

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu
Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Quantitative Analyse des menschlichen Endomysiums unter
Berücksichtigung von Alter und Trainingsstatus**

Inaugural - Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sebastian Wolfgang Humbsch
aus Weimar, Deutschland

promoviert am 11.03.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Rittweger
2. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. F. Pröls

Ehrenerklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:
Prof. Dr. Jörn Rittweger, Prof. Dr. Christoph Clemen.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Carolin Berwanger, Herrn Prof. Dr. Christoph Clemen und Herrn Dr. Yannick Lichterfeld selbstständig durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Jena, den 26.05.2024

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle danke ich dem gesamten Team des Instituts für Muskel- und Knochenstoffwechsel am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Dr. Jörn Rittweger, Prof. Dr. Christoph Clemen sowie meinen Kollegen Carolin Berwanger und Yannick Lichterfeld bedanken. Außerdem gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir während des gesamten Promotionszeitraumes zur Seite standen.

Widmung

Ich möchte diese Arbeit meiner Familie und meinen Freunden widmen.

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	7
2.	EINLEITUNG.....	10
2.1	Muskulatur des Menschen.....	10
2.2	Hintergrundwissen Bindegewebe.....	11
2.3	Aussichten und Begründung des Forschungsinteresses in diesem Bereich.....	13
2.4	Ziele der Arbeit.....	14
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1	Biopsieerhebung.....	16
3.2	Färbeprotokoll Laminin γ -1 und Kollagen IV.....	16
3.3	Färbeprotokoll Kollagen I und III.....	17
3.4	Bilderanalyse.....	18
3.5	Datenerhebung der Laminin γ -1 und Kollagen IV Färbungen.....	19
3.6	Auswahlkriterien für die statistische Analyse von Laminin γ -1 und Kollagen IV.....	21
3.7	Datenerhebung der Kollagen I und Kollagen III Färbungen.....	27
4.	ERGEBNISSE.....	33
4.1	Statistische Analyse Laminin γ -1 und Kollagen IV.....	34
4.2	Statistische Analyse Kollagen I und Kollagen III.....	36
5.	DISKUSSION.....	38
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	45
7.	TABELLENVERZEICHNIS.....	50

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab - Antibodies/Antikörper

AGEs - advanced glycation end products

ANOVA - Analysis of variance

CSA - Cross sectional Area/Querschnittsfläche

EFAr - Endomysium-to-fiber-area Ratio/Verhältnis Endomysium zu Faserfläche

EFNr - Endomysium-to-fiber-number Ratio/Verhältnis Endomysium zu Faseranzahl

mAb - monoclonal Antibody/monoklonaler Antikörper

pAb - polyclonal Antibody/polyklonaler Antikörper

PBS - phosphatgepufferte Kochsalzlösung

RT - Raumtemperatur

PFA - Para-Formaldehyd

TIMPs - Tissue inhibitors of metalloproteinases/Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen

min. - Minuten

MMPs - Matrixmetalloproteinases/Matrixmetalloproteinasen

NGS - normal goat serum/normales Ziegenserum

DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol

ROI - Region of Interest/Region von Interesse

EZM - extrazelluläre Matrix

IMCT - intramuscular connective tissue/intramuskuläres Bindegewebe

MALICoT - „Master Athletic Laboratory Study of Intramuscular Connective Tissue/
Muskelstudie über das Bindegewebe der Muskulatur“

1. Zusammenfassung

Hintergrund:

Der menschliche Körper unterliegt zu jeder Zeit und je nach Beanspruchung Veränderungen auf biologischer, physikalischer und chemischer Ebene.¹ Das Altern ist ein Prozess, bei dem in der Regel ein Rückgang der physiologischen Leistungsfähigkeit zu beobachten ist. Bewegung und Sport gelten als protektive Faktoren, wenn es darum geht, dem Abbau von Muskelmasse und Herz-Kreislaufkrankungen entgegenzuwirken. Das Bindegewebe leistet als Stütz- und Kraftkomponente einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktion des menschlichen Organismus, fand in bisherigen Studien allerdings wenig Beachtung.

Fragestellung:

Die MALICoT-Studie sollte einen detaillierteren Einblick in alters- und sportbedingte Veränderungen des intramuskulären Bindegewebes (IMCT), insbesondere des Endomysiums, gewähren und diese quantitativ beschreiben. Im Zuge dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Endomysium durch das Alter und den Trainingszustand beeinflusst wird. Als Teil dieser Studie war es die Aufgabe der vorliegenden Dissertation, die Bindegewebsanteile Laminin γ -1, Kollagen IV, Kollagen I und Kollagen III zu quantifizieren.

Material und Methoden:

Im Rahmen der MALICoT-Studie wurden Muskelbiopsien des Musculus soleus von 43 männlichen Probanden am deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt in Köln entnommen. Die Unterteilung der Probanden erfolgte in 4 Gruppen: 1. trainiert, 20-35 Jahre, 2. untrainiert, 20-35 Jahre, 3. trainiert, 60-75 Jahre und 4. untrainiert, 60-75 Jahre. Das gewonnene Material dieser vier Gruppen wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit immunhistochemisch gefärbt, fluoreszenzmikroskopiert, mit Analysesoftware untersucht und mittels R-Skript statistisch ausgewertet. Es wurden verschiedene Arten der Analyse verwendet. Die Untersuchung der Bindegewebsanteile Laminin γ -1 und Kollagen IV erfolgte mit dem Mikroskop Zeiss Axio Imager.M2 und der dazugehörigen Software Zeiss Zen 3.4. Die Untersuchung der Bindegewebsanteile Kollagen I und III erfolgte ebenso mit dem Mikroskop Zeiss Axio Imager.M2 und der dazugehörigen Software Zeiss Zen 3.4. Die Analyse der

Kollagene I und III wurde zusätzlich unter Zuhilfenahme der Programme Irfanview 64 v. 4.60 und Cellprofiler v. 3.0.4 vorgenommen.

Ergebnis:

Anhand der immunhistochemischen Färbungen von Laminin γ -1 und Kollagen IV konnte eine signifikante Zunahme der Dicke des Endomysiums ($p=0,08$) sowie der Muskelfaserquerschnittsfläche ($p=0,045$) im Alter unabhängig vom Trainingsstatus nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Endomysium zur Muskelfaserquerschnittsfläche zeigte keine signifikanten Veränderungen. Dagegen wurde beim Verhältnis von Endomysium zu Faserzahl eine, wenn auch nicht signifikante, altersbedingte Zunahme unabhängig vom Trainingszustand festgestellt ($p=0,07$). Die Tortuosität, die Gewundenheit der Muskelfasern und somit auch des umgebenden Bindegewebes, wurde als möglicher Parameter zur Bewertung der Muskelsteifigkeit herangezogen und zeigte eine signifikante Zunahme bei sportlicher Betätigung unabhängig vom Alter ($p=0,004$).

Bei den Färbungen von Kollagen I zeigte sich sowohl bei hoher sportlicher Aktivität mit zunehmendem Alter Y.Jump zu O.Jump ($p=0,039$) eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Bindegewebisdicke als auch in höherem Alter mit zunehmender sportlicher Aktivität O.Control zu O.Jump ($p=0,033$). Für die Färbungen von Kollagen I ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Muskelfaserquerschnittsfläche/CSA (Cross sectional area).

Die Bindegewebisdicke wies für die Färbungen von Kollagen III keine signifikanten Veränderungen auf (alle $p>0,05$). Für die Färbungen von Kollagen III ergab sich einerseits eine signifikante Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche/CSA (Cross sectional area) mit zunehmendem Alter bei gleichbleibend verminderter sportlicher Aktivität Y.Control zu O.Control ($p=0,039$), andererseits zeigte sich eine signifikante Zunahme der CSA in den Gruppen der Jungen mit zunehmender sportlicher Aktivität Y.Control zu Y.Jump ($p=0,045$). Die Bindegewebisdicke wies für die Färbungen von Kollagen III keine signifikanten Veränderungen auf (alle $p>0,05$).

Es zeigten sich für das Verhältnis von Endomysium zu Faserfläche (EFAr) und das Verhältnis Endomysium zu Faseranzahl (EFNr) weder in den Daten für Kollagen I noch für Kollagen III statistisch signifikante Veränderungen (alle $p>0,05$).

Schlussfolgerung:

Im Einklang mit der Hypothese der vorliegenden Arbeit wird das Endomysium durch das Alter und den Trainingszustand beeinflusst. Bei der Untersuchung von Veränderungen des Endomysiums ist zu berücksichtigen, dass die genaue biochemische Zusammensetzung des Endomysiums nicht schlussendlich nachgewiesen ist und somit die den jeweiligen Auswertungen zugrundeliegende Bindegewebs- und Muskelfaserart mit berücksichtigt werden muss.²⁻⁴ Dass die verschiedenen Bindegewebssubtypen von Säuge- und Nagetieren unterschiedlich auf sportliche Betätigung und Alterung reagieren und sich dabei auch das Verhältnis der unterschiedlichen Subtypen zueinander ändert, ist in der bisherigen Literatur beschrieben.^{2,5} Dies zeigt sich auch in den hier aufgeführten Ergebnissen der Färbungen von Laminin γ -1/Kollagen IV, Kollagen I und III. Eine wie in der bisherigen Literatur beschriebene Zunahme des Bindegewebes im Alter konnte auch im Rahmen dieser Studie in Form der signifikanten altersbedingten Zunahme der Endomysiumdicke anhand der Färbungen von Laminin γ -1/Kollagen IV und Kollagen I gezeigt werden.^{6,7} Die gleichzeitige Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche im Alter, insbesondere bei den Laminin γ -1/Kollagen IV und Kollagen III Färbungen, lässt darauf schließen, dass hier eine Atrophie der funktionellen Faseranteile bei gleichzeitig erhaltenem oder gar zunehmendem Bindegewebsgerüst vorliegt. Der Einfluss von Sport und Alter spiegelt sich in unseren Daten jedoch nicht in statistisch signifikanten Effekten im Verhältnis von Endomysium zu Faserfläche (EFAr) oder dem Verhältnis von Endomysium zu Faseranzahl (EFNr) der Färbungen Laminin γ -1/Kollagen IV, Kollagen I und Kollagen III wider. Dies kann auf die große Variabilität der Faserflächen in den vier Gruppen zurückzuführen sein.

Die in dieser Arbeit angewandten Analysemethoden sind geeignet, alters- und sportassoziierte Veränderungen des Bindegewebes, insbesondere des Endomysiums sowie der unterschiedlichen darin enthaltenen Bindegewebsmoleküle, zu erfassen. Es obliegt zukünftigen Studien mit anderen Untersuchungsmethoden, weitere Bindegewebssubtypen, -parameter und -zusammensetzung in Abhängigkeit zu sportlicher Aktivität und Alterung weiterführend zu untersuchen.

2. Einleitung

2.1 Muskulatur des Menschen

Die Muskulatur des Menschen lässt sich in glatte und quergestreifte Muskulatur unterteilen. Die quergestreifte Muskulatur hat die Aufgabe, Kraft aufzubauen, damit Körperteile zu bewegen und lebenswichtige Funktionen wie den Herzschlag zu ermöglichen. Dies geschieht durch Kontraktionsprozesse, die durch das Zusammenspiel der Myofilamente Aktin und Myosin ermöglicht werden. Eine Muskelfaser ist das Zellindividuum der Skelettmuskulatur. Skelettmuskulatur besteht aus langen vielkernigen Zellelementen. Die Kraftübertragung und das reibungslose Aneinandervorbeigleiten der Muskelbestandteile wird im Bewegungsapparat des Menschen durch Sehnen und intramuskuläres Bindegewebe ermöglicht.⁸⁻¹¹ Der Musculus soleus hat seinen Ursprung an der Dorsalseite des Caput und Collum fibulae und ist über den Arcus tendineus musculi solei an der Linea musculi solei dorsalseitig an der Tibia befestigt und inseriert über die Achillessehne am Tuber calcanei.⁹ Hier bewirkt er vom N. tibialis innerviert besonders Plantarflexion im oberen Sprunggelenk und Supination im unteren Sprunggelenk.⁹ Der Musculus soleus leistet neben anderen Muskeln des Beines einen entscheidenden Beitrag bei der Kraftübertragung, wie sie beim Laufen, Springen oder Rennen von großer Bedeutung ist. Dies ist unter anderem auf seine Zusammensetzung zurückzuführen, da er hauptsächlich aus langsam zuckenden ausdauernden, auf oxidativen Stoffwechsel angewiesenen Typ I Fasern besteht.^{8,12} Er entwickelt dabei, auch wenn er eher auf Ausdauerleistung ausgelegt ist, relativ große Kräfte bei vergleichsweise geringer mechanischer Arbeit und verminderter Ermüdbarkeit.^{8,13} Bei schnellen Sprung- und Abstoßungsbewegungen, wie beim Springen oder Rennen, spielt besonders die Nutzung der elastischen Speicherkapazität des Sehnen-Muskel-Komplexes eine große Rolle, um dies zu gewährleisten.¹⁴ Der Musculus soleus ist aufgrund seiner Anatomie und Physiologie bei solchen Aktivitäten besonders beansprucht. Veränderungen in Bezug auf die strukturelle Beschaffenheit der Muskulatur und des Bindegewebes je nach Beanspruchung sind bei ihm somit in Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit voraussichtlich gut ausgeprägt und messbar. Somit wurde der Musculus soleus in dieser Dissertation als zu untersuchender Muskel herangezogen.

Im Rahmen vieler Studien sind bereits Untersuchungen an diesem Muskel durchgeführt worden, was zudem eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht.

2.2 Hintergrundwissen Bindegewebe

Muskelfasern sind von intramuskulärem Bindegewebe (IMCT) umgeben, welches wiederum in Endo- und Perimysium unterteilt wird.¹ Das Endomysium umschließt einzelne Muskelfasern und das Perimysium bündelt Gruppen von Muskelfasern. Das Epimysium, welches auch in die Muskelfaszien übergeht, umhüllt den gesamten Muskel.¹ Faszien sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung und des gesellschaftlichen Interesses gerückt. Das Perimysium ist zudem sehr wichtig für die Aufnahme und Organisation von Strukturen wie Nerven und Gefäße, die für eine ordnungsgemäße Muskelfunktion erforderlich sind.¹⁵ Die Schnittstelle zwischen dem Endomysium und der Zellmembran der Muskelzelle, dem Sarkolemm, bildet eine spezielle Basalmembran, die hauptsächlich aus Laminin γ -1 und Kollagen IV besteht.^{1,16} Laminin kann direkt an Kollagen Typ IV binden.⁴ Die genaue biochemische Zusammensetzung des Endomysiums konnte bisher noch nicht exakt detektiert werden, weswegen in dieser Arbeit die Quantifizierung des Endomysiums sowohl mittels Analyse der durch Laminin γ -1 und Kollagen IV begrenzten Bereiche als auch mittels direkter Kollagen I und Kollagen III Färbung durchgeführt wurde.⁴

Das intramuskuläre Bindegewebe besteht aus zwei Hauptkomponenten, den Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM). Die EZM wiederum setzt sich hauptsächlich aus Proteinfasern, wie Kollagenen und elastischen Fasern sowie einer Grundsubstanz, die unter anderem Proteoglykane und Glykosaminoglykane beinhaltet, zusammen.⁸⁻¹¹ Zur EZM gehören unter anderem Laminin γ -1 und Kollagen IV sowie die Kollagen-Subtypen I und III, die am häufigsten im IMCT vorkommen.^{1,4,17} Kollagene sind verschiedene Proteine, die eine große Rolle bei der Vernetzung von Zellen spielen.¹⁸ Im Allgemeinen fungiert Kollagen I als Widerstandskomponente gegenüber Kraft, Spannung und Dehnung, während Kollagen III ein flexibles Geflecht bildet, was den zellulären Aufbau unterstützt und ein Hilfsgerüst für Muskelfasern darstellt.^{19,20} Kollagen Typ I kommt im menschlichen intramuskulären Bindegewebe vorwiegend im Epimysium vor, Kollagen Typ I und III findet man überwiegend im Perimysium und das Endomysium beinhaltet insbesondere Kollagen Typ I, III und V.²¹ Bei Ratten zeigt sich eine ähnliche Verteilung, Kollagen vom Typ I kommt vor allem im Perimysium vor, wobei Typ-III-Kollagen sowohl im Endomysium als auch im Perimysium exprimiert wird.¹² Sehnen, wie beispielsweise die Achillessehne, bestehen zu einem sehr großen Teil aus Kollagen Typ I Fasern, welches auch der häufigste Fasertyp im menschlichen Körper ist.²² Kollagen Typ IV baut netzwerkartige Strukturen auf und bildet die Basis für die Basallamina.²³ Jede Muskelzelle wird von

so einer Basallamina mit anliegender Gitterfaserhülle umgeben, welche zusammen das Endomysium bilden.¹⁰ Kollagene und elastische Fasern werden von den im Bindegewebe vorhandenen Zellen, den Fibroblasten, produziert und erhalten somit die Struktur der EZM aufrecht.⁶ Die EZM des Muskels ist sehr formbar, ihre Beschaffenheit und infolgedessen ihre physiologischen Funktionen können durch körperliches Training, Nichtgebrauch, Alterung oder verschiedene Krankheiten beeinflusst werden.¹ Bisher ist wenig darüber bekannt wie extrazelluläre Matrix und damit auch das Bindegewebe auf Trainingsreize reagieren.^{1,24} Fede et al. beschreiben, dass Muskelerkrankungen gewöhnlich auf Veränderungen der Größe und Beschaffenheit der Muskelfasern zurückzuführen sind.⁶ Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass pathologische Veränderungen auch im Rahmen einer mit dem Alter einhergehenden Fibrosierung der EZM auftreten könnten.⁶ Altersbedingte Veränderungen des Bindegewebes und seiner einzelnen Bestandteile sind in der Wissenschaft bereits beschrieben. So nimmt beispielsweise laut Pavan et al. der absolute Kollagengehalt im Alter zu, wo hingegen Haus et al. keine Veränderungen beobachten konnten.^{7,25} Während es weitestgehend akzeptiert ist, dass es im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses zu Muskelschwund kommt,^{26,27} bleiben die genauen Veränderungen des intramuskulären Bindegewebes unklar.^{1,28,29} Alternder Skelettmuskel weist Studien zufolge eine Verminderung der Gewundenheit der Kollagenfibrillen mit Zunahme der Steifigkeit, besonders derer der Kollagenkomponenten auf.³⁰ Williams et al. beschreiben eine Zunahme der Endomysiumdicke nach einer Woche der Immobilisation.³¹ Andere Studien benennen die Sarkopenie, gekennzeichnet durch den Verlust von Muskelfasern, als eine physiologische Veränderung des Muskelgewebes bei älteren Menschen.⁶ Es ist bekannt, dass Altern mit einer Zunahme der Steifigkeit des IMCT und anderen physikalischen und biologischen Veränderungen einhergeht.^{7,32} Während in einer Tierstudie die Epimysiumdicke junger und alter Ratten keinen signifikanten Unterschied aufwies, wurde in einer anderen hingegen festgestellt, dass die Kollagenkonzentration im Skelettmuskel alternder Ratten zunimmt.^{29,32} Aktuellere Untersuchungen konnten eine Zunahme des Kollagens bei älteren Männern und Frauen zeigen.⁶ Besonders Kollagen I wies eine deutliche prozentuale Flächenzunahme und Akkumulation bei älteren Menschen und im Mäuseversuch auf.⁶

Es konnte in den bisherigen Untersuchungen, sowohl an Tieren und Menschen, nicht abschließend geklärt werden wie sich die beschriebene altersbedingte Zunahme des

Kollagens auf Perimysium und Endomysium verteilt und welche Bereiche jeweils bevorzugt betroffen sind.²

Kjaer et al. kamen in Bezug auf die körperliche Aktivität zu dem Ergebnis, dass die EZM vermutlich dynamisch auf mechanische Beanspruchung reagiert und die Kollagensynthese ansteigt.³³ Schoenrock et al. beschrieben im Rahmen einer Betruhestudie keine Veränderungen in der Dichte des Kollagen-I-Netzwerks bei Menschen, die sich nicht körperlich betätigten.³⁴ Bei den Probanden, die ein sprungbasiertes Gegenmaßnahme-Übungsprotokoll durchführten, war die Kollagen I Menge im Vergleich zu den Ausgangswerten hingegen sogar reduziert. An anderer Stelle beschreiben Autoren eine trainingsinduzierte Zunahme der Kollagenvernetzung, aber nicht des gesamten Kollagengehalts.³⁵ In einem Rattenversuch konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität nicht unbedingt zu einem Anstieg der Kollagenkonzentration führt.³⁶ Ein Mäuseversuch wies auf eine Abnahme des Kollagen IV nach einigen Tagen der Immobilisation hin.³⁷ In Thot et al., einer Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe, aus der auch die vorliegende Arbeit stammt und in der mittels ähnlicher Methoden die Veränderungen des Endomysiums bei Immobilisation dargestellt wurde, konnte keine absolute Zunahme des menschlichen Bindegewebes nach Phasen der Immobilisation festgestellt werden.³⁸ In der gleichen Arbeit wird eine Methode zur Quantifizierung von Laminin γ -1 und Kollagen IV im Bindegewebe des Musculus soleus erwähnt.³⁸ Bisherige Untersuchungsergebnisse liefern, wie den vorangegangenen Schilderungen zu entnehmen ist, teilweise widersprüchliche Aussagen bezüglich alters- und sportassoziierter Veränderungen. Die in der Literatur beschriebenen Diskrepanzen in den Ergebnissen der Veränderungen des Kollagens sind möglicherweise unter anderem auf nicht standardisierte Untersuchungsverfahren und Messmethoden, unterschiedliche Fragestellungen in Bezug auf die zu untersuchten Messgrößen und Gewebe, Unterschiede in der untersuchten Spezies und der Stichprobengröße zurückzuführen.

2.3 Aussichten und Begründung des Forschungsinteresses in diesem Bereich

Bislang ist nur wenig über die Anpassung des menschlichen Muskelbindegewebes in Bezug auf sportliche Aktivität und Alterung bekannt, beziehungsweise ist die bisherige Studienlage unzureichend, uneindeutig und teilweise diskrepant. Im Rahmen der MALICoT-Studie sollte eine geeignete und zuverlässige Methode gefunden werden, die strukturellen Veränderungen der Fasern zu quantifizieren

sowie durch Vergleich der verschiedenen Techniken die am besten geeignete zu ermitteln. MALICoT steht für „Master Athletic Laboratory Study of Intramuscular Connective Tissue/ Muskelstudie über das Bindegewebe der Muskulatur“, im Rahmen welcher verschiedene Untersuchungen wie Blutanalyse, Muskelbiopsien am Unterschenkel, Magnetresonanztomographie des Beines, Kraftmessung der Wadenmuskulatur am Dynamometer etc. durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sollen mit den Ergebnissen von Astronauten verglichen werden. Das Hauptinteresse der Forschung in diesem Bereich liegt darin, mit Analysen, Beschreibung und weiterem Verständnis von alters- und sportbezogenen Prozessen, altersassoziierten Pathologien und damit verbundenen Komorbiditäten entgegenzuwirken sowie diese frühzeitig und gezielt zu behandeln. Möglicherweise könnten daraus auch prophylaktische und therapeutische Empfehlungen abgeleitet werden. Bei stetig wachsender Lebenserwartung der Menschen scheint die Rolle der körperlichen Aktivität und deren Auswirkungen stärker in den Fokus der Naturwissenschaften und der Gesellschaft im Allgemeinen zu rücken. Das Verständnis der strukturellen Veränderungen des menschlichen Muskel- und Bindegewebes sollte auch eine bessere Vorhersage von altersbedingten myopathologischen Veränderungen ermöglichen. Beispielsweise sind Bindegewebsp pathologien oft eng mit Veränderungen in der Zusammensetzung und Struktur der EZM verbunden.¹⁷ Dies wurde auch bei Erkrankungen des Knorpelgewebes wie Arthrose und Bandscheibendegeneration untersucht und beschrieben.¹⁷

Im Rahmen der MALICoT-Studie wurde Biopsiematerial von jungen und alten trainierten Personen und jeweils einer untrainierten Kontrollgruppe gewonnen. Somit war ein Vergleich dieser Gruppen möglich. Die Teilnahme an der Bearbeitung und Auswertung dieses Probenmaterials, als Teil der MALICoT-Studie war die Aufgabe der vorliegenden Dissertation.

2.4 Ziele der Arbeit

In den bisherigen Studien blieb bis jetzt ungeklärt, inwieweit Sport und insbesondere altersabhängiger Sport im menschlichen Körper zu Veränderungen des Bindegewebes und im Speziellen des Endomysiums führt. Insbesondere der Bereich der IMCT-Anpassung und -Plastizität ist noch wenig erforscht.¹⁵ Wir wissen, dass im Alter ein Rückgang der Muskelmasse und der Fähigkeit zur aktiven Krafterzeugung auftritt.²⁷ Des Weiteren wird eine IMCT-Versteifung und die bereits erwähnte

Zunahme der IMCT im Alter beschrieben.²¹ Der Einfluss von Sport auf das Bindegewebe fand bisher wenig bis keine Berücksichtigung, zudem gibt es keine Informationen und Empfehlungen über die beste und zuverlässigste Art der Quantifizierung dieser Veränderungen.²⁷ Andere Untersucher wiesen bereits darauf hin, dass der Einfluss von Bewegung auf die Anpassungsvorgänge, die Flexibilität und die Elastizität des gesamten Muskel-Sehnenapparates und des IMCT in zukünftigen Forschungsvorhaben Berücksichtigung finden sollte.^{6,39} Dies war ein Grund, warum wir uns auf endomysiale Veränderungen und deren Quantifizierung im Sport und im Alter konzentriert haben. Um eine Vergleichsgröße der Flexibilität und Elastizität zu haben, wurden in dieser Arbeit Daten für die Darstellung der Gewundenheit der Muskelfasern und damit auch des angrenzenden Endomysiums, berechnet. Gosselin et al. konnten am Musculus soleus von Ratten zeigen, dass die Kollagenkonzentration des Bindegewebes im Alter zunimmt, während Sport diesen Veränderungen scheinbar nicht entgegenwirkt.³⁶ Zudem konnte in einer Immobilisationsstudie eine Zunahme der Kollagen-III-Isoformen gezeigt werden.⁴⁰ Das Alter stellt einen entscheidenden Faktor für Veränderungen der molekularen Struktur und des molekularen Musters der Gewebe und ihrer Zusammensetzung dar. Bisher wurde eine altersbedingte Anreicherung des Kollagengehaltes in der EZM mit einer reduzierten Anzahl elastischer Fasern in der Literatur beschrieben.⁶ Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass das Endomysium durch das Alter und den Trainingszustand beeinflusst wird. Um einen detaillierten Überblick über diesen Aspekt zu erhalten, wurden die Gewebekomponenten Laminin γ -1, Kollagen IV, sowie Kollagen I und III im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Weiterhin sind wesentliche Teile dieser Arbeit zur Zeit in Vorbereitung für eine Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Fachpublikation.

3. Material und Methoden

I. Ethikfreigabe

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Nordrhein (Aktenzeichen 2018143) in Düsseldorf, Deutschland, genehmigt und im deutschen Register für klinische Studien (DRKS-ID: DRKS00015764) registriert. Alle Probanden gaben vor ihrer Teilnahme an der Studie ihre schriftliche Einwilligung nach Aufklärung.

II. Studiendesign

Insgesamt wurden 43 gesunde männliche Probanden (Body-Mass-Index $\leq 28 \text{ kg/m}^2$) in die Studie integriert. Die Probanden wurden in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt: 10 junge männliche Sportler und 12 junge männliche Nicht-Sportler (20 - 35 Jahre), 10 ältere männliche Sportler und 11 ältere männliche Nicht-Sportler (60 - 75 Jahre). Die Probanden wurden mittels Anzeigen auf der Website des Instituts, durch soziale Medien, über Sportvereine, Trainer und DLR-Mitarbeiter rekrutiert. Sie mussten weiterhin einen Fragebogen zu ihrer sportlichen Aktivität ausfüllen, es wurden Blutproben entnommen, anthropometrische Daten erhoben und ein Vertikalsprungtest durchgeführt. In die Gruppe der Sportler wurde aufgenommen, wer mindestens vier Stunden pro Woche Lauftrainings absolviert und an Sprint-, Sprung- und Laufwettbewerben teilnimmt.⁴¹ Probanden, die der Gruppe der Nicht-Sportler zugeordnet wurden, waren wenig, bis gar nicht sportlich aktiv, was anhand eines aktivitätsbezogenen Energieverbrauchs von ≤ 2 metabolischen Einheiten pro Woche definiert wurde.⁴¹ Um den aktivitätsbezogenen Energieverbrauch pro Woche zu ermitteln wurde der Freiburger Fragebogen zur Bemessung der körperlichen Aktivität herangezogen.⁴² Die Zuordnung der Messwerte zu den Probanden war für die Untersucher verblindet. Für jeden Probanden ergab sich eine dreistellige Buchstaben - Zahlenkombination.

3.1 Biopsieerhebung

Bei den 43 MALICoT-Teilnehmern wurden zu Beginn der Studie unter sterilen Bedingungen Muskelbiopsien aus dem Musculus soleus entnommen. Die lokale Anästhesie erfolgte mit Lidocain. Das Muskelgewebe wurde mit einem Vacora-Vakuum-Biopsiesystem (VF2019) von Bard mit Vacora-Biopsienadeln 10G 118mm gewonnen. Es wurden etwa 150 - 200 mg Muskelgewebe pro Proband entnommen. Die Muskelbiopsieproben wurden mit Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura) mit einer auf den transversalen Schnitt angepassten Faserausrichtung ausgerichtet, sofort in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Isopentan schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die gefrorenen Muskelbiopsien wurden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Mikrotom (Leica CM 1850 UV) geschnitten. Schnitte von $6 \text{ }\mu\text{m}$ wurden auf Objektträger übertragen und bis zur Färbung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2 Färbeprotokoll Laminin γ -1 und Kollagen IV

Die Schnitte wurden bei RT getrocknet und anschließend wurden die Inkubationsbereiche der Proben auf den Objektträgern mit einem Fettstift markiert,

10 Minuten in 0,5%igem PFA fixiert und dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten mit 5% NGS in PBS und 0,2% Tween-20 blockiert. Danach wurden die Antikörper anti-Laminin γ -1 (Immundiagnostik AG, AP1001.2, polyklonaler Ak) in einer Verdünnung von 1:200 und anti-Kollagen IV (abcam, AB86042, monoklonaler Ak) in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierlösung aufgetragen. Zur Inkubation ruhten die Proben eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer. Dann wurden die Objektträger 6-mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper aufgetragen: Anti-Kaninchen Alexa 568 (Invitrogen, A-11011, polyklonaler Ak) und Anti-Maus Alexa 647 (Invitrogen, A-21236, polyklonaler Ak), beide in einer Verdünnung von 1:500 in Blockierlösung zusammen mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT, geschützt vor Licht. Der anschließende Waschschrift erfolgte mit 0,5% Triton X-100, 3-mal für 15 min. und PBS 5-mal für 15 min. Danach erfolgte eine kurze Spülung mit Aqua dest. sowie die Einbettung in Mowiol/DABCO. Die Proben wurden bei RT für 24 Stunden im Dunkeln getrocknet und bei 4°C gelagert.

3.3 Färbeprotokoll Kollagen I und III

Für die Färbung von Kollagen I und III wurden die Schnitte ebenfalls nach der Markierung der Inkubationsbereiche mit einem Fettstift für 10 Minuten in 0,5%igem PFA fixiert und dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit 10% NGS in PBS, 0,15% Glycin und 0,2% Tween-20 für 3h blockiert. Danach wurden die Antikörper anti-Kollagen Type I (Sigma-Aldrich, C2456, monoklonaler Ak) in einer Verdünnung von 1:100 und anti-Kollagen Type III (Merck-Millipore, MAB3392, monoklonaler Ak) in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierlösung aufgetragen. Zur Inkubation ruhten die Proben eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer. Dann wurden die Objektträger 6-mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde jeweils der Sekundärantikörper, Anti-Maus Alexa 647 (Invitrogen, A-21236, polyklonaler Ak), in einer Verdünnung von 1:500 in Blockierlösung zusammen mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen. Dem folgte eine 45-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT, geschützt vor Licht. Der anschließende Waschschrift erfolgte mit 0,5% Triton X-100, 3-mal für 15 min. und PBS 5-mal für 15 min. Anschließend erfolgte eine kurze Spülung mit Aqua dest. sowie die Einbettung in Mowiol/DABCO. Die Proben wurden bei RT für 24 Stunden im Dunkeln getrocknet und bei 4°C gelagert.

3.4 Bilderanalyse

Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit dem Zeiss Axio Imager.M2 Mikroskop mit 40x Öl-Objektiv (NA 1,4) gegenüber der Gruppenzuordnung verblindet aufgenommen. Für jeden Probanden erfolgte die gezielte Datenerhebung mit anschließender Analyse anhand eines Schnittbildes jeweils für die Färbungen von Laminin γ -1 und Kollagen IV, Kollagen I sowie Kollagen III. Als Software zur Untersuchung und Auswertung des Bindegewebes wurde Zeiss Zen 3.4 (blue edition) verwendet. Für jede Probe wurde die Region of interest (ROI) als ein Areal mit für den Untersucher ersichtlich guter Qualität hinsichtlich einer transversalen Orientierung des Muskelfaseranschnitts, einer Abwesenheit von Perimysium und ohne Schnitt- und Färbeartefakte für die Analyse ausgewählt. Jede dieser Regionen enthielt typischerweise etwa 50 - 200 Muskelfasern. Es wurden Daten für die Faserfläche, die ROI-Fläche, den Faserumfang, den durchschnittlichen Faserdurchmesser, das maximale Feret, das minimale Feret, das Feretverhältnis der histologischen Schnitte von Laminin γ -1 und Kollagen IV erhoben. Ein Feret ist als Abstand zwischen zwei parallelen Ebenen definiert und kann für die Beschreibung der Querschnittsfläche eines dreidimensionalen Objekts herangezogen werden. Die Tortuosität, auch als Gewundenheit einer Struktur bezeichnet, wurde ermittelt, indem die durch Zeiss Zen ermittelte Umfangslänge durch den Umfang einer Ellipse mit den entsprechenden Feret_min und Feret_max geteilt wurde (siehe s. 34).

Weitere Datensätze für Kollagen I und Kollagen III mit Fläche, Höhe und Breite der ROI und dem Anteil von Kollagen I und Kollagen III Fasern und Muskelgröße wurden erstellt. Der Schwellenwert für die Fluoreszenzdetektion wurde für jede Probe individuell durch den Untersucher festgelegt. Die statistische Analyse wurde in dem Statistikprogramm R durchgeführt.

3.5 Datenerhebung der Laminin γ -1 und Kollagen IV Färbungen

Es wurden Einzelaufnahmen der immunhistochemischen Färbungen von Laminin γ -1 und Kollagen IV erstellt. (siehe Abb.1 und 2)

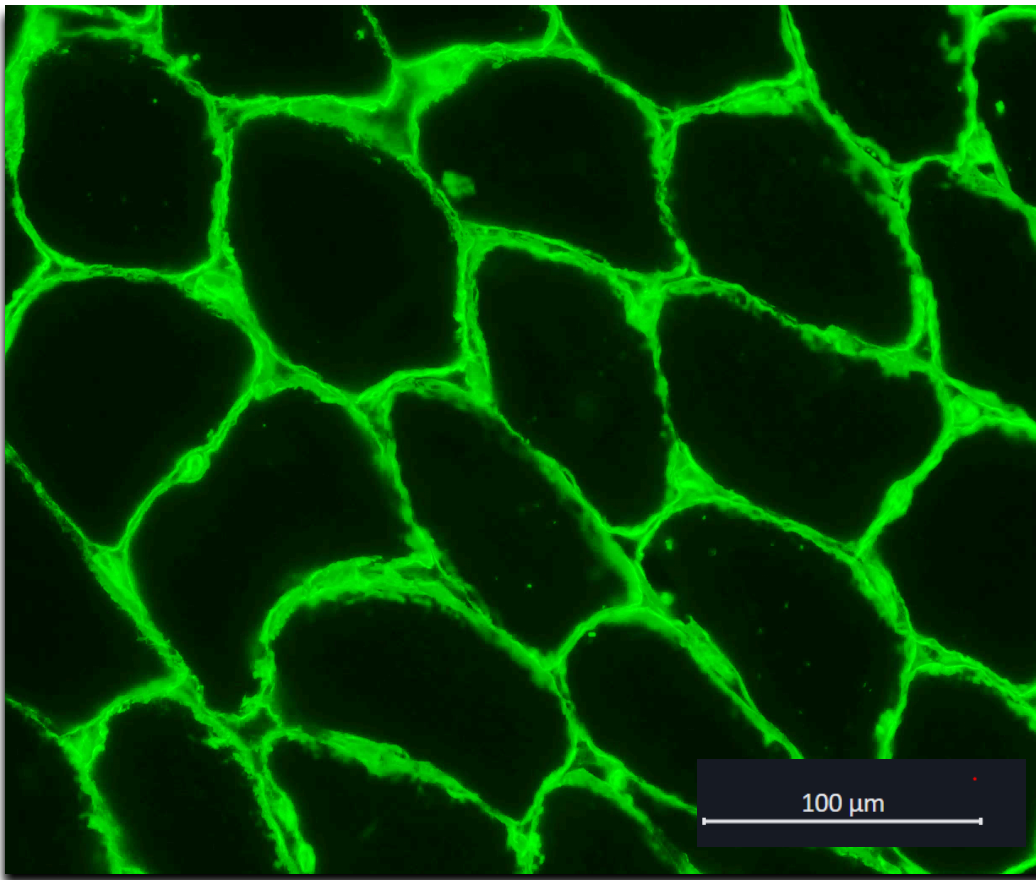


Abb.1 Färbung Laminin γ -1, Alexa Fluor 568, in grün, Muskelfasern schwarz, Proband DP4,

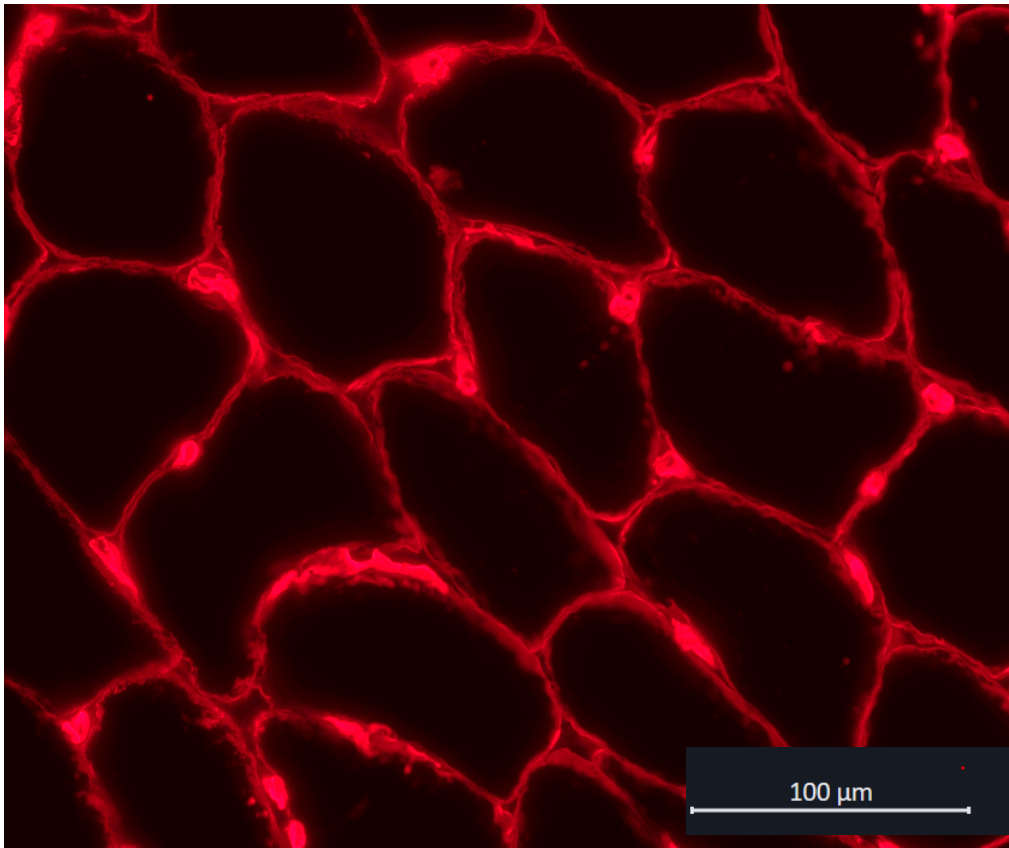


Abb.2 Färbung Kollagen IV, Alexa Fluor 647, in rot, Muskelfasern schwarz, Proband DP4,

Sowohl Laminin γ -1 als auch Kollagen IV sind essenzielle Bestandteile des Endomysiums. In der Bildauswertung ergaben sich für die Messergebnisse der einzelnen Färbungen keine Unterschiede. Somit wurden beide Fluoreszenzkanäle mittels Software Zeiss Zen 3.4 gemeinsam ausgewertet.

3.6 Auswahlkriterien für die statistische Analyse von Laminin γ -1 und Kollagen IV

Es wurden zunächst verschiedene Grade der Verstärkung der Intensitäten der immunhistochemischen Gewebemarker miteinander verglichen. Dies sollte dem Zweck dienen, herauszufinden, ob durch die Verstärkung der Intensität andere und gegebenenfalls genauere Messergebnisse erzielt werden können. Es wurden zum Beispiel versuchsweise die zusammengeführten Laminin_ γ -1_Kollagen_IV_Färbungen einmal 10-fach und ein anderes Mal 30-fach verstärkt.

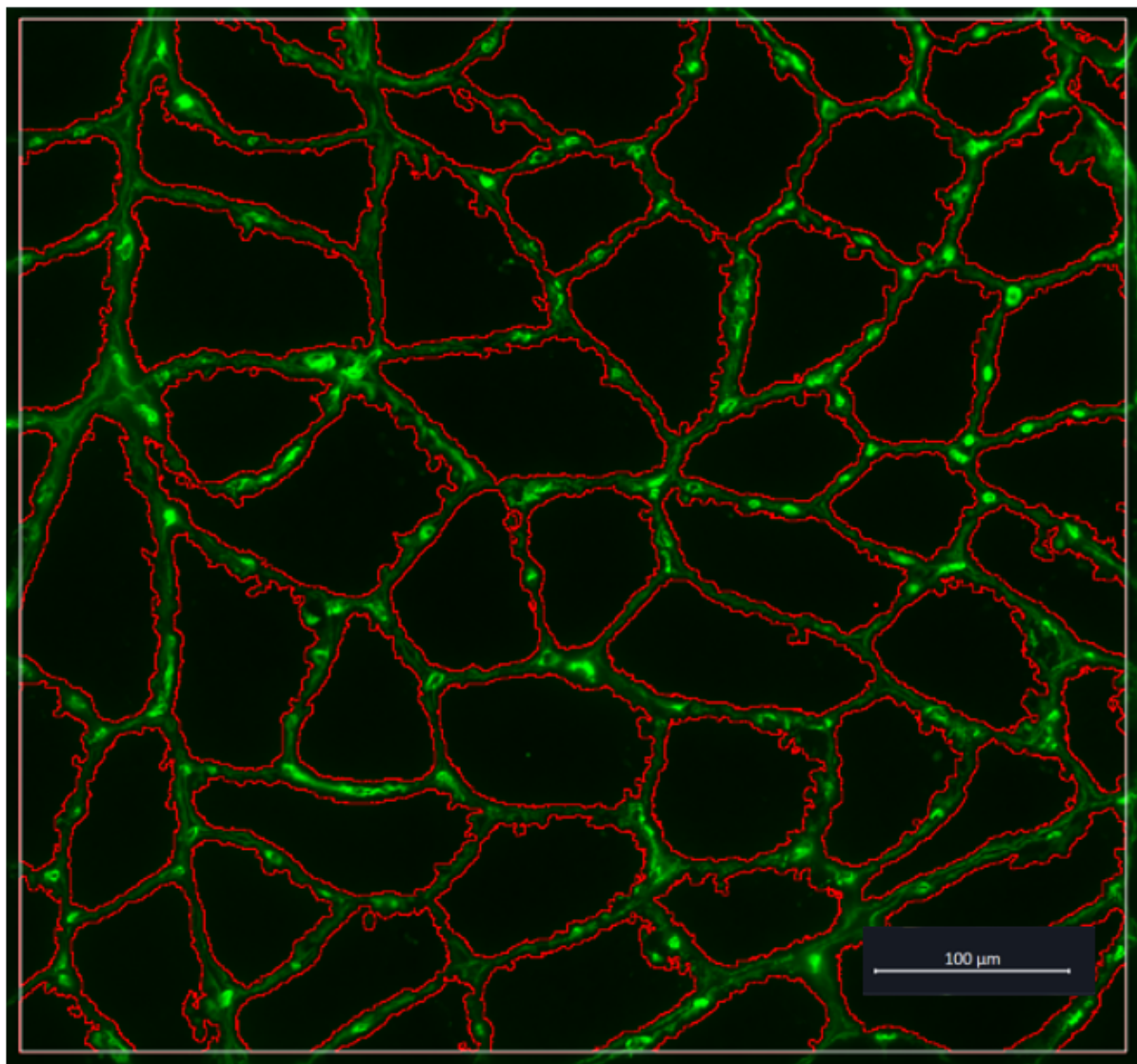


Abb.3 histologisches Schnittbild, Gewebefärbung kombinierte Signale Laminin_ γ -1_Kollagen_IV_10x (grün), Zeiss Zen ermittelter Umfang Muskelfaser (rot), Region of interest (weißes Viereck), Software Zeiss Zen 3.4

Da es keinen Unterschied in den statistischen Ergebnissen bezüglich der Verstärkung der Intensität gab, entschieden wir uns, das Laminin γ -1- und das Kollagen IV-Signal unverstärkt für die statistische Analyse zu wählen.

Anschließend wurde für jede Probe eine ROI mit einer ähnlichen Größe ausgewählt. Das Programm Zeiss Zen 3.4 war in der Lage, aus den Fluoreszenzsignalen das Endomysium (hohe Signalintensität) und die Muskelfasern (Hintergrundsignalintensität) zu identifizieren und zeigte uns die gewünschten Parameter an. (siehe Abb.3, 4, 5 und 6)

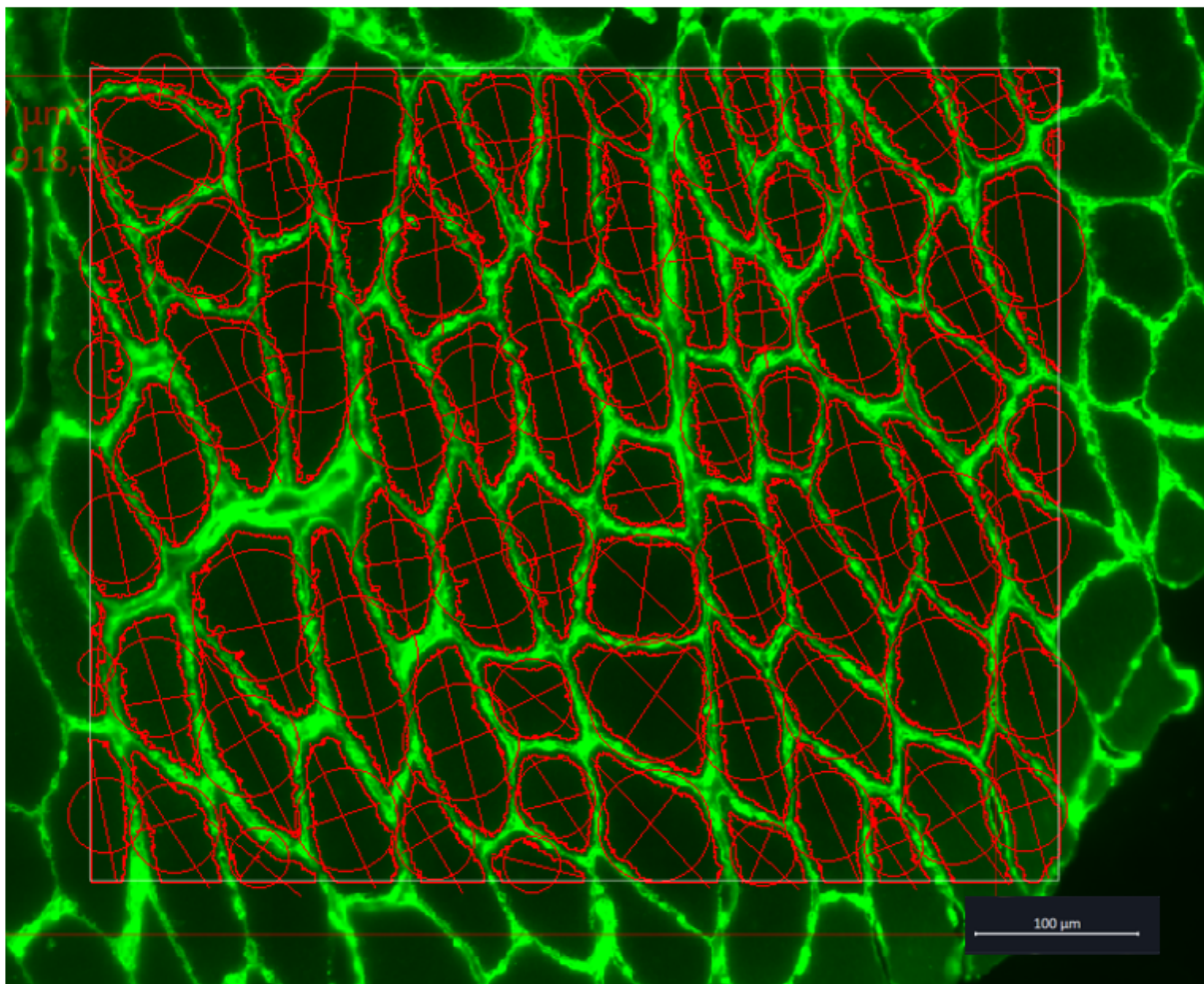


Abb.4 histologisches Schnittbild, Proband ED5, Laminin γ -1_Kollagen_IV in grün, eingezeichnete ROI (weißes Viereck), Umfang, maximaler und minimaler Feret, korrigierter Umfang der Muskelfasern (rote Markierungen), Zeiss Zen 3.4

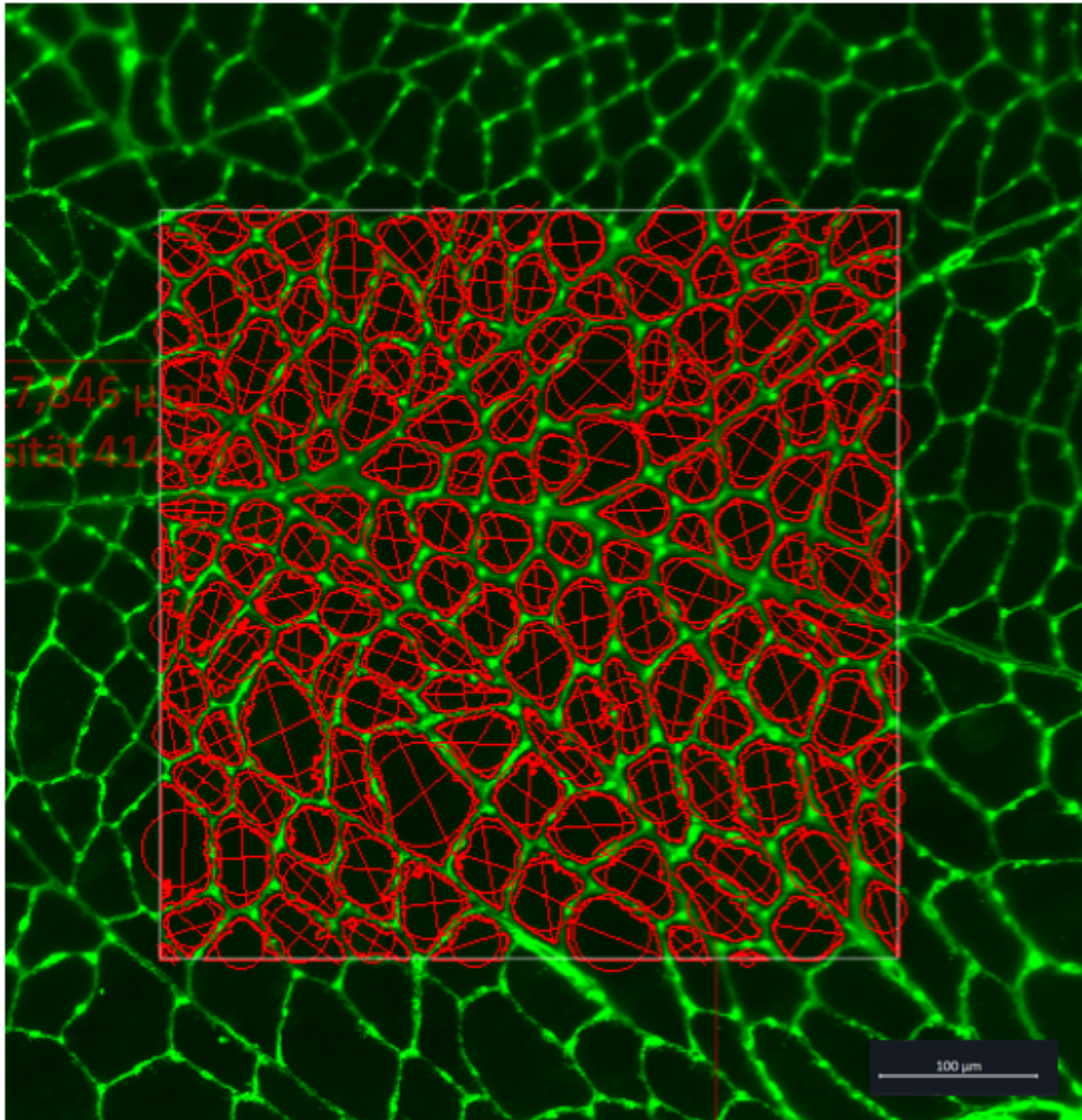


Abb.5 histologisches Schnittbild, Proband BW3, Laminin_γ-1_Kollagen_IV in grün, eingezeichnete ROI (weißes Viereck), Umfang, maximaler und minimaler Feret, korrigierter Umfang der Muskelfasern (rote Einzeichnungen), Software Zeiss Zen 3.4

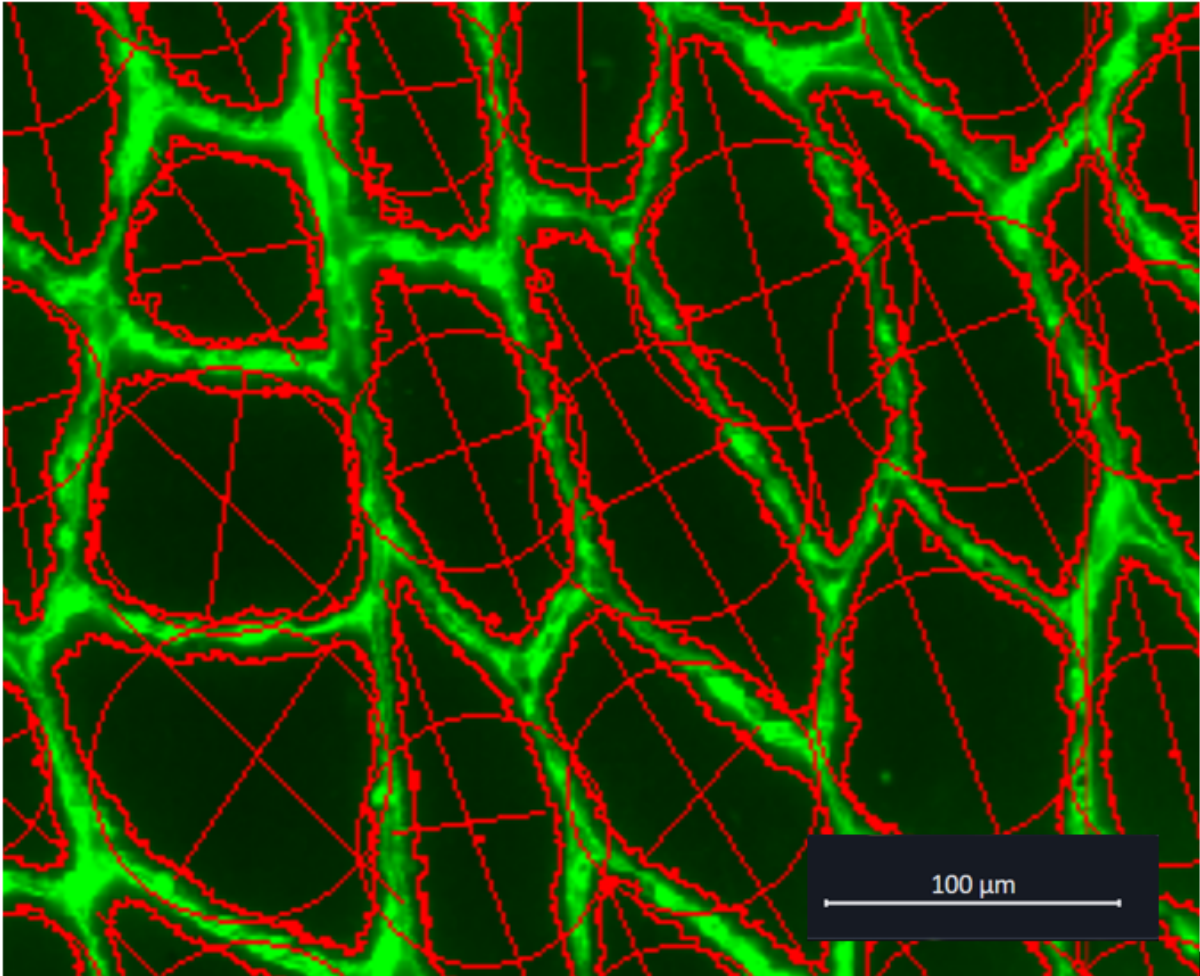


Abb.6 histologisches Schnittbild, Laminin γ -1_Kollagen_IV, einfach verstärkt, Ausschnittvergrößerung, Faseranalyse, rot markiert sind Umfang, maximaler und minimaler Feret sowie der korrigierte Umfang der Muskelfasern als roter Kreis, Software Zeiss Zen 3.4

Die Gesamtfaserzahl wurde von Zeiss Zen 3.4 bestimmt. Die Anzahl der beschnittenen, also der randständigen Fasern, wurde zusätzlich manuell ermittelt. (siehe Abb.7)

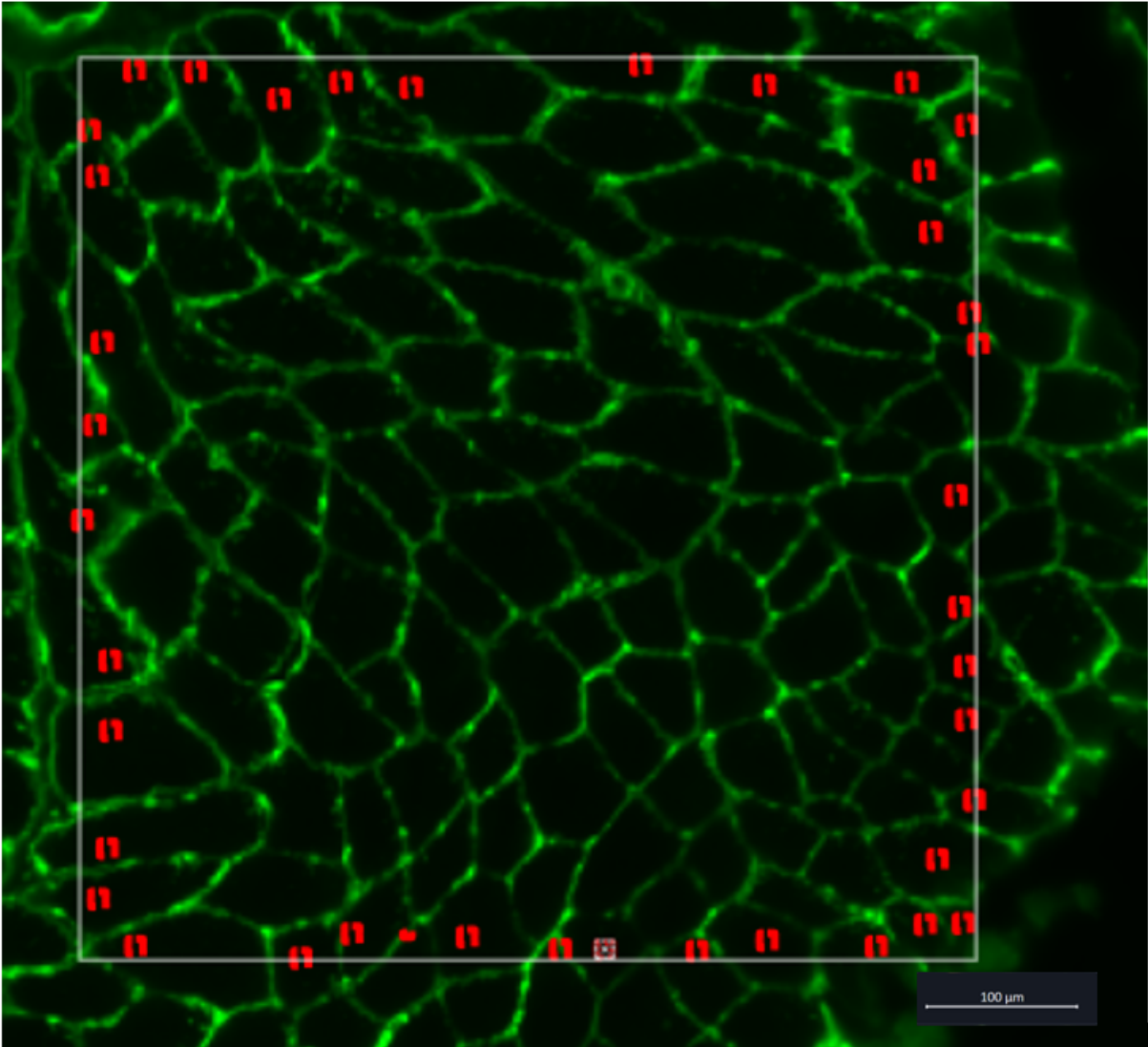


Abb.7 histologisches Schnittbild, Proband_PN8_Laminin_γ-1_Kollagen_IV in grün, Beispiel für die händische Zählung der randständigen Muskelfasern, markiert mit roten Punkten, Region of interest (weißes Viereck)

Es folgte die Prozessierung der Daten mittels folgender Formeln.

Die Endomysiumdicke wurde berechnet mit:

$$\text{Endomysiumdicke} = \frac{A_{Tot_{Endo}}}{0.5 \cdot \Sigma \text{Perimeter} - \text{PerimeterROI}}$$

Das Endomysium zu Faserflächenverhältnis (EFAr) wurde berechnet mit:

$$EFAr = 100 \cdot \frac{A_{Tot_{Endo}}}{A_{Tot_{Fibre}}}$$

Das Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (EFNr) wurde berechnet mit:

$$EFNr = \frac{A_{Tot\ Endo}}{N_{Fibre\ inner} + N_{outer\ adjusted}}$$

$A_{Tot\ Endo}$ bezeichnet die Gesamtfläche des Endomysiums. $A_{Tot\ Fibre}$ steht für die gesamte Muskelfaserfläche.

Die Anzahl randständiger $N_{Fibre\ outer}$ und innerständiger Fasern $N_{Fibre\ inner}$ für die oben aufgeführte Berechnung wurde durch die Software Zeiss Zen ermittelt.

Zur Identifizierung der randständigen Zellen wurde der Abstand zum Rand in Vielfachen des jeweils erhaltenen minimalen Feret gemessen. Als Schwellwert, ab dem eine Faser als randständig gezählt wurde, ist durch empirische Überprüfung das durchschnittliche minimale Feret des Datensatzes des jeweiligen Probanden festgelegt worden.

Alle Zellen, deren mittels Software erhaltenen Zentroide (geometrische Zentren der Muskelfasern) näher zum Rand waren als der jeweils durchschnittliche minimale Feret des jeweiligen Schnittes wurden als randständige Fasern $N_{Fibre\ outer}$ gezählt.

Um die Anzahl der empirisch ermittelten randständigen Fasern auf die gemessene Endomysiumfläche anwenden zu können wurde die Anzahl der randständigen Fasern $N_{Fibre\ outer}$ mittels untenstehender Formel adjustiert $N_{outer\ adjusted}$.

$$N_{outer\ adjusted} = \frac{A_{Tot\ Fibre\ Outer}}{A_{Mean\ Fibre\ Outer}}$$

$A_{Tot\ Fibre\ Outer}$ bezeichnet die Gesamtfläche der oben ermittelten randständigen Fasern. Hierfür wurde die durchschnittliche Faserfläche der randständigen Fasern mit der randständigen Faseranzahl multipliziert. $A_{Mean\ Fibre\ Inner}$ steht für die durchschnittliche

Muskelfaserfläche der innerständigen Fasern. Somit konnte dann die EFNr berechnet werden.

Die Formeln sind an die Methoden der Arbeit von Thot et al. angelehnt, in der die Auswirkung von Langzeitimmobilisation auf das Endomysium untersucht wurde.³⁸

Die Gewundenheit wurde berechnet mit der Formel:

$$\text{Tortuosität} = \frac{\text{Peri}}{2 \cdot \pi \cdot \sqrt{\frac{\text{Feret}(\text{Min})^2 + \text{Feret}(\text{Max})^2}{8}}}$$

Grundlage für diese Formel liefert die Annahme, dass die Gewundenheit als das Verhältnis des gemessenen Umfangs durch den Umfang einer Ellipse mit den entsprechend gemessenen Feret(Min) und Feret(Max)-Werten dargestellt werden kann.

3.7 Datenerhebung der Kollagen I und Kollagen III Färbungen

Die Datenerfassung für die statistische Analyse von Kollagen I und Kollagen III erfolgte auf die folgend beschriebene Weise. Zunächst wurden die Bindegewebsbereiche der Immunfluoreszenzaufnahmen (siehe Abb.8) mittels Zeiss Zen Software markiert (siehe Abb.9) und die eingezeichneten ROIs mit Irfanview 64 v.4.60 in schwarz-weiß Bilder umgewandelt. (siehe Abb.10) Anschließend wurden die Daten mittels Cell Profiler v.4.2.1 und mit Irfanview 64 v.4.60 erhoben.

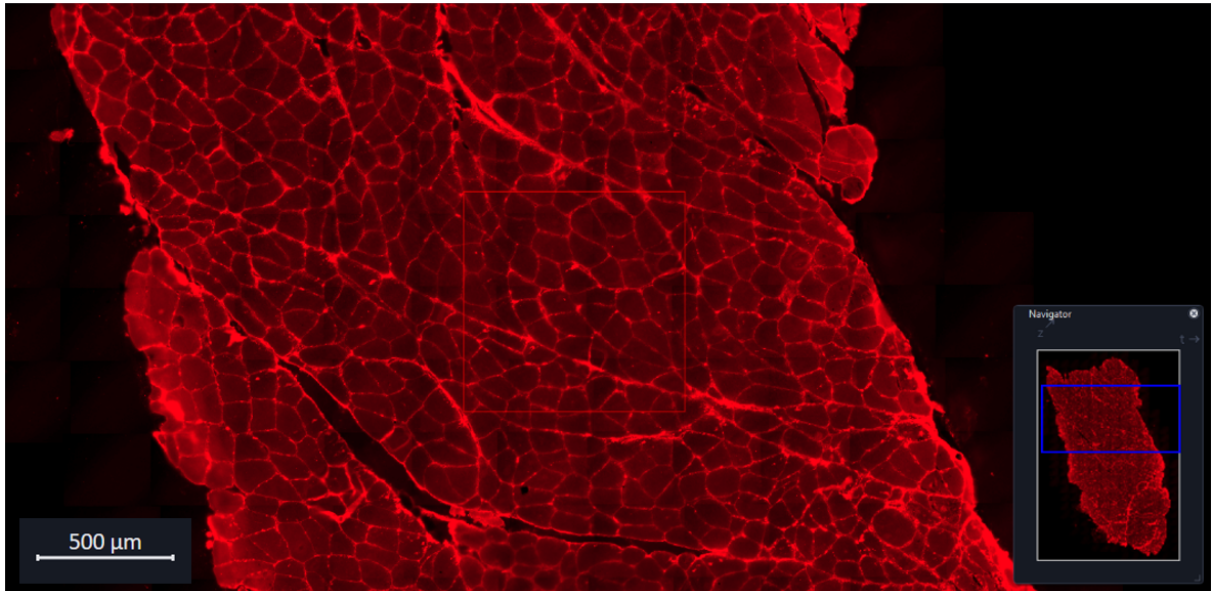


Abb.8 histologisches Schnittbild, Proband_MS7_Kollagen_I_ROI_Auswahl in rotem Viereck, Bindegewebe rot, hier Muskelfasern mit stärkerem Hintergrundsignal, Navigatorfenster unten rechts zur Orientierung auf dem Schnittbild.

Die ROI-Maße wurden in Zeiss Zen 3.4 vermessen. So erhielten wir die Gesamtfläche, Höhe und Breite jeder Region.

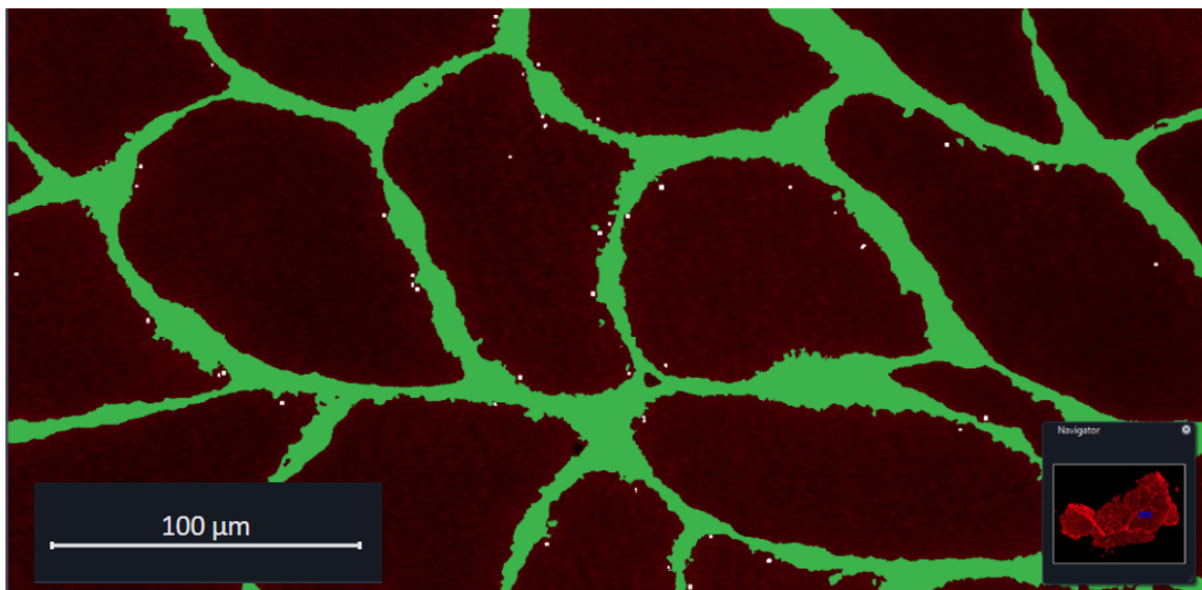


Abb.9 histologisches Schnittbild, Proband_MS7_Kollagen_I, nach Segmentierung durch Zeiss Zen 3.4 in grün dargestellt, Muskelfasern mit schwachem Hintergrundsignal der Kollagen-Fluoreszenzfärbung, Navigatorfenster unten rechts zur Orientierung auf dem Schnittbild

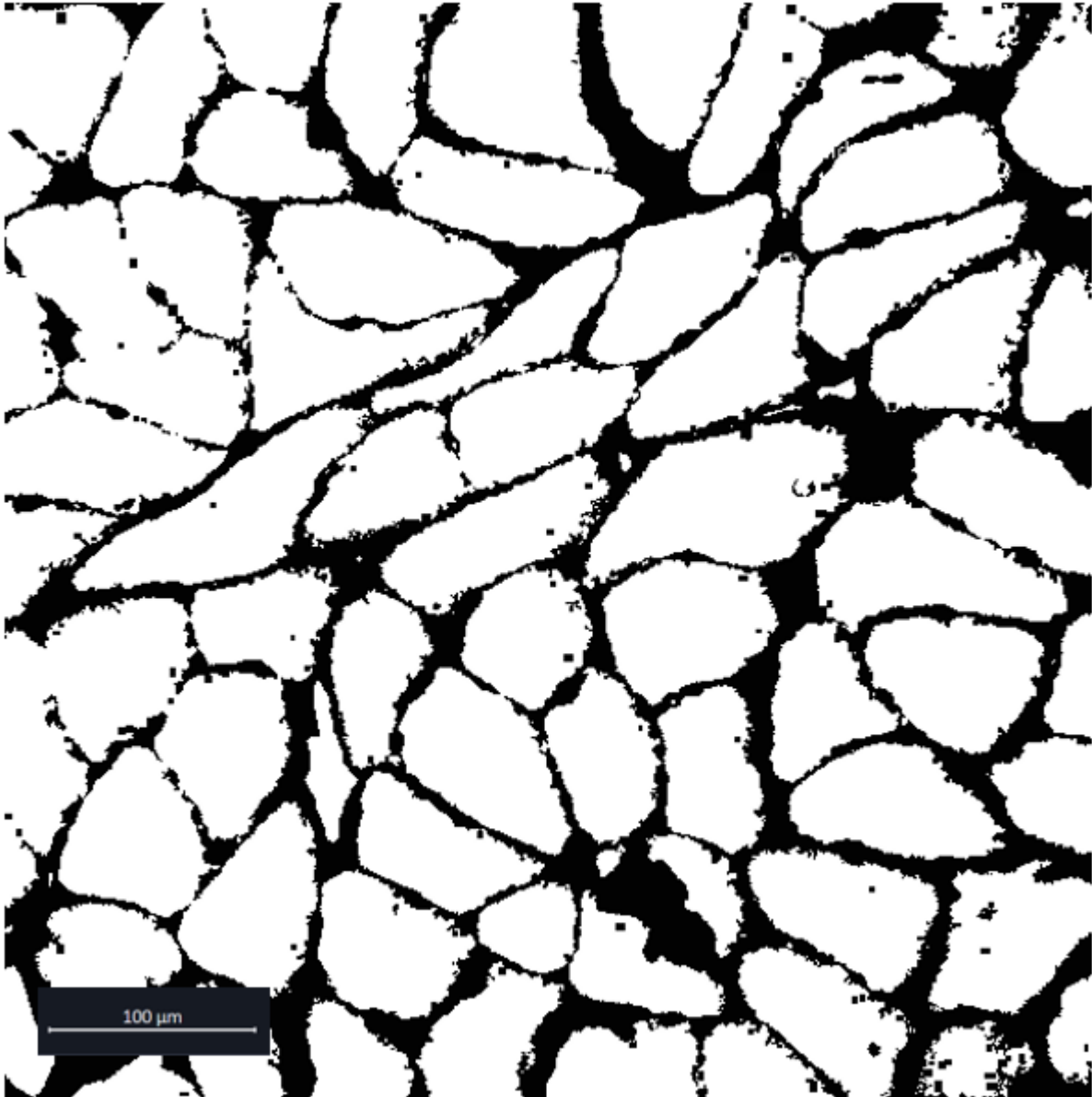


Abb.10 histologisches Schnittbild, Proband_ QP4_Kollagen_I, konvertiert in schwarz-weiß Bild mittels Irfanview. v.4.60, Muskelfaser weiß, Bindegewebe schwarz, Irfanview v. 4.60

Ein erster Versuch einer Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen durch die Software Cell Profiler v. 4.2.1 ergab teilweise nicht schlüssige Ergebnisse für die Faser- und Bindegewebsflächen, weil die automatisierte Erkennung von Muskelfasern vielfach nicht korrekt funktionierte. Daher berechneten wir die Fläche der Fasern und des Bindegewebes schließlich manuell, indem wir die Gesamtpixelzahl der ROI, sowie die der schwarzen und weißen Pixel nach schwarz-weiß Konvertierung mit Hilfe des Histogramms in Irfanview v. 4.60 ermittelten. (siehe Abb.11)

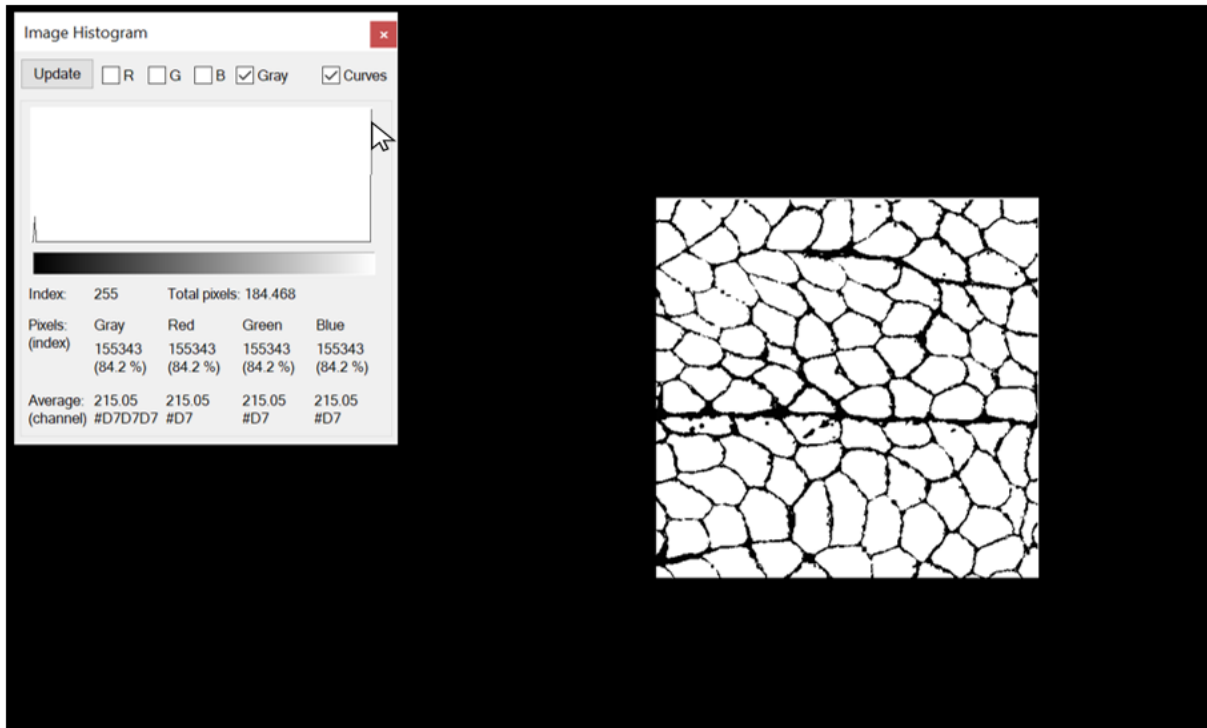


Abb.11 Proband BK1_Kollagen_I Muskelfaser und Bindegewebsanalyse mittels Irfanview v.4.60, Histogramm mit Angabe der Pixel, Mauszeiger zeigt die Anzahl weißer Pixel an, Muskelfaser weiß, Bindegewebe schwarz, Irfanview v.4.60

Mit Hilfe des Open Source Programms Irfanview v. 4.60 war es damit möglich, Gesamtfläche, Faserfläche und die Areale, welche die Bindegewebsfärbungen aufnahmen, mittels Pixelanalyse zu quantifizieren. Gesamtfaseranzahl und randständige Fasern wurden händisch an den schwarz-weißen Bildern ausgezählt. Die Fasern des Kollagen-ROI-Bereichs wurden dreimal gezählt, der durchschnittliche Wert wurde ermittelt und zur Analyse herangezogen. (siehe Abb.12)

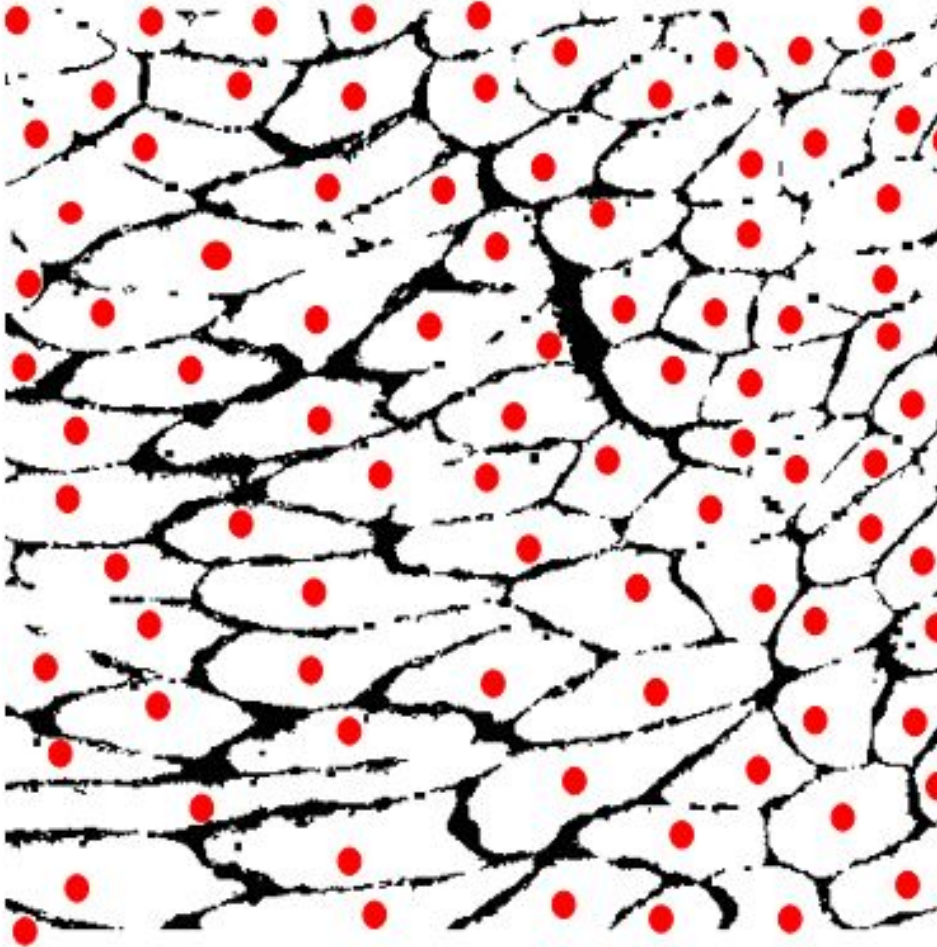


Abb.12 BK1_Kollagen_I, händische Faserzählung, markiert durch rote Punkte, Muskelfasern weiß, Bindegewebe schwarz

Es folgte die Prozessierung der Daten mittels folgender Formeln.

Das Endomysium zu Faserflächenverhältnis (EFAr) wurde berechnet mit:

$$EFAr = \frac{A_{Tot\ Endo}}{A_{Tot\ Fibre}}$$

$A_{Tot\ Endo}$ bezeichnet die Gesamtfläche des Endomysiums. $A_{Tot\ Endo}$ steht für die gesamte Muskelfaserfläche.

Das Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (EFNr) wurde berechnet mit:

$$EFNr = \frac{A_{Tot_{Endo}}}{N_{NonBorder} + 0,5 \cdot N_{Border}}$$

N_{Border} beschreibt die Anzahl der randständigen Muskelfasern. $N_{NonBorder}$ gibt die Anzahl der vollständigen Muskelfasern innerhalb der ROI an. Der Faktor 0,5 wurde gewählt, da die händisch randständig gezählten Fasern aufgrund ihres nicht vollständigen Vorhandenseins innerhalb der ROI adjustiert in die Berechnung des EFNr einfließen.

Eine äquivalente Darstellung der Tortuosität von Kollagen I und III, wie bei Laminin γ -1 und Kollagen_IV war dahingehend leider nicht möglich, da die Methode zur Darstellung von Kollagen_I und Kollagen_III den Umfang der einzelnen Fasern (Perimeter) und die Feret(min) und Feret(max) nicht erfassen konnte.

4. Ergebnisse

Nachdem die Daten der vier verschiedenen Gruppen: junge männliche Sportler (20 - 35 Jahre), junge männliche Nicht-Sportler (20 - 35 Jahre), alte männliche Sportler und alte männliche Nicht-Sportler (60 - 75 Jahre) erhoben wurden, erfolgte die gezielte statistische Auswertung. Die mittels Software Zeiss Zen erhaltenen Daten wurden als CSV-Dateien exportiert. Für die Testung der Hypothese, welchen Einfluss das Alter und der Sport auf das Endomysium haben und für die explorativen Gruppenanalysen wurde eine Analysis of variance (ANOVA) verwendet. Für die statistische Analyse der Daten von Kollagen I und III der jeweiligen Gruppen untereinander wurde der Welch's t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0.05$ gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistikprogramme R, Microsoft Excel und GraphPad PRISM. Die Ergebnisse sind in den Graphen als Boxplots mit Median und Interquartilsabständen respektive Median, Maxima und Minima dargestellt.⁴¹ Eine tabellarische Auflistung der den Graphiken und Berechnungen zugrundeliegenden Daten finden sich im Tabellenverzeichnis dieser Arbeit (Tab.1 - 7).

4.1 Statistische Analyse Laminin γ -1 und Kollagen IV

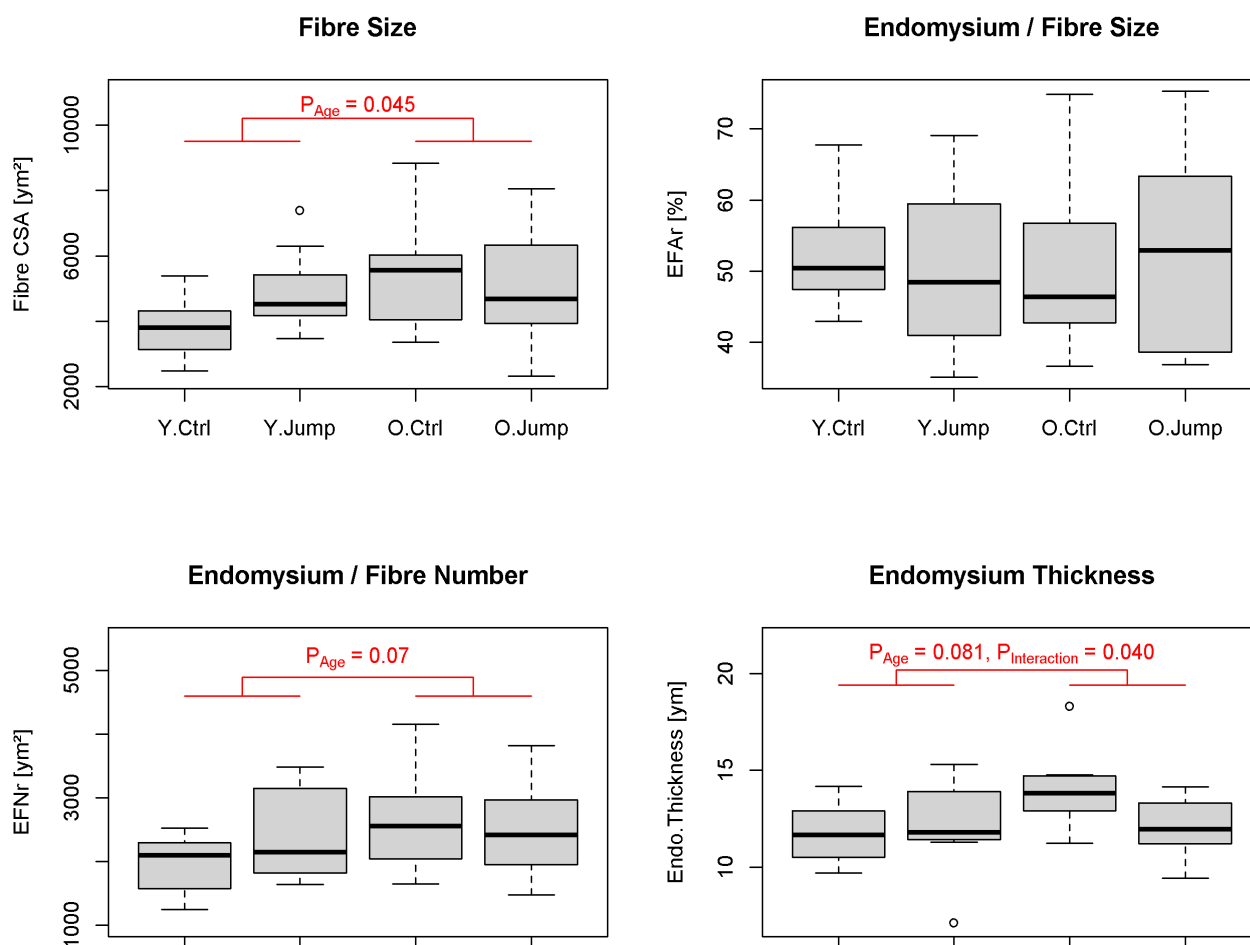


Abb.13 Statistische Ergebnisse Laminin γ -1_Kollagen_IV, dargestellt sind: die Fasergröße CSA, das Endomysium zu Faserflächenverhältnis EFAR, das Endomysium zu Faseranzahlverhältnis EFNr und die Endomysiumdicke in Abhängigkeit zu den vier Vergleichsgruppen Young Control (Y.Control, n = 12), Young Jump (Y.Jump, n = 10), Old Control (O.Control, n = 11), Old Jump (O.Jump, n = 10), Boxplots mit Median und Interquartilsabständen, die Graphik wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Für die kombinierten Färbungen von Laminin γ -1 und Kollagen IV ergab sich, ohne Berücksichtigung der sportlichen Aktivität, für die Muskelfaserquerschnittsfläche, hier als CSA (Cross sectional area) bezeichnet, eine signifikante Zunahme im Alter ($p_{\text{age}}=0,045$). Sie nahm von durchschnittlich $3.799 \mu\text{m}^2$ (SA=837) in der jungen Kontrollgruppe (Y.Control) auf durchschnittlich $5.344 \mu\text{m}^2$ (SA=1.626) in der alten Kontrollgruppe (O.Control) zu. Die durchschnittliche Muskelfaserquerschnittsfläche lag bei $4.922 \mu\text{m}^2$ (SA=1.171) in der jungen Sportgruppe (Y.Jump) und bei $5.052 \mu\text{m}^2$ (SA=1.923) in der alten Sportgruppe (O.Jump). Es wurde kein Effekt in Bezug auf den Trainingszustand oder eine Interaktion von Alter und Trainingszustand gefunden ($p=0,33$ bzw. $p=0,11$). Für das Verhältnis von Endomysium zu Faserfläche (EFAR) wurde kein statistischer Effekt beobachtet (alle $p>0,45$). Das Verhältnis von

Endomysium zu Faseranzahl (EFNr) zeigte einen Trend für die Zunahme im Alter ($p_{\text{age}}=0,07$) unabhängig vom Trainingsstatus. Es lag durchschnittlich bei 1.964 (SA=434) in der Gruppe Y.Control, beziehungsweise bei 2.414 (SA=666) in der Gruppe Y.Jump und bei durchschnittlich 2.594 (SA=746) in der Gruppe O.Control, beziehungsweise bei 2.494 (SA=784) in der Gruppe O.Jump. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung durch den Trainingszustand. Die Endomysiumdicke zeigte, unabhängig vom Trainingsstatus, einen Trend für die Zunahme im Alter ($p_{\text{age}}=0,08$). Die Werte lagen bei durchschnittlich 11,74 μm (SA=1,37) in der Gruppe Y.Control, beziehungsweise 12,23 μm (SA=2,37) in der Gruppe Y.Jump und bei durchschnittlich 13,84 μm (SA=1,9) in der Gruppe O.Control, beziehungsweise 11,98 μm (SA=1,53) in der Gruppe O.Jump. Es zeigte sich ein Interaktionseffekt innerhalb der vier Gruppen ($p_{\text{int}}=0,04$). Ein Haupteffekt für den Trainingszustand ließ sich jedoch nicht feststellen ($p=0,24$).

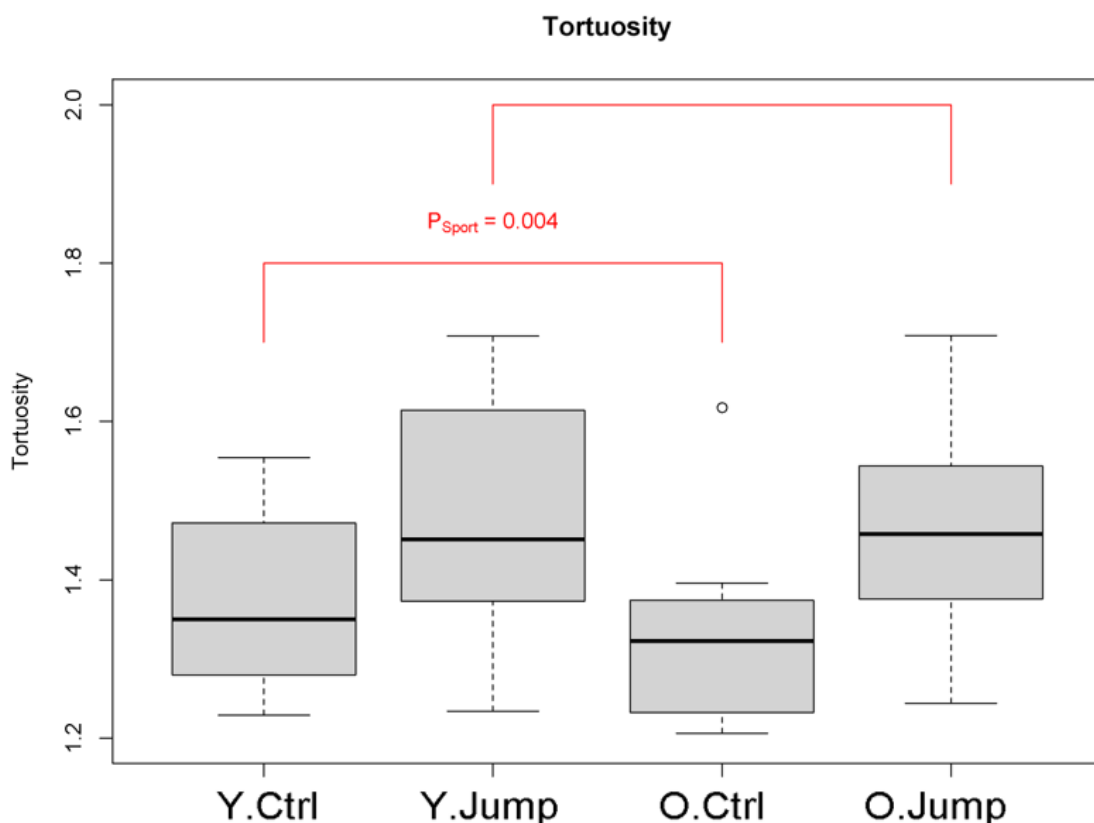


Abb.14 Endomysium Tortuosity/Tortuosität/Gewundenheit, dargestellt in Abhängigkeit zu den Gruppen Young Control (Y.Control, n = 12), Young Jump (Y.Jump, n = 10), Old Control (O.Control, n = 11), Old Jump (O.Jump, n = 10), Boxplots mit Median und Interquartilsabständen, die Graphik wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Die Gruppe Y.Control wies eine Gewundenheit von 1,37 (SA=0,11) auf, wobei die Gewundenheit der Gruppe der Y.Jump mit 1,47 (SA=0,16) stärker ausgeprägt war. Die Gruppe der O.Control wies mit 1,33 (SA=0,12) ebenso eine schwächere Gewundenheit auf als die der Gruppe O.Jump mit 1,47 (SA=0,13). Es zeigte sich somit ein signifikanter Haupteffekt für eine Zunahme der Gewundenheit durch Training ($p=0,004$), unabhängig vom Alter. Ein statistisch signifikanter Effekt in Bezug auf das Alter ohne Berücksichtigung der sportlichen Aktivität zeigte sich nicht ($p=0,60$). Ebenso wenig ergab sich ein Interaktionseffekt ($p=0,56$).

4.2 Statistische Analyse Kollagen I und Kollagen III

Für die Färbungen von Kollagen I ergab sich eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Bindegewebsdicke der sportlichen Gruppen mit dem Alter ($p=0,039$). Sie nahm von durchschnittlich 10,82 μm (SA=1,9) in der jungen Sportgruppe (Y.Jump) auf durchschnittlich 13,20 μm (SA=2,76) in der alten Sportgruppe (O.Jump) zu. Ebenso zeigte sich eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Bindegewebsdicke der Gruppe der Älteren bei erhöhter sportlicher Aktivität ($p=0,033$).

Die durchschnittliche Bindegewebsdicke lag bei 10,79 (SA=1,8) in der alten Kontrollgruppe (O.Control) und bei 13,2 μm^2 (SA=2,76) in der alten Sportgruppe (O.Jump).

Für die Färbungen von Kollagen I ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Muskelfaserquerschnittsfläche/CSA (Cross sectional area).

Für die Färbungen von Kollagen III ergab sich eine signifikante Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche/CSA (Cross sectional area) der Kontrollgruppen im Alter ($p=0,039$). Sie nahm von durchschnittlich 4.787 μm^2 (SA=1.242) in der jungen Kontrollgruppe (Y.Control) auf durchschnittlich 6.661 μm^2 (SA=2.466) in der alten Kontrollgruppe (O.Control) zu. Die durchschnittliche Muskelfaserquerschnittsfläche zeigte eine signifikante Zunahme der CSA in den Gruppen der jungen mit zunehmender sportlicher Aktivität ($p=0,045$). Sie nahm von 4.787 μm^2 (SA=1.242) in der jungen Kontrollgruppe (Y.Control) auf 6.284 μm^2 (SA=1.848) in der jungen Sportgruppe (Y.Jump) zu.

Die Bindegewebsdicke wies für die Färbungen von Kollagen III keine signifikanten Veränderungen auf (alle $p > 0,05$).

Es zeigten sich für das Verhältnis von Endomysium zu Faserfläche (EFAr) und das Verhältnis Endomysium zu Faseranzahl (EFNr) weder in den Daten für Kollagen I noch für Kollagen III statistisch signifikante Veränderungen (alle $p > 0,05$).

ROI-based / collagen-I

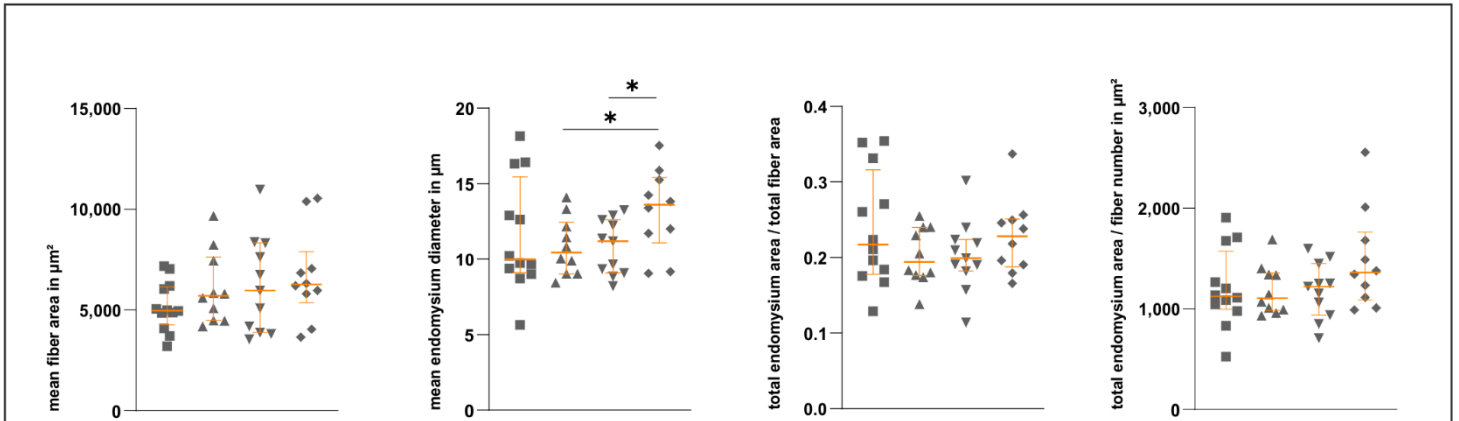


Abb.15 Daten Färbungen Kollagen I, mean fiber Area (CSA) = Muskelfaserquerschnittsfläche (μm^2), estimated mean endomysium diameter = durchschnittliche Endomysiumdicke (μm), total endomysium area/total fiber area (EFAr) = Endomysium zu Faserflächenverhältnis, total endomysium area/total fiber number (EFNr) = Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (μm^2), dargestellt in Abhängigkeit zu den Gruppen Young Control (\blacksquare , $n = 12$), Young Jump (\blacktriangle , $n = 10$), Old Control (\blacktriangledown , $n = 11$), Old Jump (\blacklozenge , $n = 10$), Median mit Minima, Maxima und Interquartilsabständen, Graphik wurde von Herrn Prof. Dr. Christoph Clemen erstellt

ROI-based / collagen-III

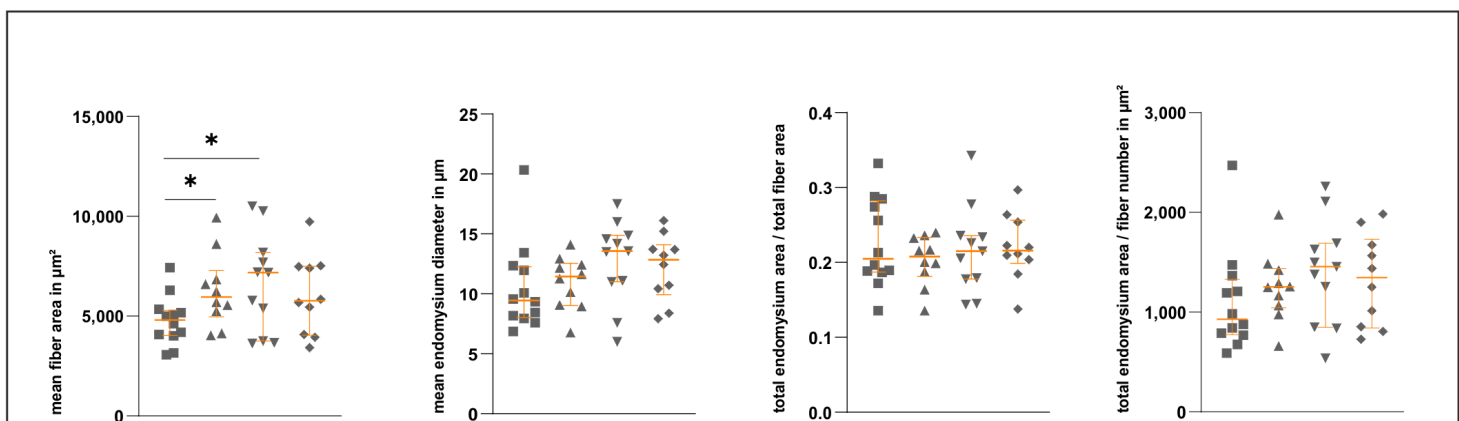


Abb.16 Daten Färbungen Kollagen III, mean fiber Area (CSA) = Muskelfaserquerschnittsfläche (μm^2), estimated mean endomysium diameter = durchschnittliche Endomysiumdicke (μm), total endomysium area/total fiber area (EFAr) = Endomysium zu Faserflächenverhältnis, total endomysium area/total fiber number (EFNr) = Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (μm^2), dargestellt in Abhängigkeit zu den Gruppen Young Control (\blacksquare , $n = 12$), Young Jump (\blacktriangle , $n = 10$), Old Control (\blacktriangledown , $n = 11$), Old Jump (\blacklozenge , $n = 10$), Median mit Minima, Maxima und Interquartilsabständen, Graphik wurde von Herrn Prof. Dr. Christoph Clemen erstellt

5. Diskussion

In Einklang mit der Hypothese der vorliegenden Arbeit wird das Endomysium durch das Alter und den Trainingszustand beeinflusst. Eine wie in der bisherigen Literatur beschriebene altersbedingte Zunahme des Bindegewebes konnte auch im Rahmen dieser Studie durch den Anstieg der Endomysiumdicke im Alter gezeigt werden (siehe Abb.13).^{6,7} Der Einfluss von Sport und Alter spiegelt sich jedoch nicht in statistisch signifikanten Ergebnissen bezüglich des Verhältnisses von Endomysium zu Faserfläche (EFAr) oder Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (EFNr) wider (siehe Abb.13). Dies könnte auf eine zu große interindividuelle Variabilität der Werte der Muskelfaserfläche (CSA) in den jeweiligen Gruppen zurückgeführt werden. Für die durchschnittliche Muskelfaserfläche (CSA) zeigte sich in unseren Ergebnissen eine signifikante Zunahme im Alter (siehe Abb.13). Dieser Effekt steht im offensichtlichen Widerspruch zu einer erwarteten altersbedingten Faseratrophie. Womöglich sind die funktionellen Anteile der Muskelfläche mittels immunhistochemischer Färbemethoden, wie im Fall der vorliegenden Untersuchungen, nicht gut zu erfassen. So zeigen sich in einer Arbeit von Fede et al. bei Färbungen mit Picrosirius red sowohl fettinfiltrierte und atrophierte Muskelfasern, bei Erhalt des extrazellulären Bindegewebsgerüsts.⁶ In einer Arbeit von Kjaer et al. wird die Anpassung der menschlichen Bindegewebskomponenten an körperliche Aktivität und im Alter als sehr vielschichtig, komplex und als bisher wenig untersucht und verstanden beschrieben.¹⁶ Während eine Zunahme der passiven Muskelsteifigkeit im Alter bereits nachgewiesen werden konnte, werden die Veränderungen des Kollagens in der Literatur widersprüchlich beschrieben.⁷ Fede et al. schreiben von einem signifikanten Anstieg des Kollagens beim Menschen und bei Mäusen mit zunehmendem Alter.⁶ Babraj et. al zeigten in Studien mit Ratten eine erhöhte Kollagensyntheserate, aber zugleich auch eine verstärkte Abbaurate des Kollagens mit Zunahme an Lebensjahren.²⁹ Eine Untersuchung von Gosselin et al. wies in Übereinstimmung mit der in dieser Studie festgestellten Zunahme der Bindegewebsdicke ebenfalls auf eine Zunahme des Kollagens in Rattenversuchen im Rahmen des Alterungsprozesses hin.³⁶ Kohärent zu diesen Beobachtungen konnte auch eine Arbeit von Wojtysiak am *M. longissimus lumborum* von Hausschweinen zeigen, dass sowohl die Endomysiumdicke als auch die Kollagenfaserdichte mit zunehmendem Alter der Schweine angestiegen ist. Csapo et al. schildern in einer Übersichtsarbeit nicht nur, dass der Kollagengehalt mit dem Alter ansteigt, sondern

in mit Bezug auf eine Vorarbeit aus Hindle et al. an langlebigen großen Tieren wie Weddellrobben, dass im Alter zudem eine Verschiebung des Verhältnisses von Kollagen I zu III, zu Gunsten von Kollagen I stattfindet.^{1,5} Dies steht im Einklang zu den Ergebnissen dieser Arbeit, wo auch nur in den Kollagen I Färbungen eine signifikante Zunahme der Kollagen I Dicke mit dem Alter festgestellt werden konnte und die Kollagen III Dicke, weder signifikante alters- noch sportbedingte Veränderungen zeigte.

Entsprechend den altersbedingten Veränderungen der in dieser Arbeit untersuchten Bindegewebskomponenten schildern Kovanen und Kollegen eine Zunahme von Kollagen IV in der Basallamina von kurz zuckenden Muskelfasern von Ratten, wobei die Lamininmenge mit dem Alter scheinbar abnimmt.⁴³

Die bereits erwähnten Diskrepanzen in den Ergebnissen verschiedener Studien zeigen sich auch im Vergleich mit der Arbeit von Wood LK et al.⁴⁴ Die dortigen Studienergebnisse legen keine Zunahme der Extrazellulärmatrix im Rahmen der Alterung nahe, benennen allerdings eine Zunahme des Kollagens in den muskulären Strukturen.⁴⁴ Die Untersuchung wurde wie in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Färbung durchgeführt, wobei der untersuchte Muskel mit dem Musculus tibialis anterior ein anderer war.⁴⁴ Nach Hibino et al. geht Immobilisation mit verminderter Muskelelastizität einher, hier benannt als Muskelkontraktur.⁴⁰ In dieser Studie wurde auch auf eine Zunahme der Kollagenkonzentration nach Phasen der Immobilisation hingewiesen.⁴⁰ Die in dieser Studie festgestellte Zunahme der Endomysiumdicke im Alter unabhängig von der sportlichen Aktivität könnte die in der Literatur mehrfach beschriebene altersbedingte verstärkte Gewebesteifigkeit widerspiegeln.^{30,32} Dem Mechanismus der Versteifung liegen mehreren Autoren zufolge unter anderem intermolekulare Cross-Links (Quervernetzungen) zugrunde.^{16,32,40} Gosselin et al. beschreiben die Reifung des Kollagens als Prozess, in dem die Cross-Links gebildet werden.³⁶ Extrazelluläres Kollagen hat nach Aussagen von Wood et al. zufolge eine sehr lange Halbwertszeit und ist ausgesprochen empfänglich für AGE-Cross-Links, die zu einer verstärkten Steifigkeit der Kollagenfibrillen führen.⁴⁴ Kjaer et al. beschreiben, dass die Akkumulation von AGEs in Sehnen zu erhöhter Zugfestigkeit, aber auch erhöhter Steifigkeit führt.¹⁶ AGEs, advanced glycation end products, sind heterogene Endprodukte, die durch irreversible nicht-enzymatische Glykierung reduzierter Zucker mit freien Aminogruppen von Proteinen entstehen.⁴⁵ Von Alnaqeeb et al. wird berichtet, dass extrazelluläres Kollagen für die Zunahme der Muskelsteifigkeit im

Alter verantwortlich ist.⁴⁶ In dieser Studie wurde noch genauer beschrieben, dass Kollagen-Cross-Linking besonders im Alter zunimmt.⁴⁶ Auch Haus et al. beschreiben sowohl eine Zunahme des absoluten Kollagengehalts als auch der nicht enzymatischen Quervernetzung des Kollagens im Rahmen der Alterung.²⁵ Interessanterweise zeigten Untersuchungen an Landsäugetieren und Ratten ebenso eine Zunahme des totalen Kollagengehalts mit dem Alter begleitet von einem verminderten Muskelfaserflächen zu Kollagengehaltverhältnis, was in der Konsequenz auch zu einer erhöhten Steifigkeit führte.^{36,47,48} Kollagen-Cross-Linking verändert die biochemischen und mechanischen Eigenschaften des Muskels mit der Folge eines altersbegleitenden Elastizitätsverlustes.⁴⁶ Leider ist durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungsmethoden keine Aussage bezüglich des Vernetzungsgrades des Kollagens oder Laminins im Rahmen der Alterung oder sportlicher Betätigung möglich. Hier eröffnen sich möglicherweise Ansatzpunkte für zielgerichtete Untersuchungen bindegewebiger Strukturen.

Alnaqeeb et al. beschreiben, dass Sport einen direkten Effekt auf die Muskulatur in Form einer Reduzierung der Steifigkeit ausübt.⁴⁶ Weiterhin wurde hier ein Anstieg der Endomysiumdicke im Alter festgestellt, was mit einer verminderten Compliance (Nachgiebigkeit) der Muskulatur assoziiert wurde.⁴⁶ Die Aussagen dieser Studie stimmen somit mit unseren Beobachtungen bezüglich Endomysiumdicke und Trainingseinfluss auf Muskelsteifigkeit beziehungsweise Tortuosität überein (siehe Abb.13 und 14).

Weiterhin deckungsgleich mit unseren Ergebnissen berichten Gosselin et al., allerdings im Tierversuch, dass Sport zwar keinen Einfluss auf die Kollagenkonzentration bei Ratten hat, die Steifigkeit durch Ausdauersport aber vermindert werden kann.^{1,36} Es wurde hier sogar detaillierter beschrieben, dass die Kollagen-Cross-Links, sowohl im Herz- als auch im Skelettmuskel alter trainierter Ratten abnahmen.³⁶ Der Einfluss von Sport auf die Muskelsteifigkeit war in den jungen Vergleichsgruppen allerdings nicht eindeutig.³¹ Dies ist gegebenenfalls auf die generell geringer ausgeprägte Steifigkeit der Muskulatur in der jungen Kontrollgruppe zurückzuführen. In einer Studie am Menschen von Reeves et al. konnte hingegen eine Zunahme der Sehnensteifigkeit durch Krafttraining festgestellt werden.⁴⁹ Kovanen et al. beschrieben in ihrer Arbeit an Mäusen, dass der Musculus soleus bei lebenslanger sportlicher Aktivität steifer wird.⁵⁰ Weiterhin ist in der bestehenden Literatur beschrieben, dass intensive exzentrische Übungen, über verstärkte enzymatische Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) und

Gewebeinhibitoren von Metalloproteasen (TIMPs) zu einem Abfall von Kollagen IV im Skelettmuskel führen.¹⁶ MMPs und TIMPs werden gemeinsam durch körperliche Aktivität aktiviert und regulieren, neben anderen physiologischen Prozessen, den Auf- und Abbau von Kollagen.¹⁶ Es ist somit wichtig zu unterscheiden welche Formen der sportlichen Aktivitäten betrieben und in welchem Umfang diese durchgeführt werden, um den damit einhergehenden Umbau des Gewebes bewerten zu können. Bindegewebe und insbesondere das Endomysium ist veränderlich und unterliegt fortwährenden Umbauprozessen. Babraj et al. beschreiben in ihrer Arbeit das Potenzial für die Veränderlichkeit des Bindegewebes durch sportliche Aktivität.²⁹ Rosager und Kollegen zeigen anhand von Untersuchungen an Langstreckenläufern, dass Ausdauersport zu einer Zunahme der Querschnittsfläche der Achillessehne führt.^{22,51} Die Achillessehne stellt den bindegewebigen Muskel-Knochen-Übergang von Musculus triceps surae, der aus dem Musculus gastrocnemius und Musculus soleus besteht, zum Fersenbein, dem Calcaneus, dar.¹⁰ In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rosager et al. bezüglich Adaptation der Achillessehne an sportliche Belastung, konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Endomysiumdicke bei jungen Sportlern gegenüber der gleichaltrigen Vergleichsgruppe festgestellt werden (siehe Abb.13). Die in der Gruppe der älteren Sportler nicht vorhandene Zunahme der Endomysiumdicke lässt darauf schließen, dass die Anpassungsfähigkeit des Bindegewebes an äußere Einflussfaktoren in jungen Jahren stärker ausgeprägt ist als im Alter.

Kovanen et al. zeigten bereits 1987 in einer Untersuchung an kurzzuckenden Fasern von Ratten, dass die Kollagen IV Konzentration sowohl mit steigendem Alter als auch steigendem Aktivitätsgrad zunimmt.⁵² Interessanterweise konnte hier dediziert eine Abnahme von Laminin mit dem Alter festgestellt werden, wobei das Maß der Aktivität auf Laminin keinen Einfluss zu haben scheint.⁵² Die Gesamtmenge von Kollagen IV in den langsam zuckenden Fasern, wie im M. soleus, scheint generell höher zu sein als beispielsweise bei schnell zuckenden Fasern.⁵² Sowohl Alterung als auch der Umfang sportlicher Aktivität üben jeweils unterschiedliche Einflüsse auf die Kollagen IV Genexpression aus.⁵² Wie Magnusson et al. schreiben, sind solche Adaptationsvorgänge wichtig, um den durch Sport induzierten erhöhten Anforderungen an das menschliche Gewebe gerecht zu werden.²²

In der bestehenden Literatur wird eine Vielfalt der Zusammensetzung der Basallamina in Abhängigkeit von Entwicklungsstadium, Trainingsstatus und Lokalisation mit weitläufiger Heterogenität der Subtypen der einzelnen

Bindegewebskomponenten beschrieben, was eine standardisierte Auswertung der Daten erschwert.¹¹

Der Versuch, in dieser Arbeit die Veränderungen einer 3D-Textur mit einem histologischen Schnitt und einer 2D-Untersuchung zu beschreiben, ist in seiner Aussagekraft ein durchaus diskutabler Weg hinsichtlich der Zuverlässigkeit der Befunde. Es konnten zunächst für die immunhistochemischen Färbungen von Laminin γ -1 und Kollagen IV zufriedenstellende Daten erhoben werden. Um neben den Bindegewebsbestandteilen Laminin γ -1 und Kollagen IV auch andere Komponenten zuverlässig zu quantifizieren, ist es erforderlich eine Analysemethode zu etablieren, die auch schwer zu differenzierende Bereiche auswerten kann. Babraj et. al. merken an, dass es schwierig ist, Umbauprozesse des Bindegewebes, speziell des Kollagens, an lebenden menschlichen Individuen darzustellen.²⁹ Immunhistochemische Färbemethoden haben sich als eine Möglichkeit der Darstellbarkeit etabliert. Besonders hervorzuheben ist hier die relativ neue Methodik des *high dimensional tissue section imaging*, die sich auch als Analysetechnik für Muskelgewebeschnitte im Stadium ihrer Etablierung befindet.⁵³

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin eine Zunahme der Tortuosität in Zusammenhang mit dem Trainingsstatus (siehe Abb.14). Kjaer et al. beschreiben eine Abnahme der Steifigkeit von Muskelgewebe nach Ausdauerleistungen.¹⁶ Dieser Sachverhalt im Kontext mit den vorliegenden Ergebnissen der Tortuosität könnte Hinweise darauf liefern, dass die Berechnung der Tortuosität eine adäquate Möglichkeit ist, die Steifigkeit von Muskelgewebe zu erfassen, wobei eine stärker ausgeprägte Gewundenheit mit verminderter Steifigkeit zu assoziieren ist. Die von Fede et al. festgestellte Zunahme der Steifigkeit von EZM im Alter, spiegelt sich somit in unseren Ergebnissen ebenso in einer, wenn auch nicht signifikanten, altersassoziierten schwächer ausgeprägten Tortuosität wider.⁶ Inwieweit das Konzept der Tortuosität als Marker zur Darstellung der Gewebesteifigkeit verwendet werden kann, bleibt diskutabel und sollte durch weitere Versuche überprüft werden.

Die bisherige Studienlage impliziert, dass die Veränderungen der Kollagen Genexpression in Abhängigkeit des untersuchten angrenzenden Muskelgewebes und der jeweiligen Kollagen Typen variieren können.² Die Ergebnisse der gleichen Studie von Kanazawa et al. legen beispielsweise nahe, dass Alterung eine Zunahme der Kollagen I und Kollagen III Genexpression hervorruft.² In Bezug auf die Untersuchungen von Kollagen I in dieser Arbeit konnte ausschließlich eine signifikante Zunahme der durchschnittlichen Kollagen I Dicke in den Kontrollgruppen

(Y.Control, O.Control) mit zunehmendem Alter und in den beiden älteren Gruppen (O.Jump, O.Control) mit steigendem Maß an Aktivität gezeigt werden (siehe Abb.15). Besonderes Augenmerk ist auf die signifikante Zunahme der durchschnittlichen Kollagen I Dicke mit dem Alter zu richten. Fede et al. konnten ebenso eine Zunahme der Kollagen I und III Genexpression bei Mäusen und Menschen mit zunehmendem Alter feststellen.⁶

Die signifikante Zunahme der durchschnittlichen Faserquerschnittsfläche der Kollagen III Färbungen in jungen Jahren bei vermehrter sportlicher Aktivität und auch mit zunehmendem Alter in den Gruppen der nicht sportlich Aktiven weist eine Parallelität zu den Ergebnissen der Zunahme der durchschnittlichen Muskelfaserquerschnittsfläche mit dem Alter in den Färbungen von Kollagen IV und Laminin γ -1 auf. Die Zunahme der Muskelfaserquerschnittsfläche mit steigendem Aktivitätsgrad in jungen Jahren bestätigt die Theorie, in der sportliche Aktivität, in diesem Fall explizit aerobes Training, mit einer Muskelfaserhypertrophie und damit größerer Muskelfaserquerschnittsfläche einhergeht.⁵⁴⁻⁵⁶

Die signifikante Zunahme der durchschnittlichen Muskelfaserquerschnittsfläche in den Färbungen von Kollagen III mit zunehmendem Alter mag im Kontext einer erwarteten altersassoziierten Muskelfaseratrophie paradox erscheinen, wobei auch hier berücksichtigt werden sollte, dass für bestimmte Muskelgruppen oder -bereiche keine direkte Korrelation von Querschnittsfläche und funktionellen krafterzeugenden Bereichen angenommen werden kann.⁵⁷ Möglicherweise spielen zudem Fibroseprozesse eine Rolle, die mit den angewandten Methoden der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurden.⁵⁷

In Thot et al. wurde eine relative Zunahme des Endomysiums im Rahmen von Immobilisation beschrieben, was darin eher auf eine Abnahme der Muskulatur, als auf eine absolute Zunahme des Endomysiums bei keiner oder gering ausgeprägter Bewegung zurückgeführt wurde.³⁸ In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Bezug auf die gleichen angefärbten Bindegewebskomponenten ebenso keine generelle Zunahme des Endomysiums bei geringerer Bewegung respektive Immobilisation. Weiterhin deutet auch die Zunahme des Endomysium zu Faseranzahlverhältnisses (EFNr) im Alter, als Parallele zu den Ergebnissen der relativen Zunahme des Endomysiums aus Thot et al., auf eine eher muskeltrophiebedingte Veränderung eines solchen Verhältnisses hin.³⁸ Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Thot et al. konnte in dieser Arbeit zusätzlich noch eine Zunahme der Endomysiumdicke mit dem Alter gezeigt werden.³⁸

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass Alterung zu einer Zunahme des Endomysiums des Musculus soleus begleitet von einer Fibrosierung des Bindegewebes bei gleichzeitiger Abnahme der Anteile der elastischen Fasern führt. Sportliche Aktivität kann einer Steifigkeit der Muskulatur entgegenwirken. Die Anpassungsvorgängen bindegewebiger Komponenten sind altersabhängig und in jüngeren Jahren stärker ausgeprägt. Unter Berücksichtigung der Fragestellung ist die Immunfluoreszenz gut zur Quantifizierung bindegewebiger Strukturen geeignet.

Es obliegt, wie auch von Wessner et al. benannt, zukünftigen wissenschaftlichen Studien, weitere Bindegewebskomponenten und den Einfluss von Sport und Alterungsprozessen zu untersuchen, um ein besseres Verständnis alters- und sportassoziierter Veränderungen zu erhalten.²⁸

6. Literaturverzeichnis

1. Csapo R, Gumpenberger M, Wessner B. Skeletal Muscle Extracellular Matrix - What Do We Know About Its Composition, Regulation, and Physiological Roles? A Narrative Review. *Front Physiol* 2020; **11**: 253.
2. Kanazawa Y, Miyachi R, Higuchi T, Sato H. Effects of Aging on Collagen in the Skeletal Muscle of Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; **24**(17): 13121.
3. Purslow PP. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; **133**(4): 947-66.
4. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & Nerve* 2011; **44**(3): 318-31.
5. Hindle AG, Horning M, Mellish J-AE, Lawler JM. Diving into old age: muscular senescence in a large-bodied, long-lived mammal, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*). *Journal of Experimental Biology* 2009; **212**(6): 790-6.
6. Fede C, Fan C, Pirri C, et al. The Effects of Aging on the Intramuscular Connective Tissue. *Int J Mol Sci* 2022; **23**(19).
7. Pavan P, Monti E, Bondí M, et al. Alterations of Extracellular Matrix Mechanical Properties Contribute to Age-Related Functional Impairment of Human Skeletal Muscles. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(11).
8. Behrends J. Duale Reihe Physiologie: Thieme, Stuttgart; 2009, S. 67-73
9. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: Thieme, Stuttgart; 2014, S.54-59, 482
10. Aumüller. Duale Reihe Anatomie: Thieme, Stuttgart; 2006, S.81-90, 236, 412
11. Lüllmann-Rauch R. Histologie: Thieme, Stuttgart; 2019, S. 147-170, 268-286, 668
12. Järvinen T, Józsa L, Kannus P, Järvinen TJ, Markku. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; **23**(3): 245-54.
13. Lai AKM, Biewener AA, Wakeling JM. Muscle-specific indices to characterise the functional behaviour of human lower-limb muscles during locomotion. *J Biomech* 2019; **89**: 134-8.

14. Brüggemann G-P. Speicherung und Nutzung elastischer Energie in Sehnen und Bändern der unteren Extremität bei hochdynamischen Absprüngen im Sport. *Bundesinstitut für Sportwissenschaft-Jahrbuch* 2000: 183-8.
15. Purslow PP. The Structure and Role of Intramuscular Connective Tissue in Muscle Function. *Front Physiol* 2020; **11**: 495.
16. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004; **84**(2): 649-98.
17. McKee TJ, Perlman G, Morris M, Komarova SV. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 10542.
18. Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech Ageing Dev* 2001; **122**(7): 735-55.
19. Stecco C. Functional Atlas of the Human Fascial System. *Elsevier Health Sciences, Edinburgh, UK*, 2015; **1st ed.**
20. J. Des Parkin, James D. San Antonio AVP, Hayat Dagher, Raymond Dalgleish STJ, Xavier Jeunemaitre, Savige J. The collagen III fibril has a “flexi-rod” structure of flexible sequences interspersed with rigid bioactive domains including two with hemostatic roles. *Plos One* 2017.
21. Kovanen V. Intramuscular Extracellular Matrix: Complex Environment of Muscle Cells. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2002; **30**(1): 20-5.
22. Magnusson SP, Hansen P, Kjaer M. Tendon properties in relation to muscular activity and physical training. *Scand J Med Sci Sports* 2003; **13**(4): 211-23.
23. Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 2003; **278**(15): 12601-4.
24. Gumpfenberger M, Wessner B, Graf A, et al. Remodeling the Skeletal Muscle Extracellular Matrix in Older Age-Effects of Acute Exercise Stimuli on Gene Expression. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(19).
25. Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 2007; **103**(6): 2068-76.
26. Distefano G, Goodpaster BH. Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; **8**(3).

27. Zhang Y, Chen JS, He Q, et al. Microstructural analysis of skeletal muscle force generation during aging. *Int J Numer Method Biomed Eng* 2020; **36**(1): e3295.
28. Wessner B, Liebensteiner M, Nachbauer W, Csapo R. Age-specific response of skeletal muscle extracellular matrix to acute resistance exercise: A pilot study. *Eur J Sport Sci* 2019; **19**(3): 354-64.
29. Babraj JA, Cuthbertson DJR, Smith K, et al. Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2005; **289**(5): E864-E9.
30. Stearns-Reider KM, D'Amore A, Beezhold K, et al. Aging of the skeletal muscle extracellular matrix drives a stem cell fibrogenic conversion. *Aging Cell* 2017; **16**(3): 518-28.
31. Williams P, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilised muscle. *J Anat* 1984 Mar 1983; **138**(2): 343-50.
32. Gao Y, Kostrominova TY, Faulkner JA, Wineman AS. Age-related changes in the mechanical properties of the epimysium in skeletal muscles of rats. *Journal of Biomechanics* 2008; **41**(2): 465-9.
33. Kjaer M, Magnusson P, Krogsgaard M, et al. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J Anat* 2006; **208**(4): 445-50.
34. Schoenrock B, Zander V, Dern S, et al. Bed Rest, Exercise Countermeasure and Reconditioning Effects on the Human Resting Muscle Tone System. *Frontiers in Physiology* 2018; **9**.
35. Carroll CC, Whitt JA, Peterson A, Gump BS, Tedeschi J, Broderick TL. Influence of acetaminophen consumption and exercise on Achilles tendon structural properties in male Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; **302**(8): R990-5.
36. Gosselin LE, Adams C, Cotter TA, McCormick RJ, Thomas DP. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. *Journal of Applied Physiology* 1998; **85**(3): 1011-6.
37. Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, Kovanen V, Risteli J, Takala TE. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand* 2003; **177**(4): 473-81.
38. Thot GK, Berwanger C, Mulder E, et al. Effects of long-term immobilisation on endomysium of the soleus muscle in humans. *Exp Physiol* 2021; **106**(10): 2038-45.

39. Reeves ND, Narici MV, Maganaris CN. Myotendinous plasticity to ageing and resistance exercise in humans. *Exp Physiol* 2006; **91**(3): 483-98.
40. Hibino I, Okita M, Inoue T, Banno Y, Hosono M. Effect of Immobilization on Insoluble Collagen Concentration and Type I and Type III Collagen Isoforms of Rat Soleus Muscle. *J Jpn Phys Ther Assoc* 2008; **11**(1): 1-6.
41. Rittweger. MALICoT-Ethics. 2019.
42. Frey I, Berg A, Grathwohl D, Keul J. Freiburg Questionnaire of physical activity--development, evaluation and application. *Soz Präventivmed* 1999; **44**(2): 55-64.
43. Kovanen V. Type IV Collagen and Laminin in Slow and Fast Skeletal Muscle in Rats — Effects of Age and Life-Time Endurance Training. *Collagen and Related Research* 1988; **8**(2): 145-53.
44. Wood LK, Kayupov E, Gumucio JP, Mendias CL, Claflin DR, Brooks SV. Intrinsic stiffness of extracellular matrix increases with age in skeletal muscles of mice. *J Appl Physiol (1985)* 2014; **117**(4): 363-9.
45. Schröter D, Höhn A. Role of Advanced Glycation End Products in Carcinogenesis and their Therapeutic Implications. *Curr Pharm Des* 2018; **24**(44): 5245-51.
46. Alnaqeeb MA, Al Zaid NS, Goldspink G. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *J Anat* 1984; **139 (Pt 4)**(Pt 4): 677-89.
47. Gosselin LE, Martinez DA, Vailas AC, Sieck GC. Passive length-force properties of senescent diaphragm: relationship with collagen characteristics. *J Appl Physiol (1985)* 1994; **76**(6): 2680-5.
48. Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. *J Biomech* 1984; **17**(10): 725-35.
49. Reeves ND, Maganaris CN, Narici MV. Effect of strength training on human patella tendon mechanical properties of older individuals. *J Physiol* 2003; **548**(Pt 3): 971-81.
50. Kovanen V, Suominen H. Effects of age and life-long endurance training on the passive mechanical properties of rat skeletal muscle. *Compr Gerontol A* 1988; **2**(1): 18-23.
51. Rosager S, Aagaard P, Dyhre-Poulsen P, Neergaard K, Kjaer M, Magnusson SP. Load-displacement properties of the human triceps surae aponeurosis and tendon in runners and non-runners. *Scand J Med Sci Sports* 2002; **12**(2): 90-8.

52. Kovanen V, Suominen H. Effects of age and life-time physical training on fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats. *Pflugers Arch* 1987; **408**(6): 543-51.
53. Györfi AH, Matei AE, Fuchs M, et al. Engrailed 1 coordinates cytoskeletal reorganization to induce myofibroblast differentiation. *J Exp Med* 2021; **218**(9).
54. Harber MP, Konopka AR, Udem MK, et al. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. *J Appl Physiol (1985)* 2012; **113**(9): 1495-504.
55. Durham WJ, Casperson SL, Dillon EL, et al. Age-related anabolic resistance after endurance-type exercise in healthy humans. *Faseb j* 2010; **24**(10): 4117-27.
56. Harber MP, Crane JD, Dickinson JM, et al. Protein synthesis and the expression of growth-related genes are altered by running in human vastus lateralis and soleus muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; **296**(3): R708-14.
57. MacLennan WJ, Hall MRP, Timothy JI, Robinson M. Is weakness in old age due to muscle wasting? *Age and Ageing* 1980; **9**(3): 188-92.

7. Tabellenverzeichnis

Tab.1 Daten Kollagen_IV_Laminin_ γ -1 Färbungen

Variable	Young_Ctrl	Young_Jump	Old_Ctrl	Old_Jump	P_Age	P_Sport	P_Interaction	Test
Number of subjects	12	10	11	10				
CSA_Koll_IV_Laminin	3799.82 (837.45)	4922.24 (1171.59)	5344.09 (1626.5)	5052.49 (1923.13)	0.045*	0.33	0.11	ANOVA
Tortuosity_Koll_IV_Laminin	1.37 (0.11)	1.47 (0.16)	1.33 (0.12)	1.47 (0.13)	0.6	0.004**	0.56	ANOVA
EFAr_Koll_IV_Laminin	52.08 (7.47)	49.87 (12.16)	49.86 (11.35)	52.38 (13.84)	0.88	0.86	0.45	ANOVA
EFNr_Koll_IV_Laminin	1964.78 (434.04)	2414.72 (666.71)	2594.46 (746.12)	2494.22 (784.03)	0.07	0.38	0.18	ANOVA
Th_Endo_Koll_IV_Laminin	11.74 (1.37)	12.23 (2.37)	13.84 (1.9)	11.98 (1.53)	0.081	0.24	0.04*	ANOVA
Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung	P = Signifikanzwert		$\alpha = 0.05$					

CSA = Faserquerschnittsfläche (μm^2), Tortuosity = Gewundenheit, EFAr = Endomysium zu Faserflächenverhältnis (%), EFNr = Endomysium zu Faseranzahlverhältnis (μm^2), Th_Endo = Endomysiumdicke (μm), in Abhängigkeit zu den vier Vergleichsgruppen Young Control (Young_Ctrl, n = 12), Young Jump (Young_Jump, n = 10), Old Control (Old_Ctrl, n = 11), Old Jump (Old_Jump, n = 10), P_Age = Signifikanzwerte Alter, P_Sport = Signifikanzwerte Sport, P_Interaction = Signifikanzwerte Interaktionen, Test = statistischer Test (ANOVA = Analysis of variance), die Tabelle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Tab.2 Rohdaten Kollagen_IV_Laminin_ γ -1 Färbungen

SubjID	SportGroupC	AgeGroupC	AgeSportGroupC	SportGroup	AgeGroup	AgeSportGroup	StainVersion	NFibers_total	Fiber_Area_total	Perimeter_total	FeretMin_total	FeretMax_total	FeretRatio_total	Tortuosity_total
B15	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	152	2657,294612	307,6824867	44,31695159	96,73400572	0,493824021	1,292318277
BK1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	109	3676,739963	383,372744	53,59823542	104,8507004	0,527452111	1,443805895
BW3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	157	3008,841025	332,884214	50,39498631	89,26731407	0,578861323	1,434652183
CC7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	123	4140,591419	348,6214708	51,31106822	118,376575	0,459959982	1,20022638
CQ1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	81	2884,658929	327,7007349	50,38983881	89,53153504	0,56594039	1,407883641
DK8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	83	6061,503497	464,3419413	69,33314256	126,9264465	0,544631196	1,41822625
DP4	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	130	2052,711812	262,0006163	38,2522613	86,17796045	0,482651287	1,236469856
DY6	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	93	6687,003486	486,0716366	70,4720411	142,2118882	0,502364631	1,347979619
ED5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	75	5229,155504	506,4933497	57,51962632	139,5034518	0,432741193	1,493198995
EJ9	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	166	3783,774845	364,8035048	51,42168796	118,4801973	0,46887219	1,258294547
FP7	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	149	2356,652095	355,0850193	43,35507579	89,98007308	0,496168082	1,576733693
GA5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	63	3622,262965	409,9581315	54,89638443	96,21846466	0,568612463	1,635819887
GI3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	95	3957,766114	394,648398	56,56638561	102,214782	0,563769531	1,493388834
GM5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	169	2605,77341	298,6813626	47,50584422	87,51590543	0,533894351	1,333866365
GY6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	98	4962,252994	375,0633606	59,71025115	123,7511841	0,493798193	1,214648692
HA4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	114	3154,384893	286,470207	47,22646813	96,99887908	0,521676596	1,180678728
HR9	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	92	3979,821021	386,804561	55,53200778	111,2187273	0,516263518	1,381240037
IF3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	135	3303,869095	325,1388926	49,17626285	104,8821628	0,48844034	1,247139641
IK8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	97	5521,878635	382,1741105	64,60817239	126,0041438	0,515096878	1,198151268
KB5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	172	2216,809961	247,6425579	42,26397837	80,3456014	0,54007772	1,216034985
KO7	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	93	4346,01778	458,9112577	60,36390244	111,8006057	0,552285168	1,55852849
LP1	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	88	3169,740886	412,618791	51,28356939	93,3090823	0,549341053	1,69576553
MS7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	114	4700,027164	381,0913047	60,74266274	116,0392137	0,531096719	1,302914048
OY5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	123	4001,960295	398,5119498	57,4644173	109,8270625	0,539452325	1,409737352
PJ8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	119	3813,722425	369,2777938	54,72124879	106,1819415	0,536386462	1,374514618
PN8	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	111	4636,547221	373,6987997	62,82357658	111,2884289	0,564843374	1,29903731
QC6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	161	3593,361638	396,4715061	51,83860445	111,1208194	0,484124128	1,444607811
QH5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	116	3681,778174	429,8070727	53,82977762	105,6564941	0,521446187	1,597898186
QP4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	109	4719,640751	409,3070457	63,10465212	114,0332321	0,568167121	1,377160665
RL4	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	139	3518,941899	382,8655291	44,10767351	120,7647855	0,397516935	1,318641828
RM9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	162	3205,763454	336,3162962	53,65245818	91,39628359	0,595793127	1,411193462
RP9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	95	3672,903418	325,4924329	53,31312291	102,1265778	0,530696285	1,255316951
RR9	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	111	7634,699008	509,006688	76,56201508	149,3595992	0,521507777	1,342325496
SF6	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	210	2973,531863	279,0083065	51,38574715	86,99092721	0,598340048	1,233254017
TN6	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	156	3207,393865	326,4711759	50,38552538	96,41006964	0,531994805	1,330320365
UI2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	107	3697,043432	329,6940881	56,9394489	99,48606144	0,579893914	1,284628355
VO8	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	92	3585,105442	342,0289807	52,59150264	102,31872	0,525712468	1,324869295
VP2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	96	4905,324927	390,5995838	59,12663755	120,4700734	0,509084853	1,290593962
WL2	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	143	4506,307656	373,2430055	63,49161227	106,6351454	0,597739553	1,336702123
XF8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	87	4355,898201	431,4024269	58,04459665	106,3111941	0,550047145	1,574545805
XV3	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	69	6420,108064	545,0283239	71,15958711	141,4913528	0,519665802	1,530983003
YB2	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	100	4782,671682	394,9514857	64,62974682	111,1883632	0,588335999	1,362177294
YQ2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	156	2949,283997	282,9114172	46,8564672	91,51604594	0,529772593	1,222536689

SubjID = Probandenidentifikationsnummer, SportGroupC, AgeGroupC, AgeSportGroupC, SportGroup, AgeGroup, AgeSportGroup = Gruppenzuordnung der Probanden (T1 = Sprint, T2 = Control, A1 = Young, A2 = Old, C = concealed/verdeckt), StainVersion = Färbversion (Kollagen_IV_Laminin_ γ -1), NFibers_total = Anzahl Fasern gesamt im Bereich der ROI, FiberArea_total (μm^2) = durchschnittliche Faserfläche im gesamten Bereich der ROI, Perimeter_total (μm) = durchschnittlicher Faserumfang der gesamten Fasern im Bereich der ROI, FeretMin_total (μm) = durchschnittliches minimales Feret der Fasern, FeretMax_total (μm) = durchschnittliches maximales Feret im gesamten Bereich der ROI, FeretRatio_total = durchschnittliches Feretverhältnis der Fasern, Tortuosity_total = durchschnittliche Gewundenheit der Fasern im gesamten Bereich der ROI, die Tabelle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Tab.3 Rohdaten Kollagen_IV_Laminin_ γ -1 Färbungen

SubjID	SportGroupC	AgeGroupC	AgeSportGroupC	SportGroup	AgeGroup	AgeSportGroup	StainVersion	ATot_ROI	ATot_Endo	EFNr	Th_Endo	EFAr
B5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	600422,7971	196514,0161	1434,992397	9,690504037	48,65306855
BK1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	604412,9197	203648,3001	2170,008388	11,4557649	50,81493976
BW3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	792576,0681	320188,0272	2269,758801	14,18618912	67,78072251
CC7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	712222,9286	202930,1841	1915,100426	11,23393401	39,84548892
CQ1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	375077,5125	141420,1393	2235,475033	13,06751606	60,52457807
DK8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	741001,998	237897,2078	3486,721027	15,05670044	47,28581647
DP4	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	435957,8141	169105,2786	1470,510532	11,76199629	63,37030982
DY6	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	851146,8304	229255,5062	2968,712684	12,14908059	36,86423934
ED5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	612576,752	220390,0892	3555,161636	13,90396966	56,19520247
EJ9	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	919706,6848	291600,0605	2024,910408	11,03375681	46,42524839
FP7	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	615700,5959	264559,4338	1951,910447	11,35022248	75,34275735
GA5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	385895,7349	157693,1682	3146,988015	15,29610823	69,10227627
GI3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	570392,938	194405,1571	2480,768032	12,37572271	51,70517807
GM5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	668288,1516	227912,4452	1563,947234	10,37651965	51,75409132
GY6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	657018	170717,2066	2210,435748	11,28290288	35,10527002
HA4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	518015,884	158416,0074	1642,081866	11,78522647	44,05340982
HR9	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	518015,884	151872,3501	1954,856506	10,18858857	41,47891087
IF3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	643912,0925	197889,7647	1738,384998	10,56814458	44,36768125
IK8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	757466,5607	221844,3332	2798,59117	14,73779664	41,41805955
KB5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	572134,3809	190843,0476	1243,892235	10,44466254	50,05176908
KO7	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	644598,533	240418,8794	3224,599735	13,26308	59,48317222
LP1	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	469728,1215	190790,9236	2692,680844	12,37974267	68,39924004
MS7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	771653,5595	235850,4628	2557,899673	12,95271951	44,01812238
OY5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	771533,9048	279292,7885	2642,270291	13,30274695	56,73902063
PJ8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	679018,3385	225185,37	2071,355685	12,05742799	49,61855696
PN8	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	735490,8504	220834,1088	2310,884057	12,75789016	42,90900925
QC6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	967856,5182	389325,2946	2661,192742	13,91599575	67,29546802
QH5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	582330,9933	155244,7251	1633,840852	7,09640147	36,34973462
QP4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	790092,5383	275651,6964	3246,523432	14,70030258	53,58277841
RL4	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	790092,5383	300959,6156	2524,809774	13,05491873	61,52920847
RM9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	790092,5383	270758,8587	1810,975621	11,43126577	52,13581737
RP9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	493232,429	144306,6042	1820,882979	11,40604504	41,35738716
RR9	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	1157626,609	310175,0191	3231,997772	12,95294486	36,60091299
SF6	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	926816,0969	302374,4058	1579,583212	11,88336887	48,42316104
TN6	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	802959,7173	302606,2743	2130,573297	13,83048959	60,47850347
UI2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	582841,3066	187257,6594	2065,572498	12,83954307	47,33705772
VO8	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	452648,2664	122818,5658	1700,128175	9,417394105	37,23696365
VP2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	689219,9941	218308,8011	2777,081025	14,15100944	46,35880487
WL2	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	908439,4196	264037,4249	2080,164475	11,54286618	40,97402352
XF8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	662821,1435	283858	4161,688659	18,30255392	74,90385409
XV3	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	662821,1435	219833,6871	3821,236427	14,14023972	49,62526227
YB2	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	662821,1435	184553,9753	2184,753646	11,19134952	38,58805028
YQ2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	735490,8504	275402,5468	2011,937703	14,77765484	59,85862815

SubjID = Probandenidentifikationsnummer, SportGroupC, AgeGroupC, AgeSportGroupC, SportGroup, AgeGroup, AgeSportGroup = Gruppenzuordnung der Probanden (T1 = Sprint, T2 = Control, A1 = Young, A2 = Old, C = concealed/verdeckt), StainVersion = Färbeversion (Kollagen_IV_Laminin_ γ -1), ATot_ROI (μm^2) = gesamte Fläche ROI, ATot_Endo (μm^2) = gesamte Endomysiumfläche, EFNr (μm^2) = Endomysium zu Faseranzahlverhältnis, Th_Endo (μm) = Endomysiumdicke, EFAr (%) = Endomysium zu Faserflächenverhältnis, die Tabelle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Tab.4 Rohdaten Kollagen_IV_Laminin_ γ -1 Färbungen

SubjID	SportGroupC	AgeGroupC	AgeSportGroupC	SportGroup	AgeGroup	AgeSportGroup	StainVersion	NFibers_inner	FiberArea_inner	Perimeter_inner	FeretMin_inner	FeretMax_inner	FeretRatio_inner	Tortuosity_inner
B15	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	104	2949,438626	338,2716516	46,49499373	105,9871959	0,478703672	1,315008984
BK1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	66	4270,41417	432,4948785	58,20476112	115,6855346	0,529311244	1,491191278
BW3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	109	3348,67897	360,1029734	54,28195269	93,77653189	0,598167914	1,48012171
CC7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	84	4806,316796	390,6920241	54,95842986	131,5156675	0,439778224	1,225800874
CQ1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	42	3693,499574	385,7818411	58,95758412	102,1969398	0,590756292	1,464144703
DK8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	47	7373,714334	533,4564777	79,04036224	141,2967206	0,570484744	1,473844996
DP4	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	84	2320,503933	288,5928635	40,59539343	95,15759353	0,473217554	1,244012556
DY6	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	53	8053,096271	546,9179864	77,30028452	159,0558472	0,494144813	1,375655447
ED5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	43	6326,450444	579,6675635	63,89934988	155,852915	0,436304249	1,543965436
EJ9	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	113	4361,657673	410,3422387	55,38185967	133,1800655	0,452436041	1,277186457
FP7	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	102	2590,707475	380,0721368	46,62215249	95,07889386	0,511290133	1,599450047
GA5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	31	4554,101811	475,8379759	63,46024596	107,8791583	0,598970718	1,707834544
GI3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	53	4797,910102	456,1582391	64,1732745	114,4236352	0,580381362	1,554378255
GM5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	113	3021,88135	333,5098891	52,36256651	95,97507063	0,562234483	1,365636084
GY6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	54	6296,592352	443,9809322	69,44446422	145,5094922	0,496920498	1,233991406
HA4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	69	3727,479604	324,1748234	51,68651131	108,6454226	0,51544125	1,206098983
HR9	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	50	4712,892563	435,16668	60,9395899	122,5647077	0,511605731	1,419512341
IF3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	87	3918,133535	365,6622464	55,78967074	115,1220999	0,511179859	1,282563694
IK8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	57	6756,934538	443,1723414	74,06226943	144,5833724	0,527064348	1,220790604
KB5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	116	2485,211328	267,3384246	45,82900094	85,84108842	0,548909589	1,229388803
KO7	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	53	5421,028528	547,2310851	68,98001956	129,3562529	0,553484749	1,614306551
LP1	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	54	3936,71164	464,4343417	59,19303876	104,4147366	0,575704168	1,708630163
MS7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	66	5811,014951	431,295265	70,54145608	128,8727704	0,564011203	1,322782789
OY5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	76	4656,883854	459,6989191	63,89638947	120,395046	0,547777839	1,496283405
PJ8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	78	4174,558496	394,6615885	58,64336753	111,1617287	0,548889241	1,401508041
PN8	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	63	5385,545127	415,9763394	69,00294738	120,6833847	0,585396836	1,348438574
QC6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	114	3954,49028	428,2718515	54,62711368	119,8833795	0,471910214	1,458652584
QH5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	67	4494,780687	500,4140627	61,18415717	118,5964021	0,529800298	1,675024475
QP4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	59	6058,893413	478,7938386	72,76679033	133,0533561	0,564491815	1,395844242
RL4	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	95	4103,432884	435,664629	47,78322559	135,9352222	0,373912042	1,351533106
RM9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	107	3473,572896	356,0949413	57,64514986	94,12665752	0,62346675	1,443832573
RP9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	52	4402,799848	365,1897271	60,98897156	110,1816146	0,567226308	1,303960284
RR9	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	67	8830,37473	567,2445498	82,03724705	163,2741259	0,51943844	1,389631112
SF6	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	151	3262,04068	297,3167499	54,79070243	90,68009976	0,6184002	1,259235323
TN6	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	109	3522,86048	346,9456915	54,02787444	100,1336326	0,55623441	1,358589863
UI2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	59	4363,542217	362,7522377	63,72124603	107,8203001	0,60564589	1,297830078
VO8	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	50	4565,700337	401,4320288	61,95972501	116,7079681	0,548177045	1,365585887
VP2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	58	5990,406855	446,1514787	69,47667459	133,5735744	0,54078267	1,329219372
WL2	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	89	5076,788404	410,5020293	69,02503386	114,6886991	0,610779133	1,372918546
XF8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	50	5556,014053	504,9281293	67,8820878	121,6010089	0,568682131	1,617505672
XV3	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	38	7700,183843	588,9916689	80,41596311	153,5403537	0,549458898	1,525978654
YB2	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	58	5661,736289	435,9314488	74,1602711	118,1008933	0,641618037	1,401805045
YQ2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	108	3361,149036	305,2101918	50,46656758	97,31213968	0,536709765	1,238938474

SubjID = Probandenidentifikationsnummer, SportGroupC, AgeGroupC, AgeSportGroupC, SportGroup, AgeGroup, AgeSportGroup = Gruppenzuordnung der Probanden (T1 = Sprint, T2 = Control, A1 = Young, A2 = Old, C = concealed/verdeckt), StainVersion = Färbeversion (Kollagen_IV_Laminin_ γ -1), NFibers_inner = Anzahl Faser im Inneren der ROI, FiberArea_inner (μm^2) = durchschnittliche Fläche im Inneren der ROI, Perimeter_inner (μm) = durchschnittlicher Faserumfang der innerständigen Fasern, FeretMin_inner (μm) = durchschnittliches minimales Feret der innerständigen Fasern, FeretMax_inner (μm) = durchschnittlicher maximales Feret der innerständigen Fasern, FeretRatio_inner = durchschnittliches Feretverhältnis der innerständigen Fasern, Tortuosity_inner = durchschnittliche Gewundenheit der innerständigen Fasern, die Tabelle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Tab.5 Rohdaten Kollagen_IV_Laminin_γ-1 Färbungen

SubjID	SportGroupC	AgeGroupC	AgeSportGroupC	SportGroup	AgeGroup	AgeSportGroup	StainVersion	NFibers_outer	FiberArea_outer	Perimeter_outer	FeretMin_outer	FeretMax_outer	FeretRatio_outer	Tortuosity_outer	Peri_ROI	NFibers_outer_adjusted	Nfibers_total adjusted
B5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	48	2024,315913	241,4059626	39,59786029	76,68542702	0,526584777	1,243155078	3104,839606	32,94429081	136,9442908
BK1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	43	2765,518244	307,9759794	46,5277541	88,22048979	0,524598557	1,371074844	3116,887225	27,84678014	93,84678014
BW3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	48	2237,125699	271,0749478	41,56833348	79,02763192	0,535019273	1,331398465	3561,006273	32,06698345	141,06698345
CC7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	39	2706,721376	258,0079712	43,45521236	90,07699121	0,503428386	1,145142856	3376,184844	21,96320762	105,9632076
CC1	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	39	2013,599772	265,1518513	41,16303618	75,89186835	0,539215573	1,347294804	2449,613416	21,26178426	63,26178426
DK8	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	36	4348,339349	374,1090744	56,65982798	108,1652553	0,510877952	1,345612887	3470,101511	21,22949296	68,22949296
DP4	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	46	1563,700113	213,4408605	33,97349827	69,78036961	0,49987103	1,22269623	2652,780082	30,99766572	114,99766572
DY6	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	40	4876,930545	405,4502231	61,42461855	119,8936424	0,5123255891	1,311309146	3732,137225	24,22387803	77,22387803
ED5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	32	3754,665428	408,1654999	48,9468728	117,5338605	0,427953337	1,42490888	3142,62532	18,99158063	61,99158063
E19	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	53	2551,685044	267,711487	42,97830299	87,13896879	0,503915298	1,21801557	3850,696749	31,00640112	144,00640112
FP7	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	47	1848,702122	300,8576578	36,26482424	78,91454715	0,463343673	1,527434372	3145,089606	33,53871502	135,53871502
GA5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	32	2719,544083	346,1370323	46,60014357	84,9221677	0,539202902	1,566055688	2604,315797	19,10923696	50,10923696
G13	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	42	2897,584416	317,0288368	46,96721629	86,8083719	0,542806983	1,416425993	3037,208654	25,3649074	78,3649074
G19	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	56	1766,127032	228,4023716	37,70567245	70,44651849	0,537065156	1,26975961	3274,327701	32,72898645	145,72898645
GY6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	44	3324,654689	290,4827046	47,76371693	97,04780606	0,489966273	1,190909006	3247,494368	23,23237684	77,23237684
HA4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	45	2275,639645	228,6564617	40,38773527	79,14084402	0,531237434	1,141701004	2886,887225	27,4266113	96,4266113
HR9	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	42	3107,116805	329,2306098	49,09441	97,71160793	0,521808503	1,33567777	2886,887225	27,68976887	77,68976887
IF3	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	48	2190,514797	251,6903139	37,18946105	86,32227695	0,447224962	1,182933546	3221,756273	26,83540755	113,83540755
IK8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	40	3761,923973	295,2516314	51,1396041	95,528743	0,498043234	1,165890213	3482,696749	22,2700396	79,2700396
KL5	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	56	1680,835701	206,843977	34,87928875	68,96209257	0,521783136	1,188373904	3025,434844	37,42410081	153,42410081
KO7	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	40	2921,62854	341,8874864	48,94754727	88,53937311	0,550695723	1,484622559	3212,446749	21,55774333	74,55774333
LP1	T2	A1	A1_T2	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	34	1951,610864	330,3235046	38,72147097	75,67069024	0,507470224	1,675333467	2743,684844	16,85537968	70,85537968
MS7	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	48	3172,418957	312,0608592	47,26932191	98,39307329	0,485833005	1,27559453	3513,637225	26,20473553	92,20473553
OY5	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	47	2942,934966	299,5713186	47,06378146	92,7384082	0,4529989792	1,289790543	3513,383416	29,70182374	105,70182374
P18	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	41	3127,253801	320,986671	47,26255949	96,70820002	0,51260687	1,323161278	3295,958654	30,7140389	108,7140389
PM8	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	48	3653,487469	318,2095289	54,71131524	98,57574931	0,537686954	1,23419815	3430,672939	32,56280868	95,56280868
QC6	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	47	2717,432589	319,3387534	45,07498832	89,8665007	0,513749365	1,410541766	3930,137225	32,7292991	146,7292991
QH5	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	49	2570,121677	333,2628212	43,77378927	97,96315037	0,510023219	1,49243979	3052,268178	28,01826628	95,01826628
QP4	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	50	3139,322611	327,3128302	51,70332903	91,59948587	0,572509892	1,355114045	3555,803892	25,90673244	84,90673244
RL4	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	44	2256,972697	268,8674726	36,17182242	88,1043386	0,448482043	1,247826569	3555,803892	24,20060725	119,20060725
RM9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	55	2694,752357	297,8378411	45,8485801	86,04446523	0,541955353	1,347895556	3555,803892	42,50994122	149,50994122
RP9	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	43	2790,237968	277,4864027	44,03070129	92,38503312	0,488520443	1,136492456	2809,12532	27,25089414	79,25089414
RR9	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	44	5814,010977	420,3263075	68,22473005	128,1715517	0,524658813	1,270231944	4303,577701	28,97005969	95,97005969
SF6	T2	A1	A1_T2	Ctrl	Young	Young_Ctrl	C4x01_Lam	59	2235,144891	232,1511041	42,67137009	77,5491466	0,546999659	1,166759399	3850,696749	40,42620765	191,42620765
TH6	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	47	2475,779802	278,9877249	41,93837544	87,7457261	0,475779552	1,264759189	3585,101511	33,03044539	142,03044539
UI2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	48	2877,805342	289,0601124	48,60348993	89,24189306	0,548441068	1,288401238	3054,184844	31,65654176	90,65654176
VO8	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	42	2417,730567	271,3110663	41,43885697	85,18866286	0,499968924	1,276397162	2691,661035	22,24076841	72,24076841
VP2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	38	3249,147247	305,8096496	43,32921259	100,4699928	0,460703974	1,23163939	3321,696749	20,61088643	78,61088643
WL2	T1	A1	A1_T1	Sprint	Young	Young_Sprint	C4x01_Lam	54	3566,070866	311,8346146	54,37171371	93,36169572	0,576248392	1,277012093	3812,363416	37,93103266	126,93103266
XF8	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	37	2734,120022	332,0433697	44,75068734	85,64928219	0,524864732	1,51649193	3256,803892	18,20773667	68,20773667
XV3	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	31	4850,982915	491,1377719	59,81306169	126,7183	0,483145234	1,537117367	3256,803892	19,52946494	57,52946494
YB2	T1	A2	A2_T1	Sprint	Old	Old_Sprint	C4x01_Lam	42	3568,725319	338,3601081	51,46854514	101,6424882	0,514756041	1,307453255	3256,803892	26,47358615	84,47358615
YQ2	T2	A2	A2_T2	Ctrl	Old	Old_Ctrl	C4x01_Lam	48	2022,58766	232,7391745	38,73107477	78,47483504	0,514163957	1,185832674	3430,672939	28,88423175	136,88423175

SubjID = Probandenidentifikationsnummer, SportGroupC, AgeGroupC, AgeSportGroupC, SportGroup, AgeGroup, AgeSportGroup = Gruppenzuordnung der Probanden (T1 = Sprint, T2 = Control, A1 = Young, A2 = Old, C = concealed/verdeckt), StainVersion = Färbeversion (Kollagen_IV_Laminin_γ-1), NFibers_outer = Anzahl der randständigen Fasern der ROI, FiberArea_outer (μm²) = durchschnittliche Fläche der randständigen Fasern der ROI, Perimeter_outer (μm) = durchschnittlicher Umfang der randständigen Fasern der ROI, FeretMin_outer (μm) = durchschnittliches minimales Feret der randständigen Fasern, FeretMax_outer (μm) = durchschnittliches maximales Feret der randständigen Fasern, FeretRatio_outer = durchschnittliches Feretverhältnis der randständigen Fasern, Tortuosity_outer = durchschnittliche Gewundenheit der randständigen Fasern, Peri_ROI (μm) = Umfang der ROI, NFibers_outer_adjusted = adjustierte Faseranzahl für die randständigen Fasern, NFibers_total_adjusted = adjustierte Faseranzahl gesamt, die Tabelle wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Jörn Rittweger erstellt

Tab.6 Daten Kollagen_I

	Y.Control												AVERAGE	Standard deviation	
	Malicot_K85	Malicot_G3	Malicot_P18	Malicot_E9	Malicot_BK1	Malicot_F3	Malicot_B5	Malicot_GMS	Malicot_SF6	Malicot_BW3	Malicot_C01	Malicot_RL4			
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1.12604194	1.51512403	1.217810497	1.2064862	1.89889283	1.21008462	1.21582927	2.36320093	1.21293139	1.21323599	1.52218288	1.208719926	1.208719926	1.208719926	1.208719926
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from screenshot b/w image	1.47875854	2.29500895	1.48206206	1.45308817	3.60380936	1.484306184	1.47821444	5.585141479	1.471202434	1.469735782	4.40735782	1.469735782	1.469735782	1.469735782	1.469735782
ROI Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	324899	483664	322899	369000	181760	191828	238780	83200	266716	274768	231812	318073	318073	318073	318073
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	480447.0065	375477.655	478879.3679	537115.5427	658595.5348	280894.5392	338192.0766	464795.4739	383933.2284	408231.6829	483261.639	537115.5427	464702.9589	464702.9589	464702.9589
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	690.2738095	620.440476	699.7202381	740.1071429	818.827381	535.8452381	598.2738095	675.7619048	617.572381	657.9642857	740.1071429	675.7619048	675.7619048	675.7619048	675.7619048
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	695.0238095	623.4642857	694.889048	725.7212429	804.3154762	524.2083333	565.2707619	687.8095338	635.75	613.744026	725.7212429	687.8095338	687.8095338	687.8095338	687.8095338
Total Number of Fibers	131	66	66	112	99	65	123	82	108	84	70	108	84	70	108
Number of Intact Fibers	90	39	41	68	58	46	38	81	46	41	71	54	41	71	54
Number of Trimmmed Fibers	41	27	25	44	41	20	27	42	36	29	39	30	39	30	30
Total Fiber Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	239921	138134	254115	308476	156255	169959	169959	68018	211588	233717	191457	238899	238899	238899	238899
Total Fiber Area [µm²] (white)	354785.1063	317100.5258	376868.4034	449020.2929	564085.2741	248871.6714	250115.4951	379890.1532	310288.7806	345002.2377	443616.0866	349032.3615	349032.3615	349032.3615	349032.3615
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	1210.24944	6040.010015	7044.269222	4989.114855	7185.805403	4079.863466	4856.613256	3724.413256	4863.887197	6189.229508	4955.592946	5054.400118	5183.246826	5183.246826	5183.246826
Total Endomysium Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	84978	25430	68784	60524	26225	21869	21869	59582	15202	55128	41041	40355	79172	79172	79172
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	11566.2002	5837.12824	102010.8646	88099.24988	84509.81067	32022.86777	88076.58147	84005.32077	81104.44779	60319.46522	83504.14709	115670.5976	115670.5976	115670.5976	115670.5976
Total Endomysium Area [µm²] (black)	0.161552052	0.15547481	0.21302017	0.16402168	0.143502052	0.11400317	0.164039604	0.182674435	0.206691762	0.149371447	0.174085034	0.248912979	0.248912979	0.248912979	0.248912979
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	10.5986376	6.749016904	13.48385074	7.46457958	4.947567133	4.665199889	14.93630701	3.695192263	10.41369013	8.03910016	6.352082625	13.5011393	13.5011393	13.5011393	13.5011393
Total Endomysium Area / Total Fiber Area	12.88841979	10.22539717	16.42077497	9.00091291	9.332039472	5.642824329	18.15674917	8.732812374	12.63109112	9.746013384	8.668079257	16.31906543	16.31906543	16.31906543	16.31906543
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	769.031467	444.809324	1285.682243	672.488889	304764331	358.5081967	1156.932089	149.0921157	861.375	709.4774775	450.8938457	1147.24029	1147.24029	1147.24029	1147.24029
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	1137.11272	111.945319	1806.747001	978.880542	1205.946543	524.9650453	1710.214288	831.4051056	1267.256997	1088.839508	1044.7471272	1676.388475	1206.795668	1206.795668	1206.795668

	Y.Jump												AVERAGE	Standard deviation	
	Malicot_QH5	Malicot_WL2	Malicot_QY6	Malicot_RP9	Malicot_WL2	Malicot_DK8	Malicot_QC6	Malicot_RM9	Malicot_C01	Malicot_U1	Malicot_U2	Malicot_U3			
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1.208097934	1.88774331	1.20305875	1.506681587	1.52272285	1.21381623	1.521460875	1.086719006	0.973296342	1.518101517	1.518101517	1.518101517	1.518101517	1.518101517	1.518101517
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from screenshot b/w image	1.459500618	3.56537564	1.447350555	2.27089404	2.318684888	1.473508594	2.318483193	1.80002078	0.946049620	2.306462268	2.306462268	2.306462268	2.306462268	2.306462268	2.306462268
ROI Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	255420	104610	287826	177888	285888	324864	195794	242126	426600	337984	337984	337984	337984	337984	337984
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	37278.6417	37278.6417	416485.0024	403821.0039	463420.4762	478489.8958	453323.4081	403821.0039	403821.0039	403821.0039	403821.0039	403821.0039	403821.0039	403821.0039	403821.0039
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	62.8124286	62.8124286	643.514762	657.9642857	817.1845238	699.5833333	675.4880952	658.1011905	657.9642857	596.571429	596.571429	596.571429	596.571429	596.571429	596.571429
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	599.5095924	599.5095924	647.5995238	613.744026	810.6130952	684.25	670.970381	613.744026	613.744026	613.744026	613.744026	613.744026	613.744026	613.744026	613.744026
Total Number of Fibers	77	54	56	60	111	67	66	86	70	58	70	58	70	58	70
Number of Intact Fibers	47	39	28	32	80	30	47	58	61	43	43	43	43	43	43
Number of Trimmmed Fibers	30	15	28	28	31	27	39	30	30	29	29	29	29	29	29
Total Fiber Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	21584	8413	23800	24278	28245	28245	28245	2760	34700	10560	10560	10560	10560	10560	10560
Total Fiber Area [µm²] (white)	315068.2363	300591.1088	345627.2649	342154.8952	56270.055	420576.1904	380676.4932	328500.3095	253418.379	328500.3095	253418.379	328500.3095	328500.3095	328500.3095	328500.3095
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	1481.83871	1637.883495	5885.714286	3275.886957	2415.462887	6581.494253	2508.015028	3781.187671	4240.764331	1946.19469	1946.19469	1946.19469	1946.19469	1946.19469	1946.19469
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	5081.745747	5936.711725	8229.220699	7438.14531	5600.697066	9668.41817	5805.661337	4461.92731	4184.17318	4485.284491	4485.284491	4485.284491	4485.284491	4485.284491	4485.284491
Total Endomysium Area [µm²] (black)	39546	20359	49026	21265	4294	49409	29011	66182	79570	66182	66182	66182	66182	66182	66182
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	57171.41142	72184.4789	70971.79853	61666.97866	99550.42118	58113.70543	67155.51887	78094.89754	75321.35442	64585.32284	64585.32284	64585.32284	64585.32284	64585.32284	64585.32284
Total Endomysium Area / ROI Area	0.154627343	0.193962174	0.170332076	0.152708446	0.15028829	0.121403171	0.148171087	0.193924477	0.186521591	0.203099011	0.203099011	0.203099011	0.203099011	0.203099011	0.203099011
Total Endomysium Area / Total Fiber Area	7.468848422	1.047748895	11.7005612	7.591466263	5.24651485	8.217600218	5.93174465	9.374390015	10.169282056	8.013954272	8.013954272	8.013954272	8.013954272	8.013954272	8.013954272
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	9.022780021	13.30434239	14.08368365	11.43867886	8.44921919	10.04231285	9.021514941	10.8329098	9.884017683	12.06602158	10.8257446	19.02276665	19.02276665	19.02276665	19.02276665
Total Endomysium Area / Total Fiber Area	0.18319034	0.240174983	0.205301508	0.18023285	0.178861173	0.138116404	0.173945897	0.239760319	0.219288534	0.245811961	0.20211863	0.032764115	0.032764115	0.032764115	0.032764115
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	619.0190407	1.01184982	1.686.01784	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408	1.849.848408

	O.Control												AVERAGE	Standard deviation	
	Malicot_CCF	Malicot_M57	Malicot_YQ2	Malicot_OP4	Malicot_RK8	Malicot_TN6	Malicot_RR8	Malicot_VP2	Malicot_HA4	Malicot_XB8	Malicot_U1	Malicot_U2			
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1.151645918	1.514822122	1.507873213	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021	1.215232021
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from screenshot b/w image	2.299802212	2.294868044	2.273685104	0.907811544	2.314728034	1.470236054	1.470236054	2.298059954	1.477018258	2.298059954	1.477018258	1.461905787	1.461905787	1.461905787	1.461905787
ROI Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	219282	259081	212529	32190	198044	314621	314621	216209	280919	280919	280919	280919	280919	280919	280919
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	504262.69	594505.6317	489512.6166	293795.6479	663322.2037	463495.1717	463495.1717	498861.2445	264445.1090	264445.1090	264445.1090	264445.1090	264445.1090	264445.1090	264445.1090
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	688.0833333	773.280952	699.7202381	543.6488095	675.351905	690.2738095	675.4880952	675.4880952	524.8212428	524.8212428	524.8212428	524.8212428	524.8212428	524.8212428	524.8212428
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	732.8511905	768.8571429	699.5833333	539.6785714	671.0071429	670.1488095	687.8095338	697.5297619	504.2022381	504.2022381	504.2022381	504.2022381	504.2022381	504.2022381	504.2022381
Total Number of Fibers	61	54	60	60	107	69	69	66	71	76	76	76	76	76	76
Number of Intact Fibers	35	49	78	43	33	48	25	48	29	48	29	48	29	48	29
Number of Trimmmed Fibers	26	24	24	24	29	33	30	22	30	28	26	29	26	29	26
Total Fiber Area [µm²] (from Infranview, v.4.60)	104817	116311	179511	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278	24278
Total Fiber Area [µm²] (white)	423465.9551	499485.4818	399965.8789	22587.8189	383939.0337	383366.7918	417211.8554	429321.2625	210551.4171	22095.8626	22195.971				

Tab.7 Daten Kollagen_III

Collagen III	Y.Control												Average	Standard deviation	
	Mallcot_K85	Mallcot_G83	Mallcot_PN8	Mallcot_EJ9	Mallcot_BK1	Mallcot_I#3	Mallcot_B#5	Mallcot_GM5	Mallcot_S#6	Mallcot_BW3	Mallcot_C01	Mallcot_RL4			
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from Infranview v.4.60	0.9400575	2.29575749	1.51181439	1.50903187	1.88937651	1.03604904	1.21689256	1.21855877	0.96975936	1.51628519	1.21657101	1.51600047	1.51600047		
ROI Area [µm²] (from Infranview v.4.60)	197100	163900	264488	310566	156414	261200	277700	313028	417292	262880	362976	202038	202038		
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	185441.3573	375563.8477	604090.1248	707821.0639	558251.9678	280821.7736	403821.6629	464795.4279	392903.2384	604383.3708	537320.8669	464702.8989	464702.8989		
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	437.2738095	603.809524	802.672619	865.921699	741.982149	535.8452381	657.9642857	675.169048	602.672619	740.107149	740.107149	740.107149	740.107149		
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	424.1309524	623.4642857	752.9761905	817.047619	571.4702381	524.2083333	613.7440476	687.8092338	635.375	752.9761905	725.8690476	687.672619	687.672619		
Total Number of Fibers	36	48	47	83	57	34	68	98	98	65	76	77	77		
Number of Intact Fibers	27	30	28	45	35	21	32	42	30	30	38	42	42		
Number of Trimmed Fibers	16680	139567	198481	247239	131485	230414	273932	345650	331042	204997	299186	156881	156881		
Total Fiber Area [µm²] (white, from Infranview v.4.60)	156273.0706	320412.5118	453645.8786	565234.9551	499343.4368	247329.2634	337570.9776	364750.1474	330122.8453	470393.6266	442878.871	340838.814	340838.814		
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	3355.151151	2215.84206	3253.788885	2343.49763	1764.899219	4654.828283	2713.47619	2064.28714	4333.85182	2248.318881	3116.520833	1824.197674	1824.197674		
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	3157.03173	5085.905108	7436.779978	5348.719006	6299.911904	4996.49027	4018.19021	3065.12763	4075.652411	3691.660479	4611.591532	4195.795132	4195.795132	4787.612918	1242.891441
Total Endomysium Area [µm²] (black)	31020	24023	65957	63327	24929	31206	44768	62378	66210	58283	63790	45157	45157		
Total Endomysium Area / ROI Area	29188.28667	55150.98841	150749.7923	144265.1591	88985.53095	33496.50425	66293.68628	100045.3296	62265.3816	13999.7673	94412.07986	103864.5775	103864.5775		
Total Endomysium Area / ROI Area	0.15738204	0.14684829	0.24942305	0.20398848	0.159378317	0.119279872	0.164165755	0.2154592	0.158681085	0.221709255	0.175741647	0.223507459	0.223507459		
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	7.85062094	5.170660823	15.45751122	7.9517583	5.329441169	6.828197833	6.720780306	7.85715418	8.195759809	8.860464925	7.677404792	8.13902588	8.13902588		
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	7.901611302	8.440520551	20.34521386	11.97112048	10.00906003	6.86714598	6.178378647	8.37421877	7.345721563	11.62499716	9.340395609	11.34163537	11.34163537	10.5093446	3.70051888
Total Endomysium Area / Total Fiber Area	0.186777457	0.171212161	0.233088886	0.261136775	0.189959771	0.135424479	0.196409455	0.274285511	0.1886991	0.284672351	0.212111848	0.287842377	0.287842377	0.286467004	0.058955965
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	626.666667	381.1214286	1081.262295	800.259242	334.6174497	630.4242424	532.952381	566.2016897	817.407474	640.4725275	664.4791667	515.9813953	515.9813953		
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	589.652357	875.412514	2471.39029	1367.442266	1194.436657	676.6970955	786.210551	840.710557	768.7004941	1472.524916	983.595653	1207.72466	1207.72466	1105.108891	512.428485

Collagen III	Y.Jump												Average	Standard deviation	
	Mallcot_GMS	Mallcot_GAS	Mallcot_GY6	Mallcot_RP9	Mallcot_WL2	Mallcot_DK8	Mallcot_K07	Mallcot_QC6	Mallcot_BM9	Mallcot_C01	Mallcot_RL4				
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from Infranview v.4.60	3.720086012	1.216499915	1.506544444	1.213631621	1.895146218	1.906879919	1.513371346	1.120016733	1.861735739	1.215018117	1.215018117	1.215018117	1.215018117		
ROI Area [µm²] (from Infranview v.4.60)	15.69729746	1.479871887	2.26991228	1.47285525	3.591579315	3.636182928	2.320292832	1.464105033	0.963851071	1.473629996	1.473629996	1.473629996	1.473629996		
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	27216	251904	231832	274716	184468	178464	295978	275808	409074	341905	341905	341905	341905		
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	372785.6477	372785.6477	604090.1248	403821.6639	662511.4553	648932.7163	954509.6239	403821.6639	30738	80094	65989	65989	65989		
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	611.8214286	611.8214286	712.7261905	857.9642857	817.3214286	791.5833333	768.871429	657.9642857	658.101905	712.7261905	712.7261905	712.7261905	712.7261905		
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	599.5059524	599.5059524	706.4285714	613.7440476	810.6130952	773.2380952	613.7440476	613.7440476	613.7440476	706.4285714	706.4285714	706.4285714	706.4285714		
Total Number of Fibers	68	30	36	69	118	67	42	58	66	106	97	92	92		
Number of Intact Fibers	40	38	36	37	42	39	28	33	39	66	63	63	63		
Number of Trimmed Fibers	28	27	31	30	40	25	33	40	36	29	29	29	29		
Total Fiber Area [µm²] (white, from Infranview v.4.60)	21898	20771	195342	238413	155343	148849	212329	237072	338980	297956	297956	297956	297956		
Total Fiber Area [µm²] (white)	299395.5219	306718.5437	442366.0214	336830.6239	557211.7025	541210.1919	488508.0266	347126.7174	450161.6172	4290.886076	3549.109077	3549.109077	3549.109077		
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	404.7777778	44788.0486	3793.048544	4229.87037	1585.132653	2731.174312	2983.146853	2756.156163	4290.886076	3549.109077	3549.109077	3549.109077	3549.109077		
Estimated Mean Fiber Area [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	5544.361629	6596.44116	8600.040009	6239.983699	5693.129648	9931.064072	6832.179854	4033.114621	3135.57819	5239.44413	5239.44413	5239.44413	5239.44413		
Total Endomysium Area [µm²] (black)	5083	44633	26890	45763	29125	29615	46283	40738	80094	65989	65989	65989	65989		
Total Endomysium Area [µm²] (black)	69623.3483	68051.12192	6014.120564	67402.29188	104640.7479	106765.7164	106765.7164	106765.7164	106765.7164	71795.0114	9743.34249	9743.34249	9743.34249		
Total Endomysium Area / ROI Area	0.186777457	0.171212161	0.119414892	0.16891038	0.157886463	0.16594382	0.178300935	0.140445527	0.191123277	0.193514243	0.193514243	0.193514243	0.193514243		
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	3.958660059	10.67240756	5.94005352	9.28574852	4.78597747	7.93021866	6.025974724	5.90068806	10.2104967	9.56783076	9.56783076	9.56783076	9.56783076		
Estimated Mean Endomysium Diameter [µm]	12.041847526	12.041847526	14.94899071	11.2495177	9.07102188	14.96714571	11.2495177	11.2495177	10.3457182	10.3457182	10.3457182	10.3457182	10.3457182		
Total Endomysium Area / Total Fiber Area	0.232464436	0.215334444	0.135608318	0.200351994	0.187483332	0.19860022	0.216990553	0.163393399	0.236279472	0.239847502	0.239847502	0.239847502	0.239847502		
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	94.12963863	959.4894624	514.368932	847.462963	297.1938776	543.3949564	647.3146833	450.4186047	813.7484211	851.6	851.6	851.6	851.6		
Total Endomysium Area / Fiber Number [1/2 intact + 1/2 trimmed fibers] [µm²]	1189.212537	1420.454535	1167.485632	1248.193592	1067.395383	1975.884705	1482.540184	659.4761225	977.152043	1257.191529	1254.506498	1254.506498	1254.506498		

Collagen III	O.Control												Average	Standard deviation	
	Mallcot_CL7	Mallcot_M57	Mallcot_V02	Mallcot_QP4	Mallcot_B#8	Mallcot_T#6	Mallcot_R#3	Mallcot_VP2	Mallcot_H#4	Mallcot_X#8	Mallcot_U#2				
Number of ROI	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor line = SQRT(Pixel factor area)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Pixel factor area = ROI Area Zeiss ZEN in µm² / total pixel number ROI area from screenshot/w/ image	1.121520995	1.508127525	1.028124057	1.20042829	1.521422022	1.508815891	1.897344764	1.216982939	1.215658929	1.215658929	1.215658929	1.215658929	1.215658929		
ROI Area [µm²] (from Infranview v.4.60)	1.470220212	2.274448631	0.861412655	1.462900334	2.31472497	2.76252394	5.599917153	1.495970774	1.481048353	1.477356769	1.477356769	1.477356769	1.477356769		
ROI Area [µm²] (from Zeiss ZEN)	187146	231368	581155	267027	195604	177422	184049	141602	141602	141602	141602	141602	141602		
ROI Width [µm] (from Zeiss ZEN)	25170.4158	503490.1446	489416.8215	38407.8884	453322.4081	403905.6884	662532.3527	496861.2445	170202.0764	269835.505	274786.8796	274786.8796	274786.8796		
ROI Height [µm] (from Zeiss ZEN)	548.7142857	706.4285714	699.446286	615.9702381	613.7440476	810.75	697.5297619	410.1666667	520.922619	512.4702381	512.4702381	512.4702381	512.4702381		
Total Number of Fibers	69	69	122	61	47	77	51	61	81	42	81	81	81		
Number of Intact Fibers	20	42	37	25	27	45	38	41	25	19	47	47	47		
Number of Trimmed Fibers	18918	18749	423066	208354	161130	154938	15471	27449	93158	148709	399866	399866	399866		
Total Fiber Area [µm²] (white, from Infranview v.4.60)	23841.6111	427025.4561	364435.08												