black side down. Squeeze dH<sub>2</sub>O from sponges and place them in transferbuffer – remove all bubbles.

Wet 2 filter papers in buffer, place them on top of gel and gently remove them together. Place filterpapers with gel on top of sponge. Remove bubbles.

Put membrane on top of gel. Careful with direction, membranes should be marked upper left corner. Remove bubbles.

Place the last sponge on top, close the sandwich Overføring til sandwich gikk fint, lav risiko for feilkilde.

- Place the sandwich in transfer tray
- Run transfer: Constant ampere/current 300 mA, 3 h

Brukte hurtigprogram: 100V i 30 min.

#### **9.2.2.5 stain for total protein and cut membrane**

- Mix destain solution with methanol 1:1 # 30:30 ml
- Mix Eraser solution with methanol 1:1\* 30:30 ml
- Rinse the membrane quickly in dH<sub>2</sub>O
- Add MemCode Sensitizer to the the membrane, place on shaker for 2 min. Decant solution, reuse 1 time
- Add MemCode Reversible stain, on shaker 1 min. Decant. Reuse 1 time.
- Destain by adding MemCode destain to membrane, rinse quickly 3 times
- Add methanol/destain solution, on shaker, 5 min- Rinse with dH<sub>2</sub>O 4 times#
- Image membrane
- Cut the membrane. If multiple membranes, number each
- Proceed with Eraser → Add eraser/methanol solution to the membrane on shaker, 10 min\*
- Rinse the membrane in dH<sub>2</sub>O 4 times. Store in TBS until cut
- Cut membranes according to protein weight and/or wells used

#### **9.2.2.6 Blocking and primary antibody**

- Block the membrane in 2,5 % milk in TBS-T for 1 h at room temp - Brukte 5 % milk i TBS-T
- Decant blocking solution, rinse in TBS
- Add primary antibody (AB) in BSA/milk solution (5% in TBS-T), incubate over night in 4 C

#### 9.2.2.7 Antibody wash and secondary antibody - ble utført av Vilde

- Wash with TBS-T 2x1 min + 3x5 min - Unøyaktig vasking kan medføre bakgrunnsstøy.
- Add secondary AB in 2,5% milk with TBS-T for 1 h at room temp.
- Wash with TBS 4x5 min - Unøyaktig vasking kan medføre bakgrunnsstøy.
- Perform ECL: o Mix working solution (Thermo super signal ...) o Incubate membrane for 5 min at room temp o Cover blot in clear plastic wrap
- Collect image on Gel Doc

#### 9.2.3 Resultater

Vi benyttet oss av WB-analyse for å kvantifisere total p70S6K og fosforlyert p70S6K, slik at vi kunne undersøke fosforyleringsnivået til proteinet i vastus lateralis til de ulike testpersonene. Intensiteten til fosforylert p70S6K (p-p70) og total p70S6K (t-p70) ble normalisert mot total-protein fra membran blottet. Fosforyleringsnivået ble beregnet som forholdet mellom p-p70 og t-70 ( $p\text{-}p70 / t\text{-}p70$ ). Intensitetsverdiene som presenteres i tabellene er basert på optisk tetthet fra Western blot-bildene. Verdiene representerer relative signalstyrker og har ingen absolutt måleenhet, da kalibreringskurve ikke ble benyttet. For å korrigere for variasjoner i proteinmengde mellom brønnene, f.eks grunnet pipeteringsfeil eller feil i total protein-målinger, ble intensitetene normalisert mot total proteinmengde (membran blot).

## 10 References

- Holmen, H. A. (5. mars. 2024). Induksjonsproblemet Hentet fra: <https://snl.no/induksjonsproblemet>
- Vassend, O. (2024). «Vitenskapsfilosofi dag 2». Forelesning ved Høgskolen i innlandet.
- Linder, J. (14. nov. 2019). Kvantemekanikk. Hentet fra: <https://snl.no/kvantemekanikk>
- Lasevicius, T., Ugrinowitsch, C., Schoenfeld, B. J., Roschel, H., Tavares, L. D., De Souza, E. O., Laurentino, G., & Tricoli, V. (2018). Effects of different intensities of resistance training with equated volume load on muscle strength and hypertrophy. *European journal of sport science*, 18(6), 772–780. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1450898>
- Fry A. C. (2004). The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 34(10), 663–679. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434100-00004>
- Grgic, J., Schoenfeld, B. J., Orazem, J., & Sabol, F. (2022). Effects of resistance training performed to repetition failure or non-failure on muscular strength and hypertrophy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of sport and health science*, 11(2), 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2021.01.007>
- Kraemer, W. J., & Ratamess, N. A. (2004). Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Medicine & science in sports & exercise*, 36(4), 674–688.
- Krieger, James W. Single vs. Multiple Sets of Resistance Exercise for Muscle Hypertrophy: A Meta-Analysis. *Journal of Strength and Conditioning Research* 24(4):p 1150-1159, April 2010. | DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181d4d436
- Raastad, T., Paulsen, G., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R., & Wisnes, A. R. (2013). *Styrketrening – I teori og praksis* (3. utg.). Gyldendal Akademisk.
- Refalo, M. C., Helms, E. R., Robinson, Z. P., Hamilton, D. L., & Fyfe, J. J. (2024). Similar muscle hypertrophy following eight weeks of resistance training to momentary muscular failure or with repetitions-in-reserve in resistance-trained individuals. *Journal of sports sciences*, 42(1), 85–101. <https://doi.org/10.1080/02640414.2024.2321021>
- Ruple, B. A., Plotkin, D. L., Smith, M. A., Godwin, J. S., Sexton, C. L., McIntosh, M. C., Kontos, N. J., Beausejour, J. P., Pagan, J. I., Rodriguez, J. P., Sheldon, D., Knowles, K. S., Libardi, C. A., Young, K. C., Stock, M. S., & Roberts, M. D. (2023). The effects of resistance training to near failure on strength, hypertrophy, and motor unit adaptations in previously trained adults. *Physiological reports*, 11(9), e15679. <https://doi.org/10.14814/phy2.15679>

Schoenfeld B. J. (2010). Squatting kinematics and kinetics and their application to exercise performance. *Journal of strength and conditioning research*, 24(12), 3497–3506. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181bac2d7>

Schoenfeld, B. J., Ogborn, D., & Krieger, J. W. (2016). Dose-response relationship between weekly resistance training volume and increases in muscle mass: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Sports Sciences*, 35(11), 1073–1082. <https://doi.org/10.1080/02640414.2016.1210197>

Spiegelhalter, D. J. 2019. *The Art of Statistics : How to Learn from Data*. Book. First US edition. New York: Basic Books. Tanner, R. K., and C. J. Gore. 2012. *Physiological Tests for Elite Athletes 2nd Edition*. Book. Human Kinetics. <https://books.google.no/books?id=0OPIiMks58MC>.

Hopkins, W. G. 2000. “Measures of Reliability in Sports Medicine and Science.” *Journal Article*. *Sports Med* 30 (1): 1–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907753>.

Kuang, J., X. Yan, A. J. Genders, C. Granata, and D. J. Bishop. 2018. “An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research.” *PLoS One* 13 (5): e0196438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>.