

*Originalarbeiten / Original Works*

## **Die Bedeutung des Kollagens bei der Wundaltersbestimmung\***

**W. Eisenmenger<sup>1</sup>, A. Nerlich<sup>2</sup> und G. Glück<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Frauenlobstrasse 7a, D-8000 München 2, Bundesrepublik Deutschland

<sup>2</sup>Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Thalkirchner Strasse 36, D-8000 München 2, Bundesrepublik Deutschland

### **The Importance of Collagen in the Determination of Wound Age**

**Summary.** The aim of the present study was to find out whether the quantitative and/or qualitative analysis of collagen can be useful in the determination of the age of healing skin wounds in various body regions of patients of different ages and sex. The quantitative measurement of total wound collagen revealed no clear time-dependent changes. Immunohistochemical staining for collagen types I and III demonstrated the presence of type III as early as 2 days after injury. Procollagen type I was found in wounds beginning from 4 days on, while type I collagen was not present before 6 days after the injury. Immunohistochemical analysis of specific basement membrane proteins, collagen type IV and laminin, showed a reconstruction of the epithelial basement membrane beginning from on day 5, while a completely rebuilt basement membrane was found in most cases after more than 14 days, depending on the dimension of the wound and its treatment.

**Key words:** Age determination of injuries, regeneration of collagen – Regeneration of collagen, age determination of injuries

**Zusammenfassung.** An autoptisch gewonnenem Wundgewebe aus verschiedenen Körperpartien von Patienten unterschiedlichen Lebensalters und beiderlei Geschlechts wurde versucht, eine Wundaltersbestimmung mittels quantitativer und qualitativer Kollagenanalyse durchzuführen. Die quantitative Bestimmung des gesamten Wundkollagens pro Gewichtseinheit ergab keine zeitkorrelierten gesetzmäßigen Veränderungen. Bei der immunhistologisch getrennten Darstellung von Kollagen III und Prokollagen und Kollagen I konnte Kollagen III frühestens nach mehr als 2 Tagen, Prokollagen I nach 4 Tagen und Kollagen I nach 6 Tagen nachgewiesen werden. Die Darstellung der epithelialen Basalmembran mittels immunhistologischem Nach-

\* Auszugsweise vorgetragen auf der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Hamburg, 1985. Die Untersuchungen wurden unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, D-5300 Bonn 2, Bundesrepublik Deutschland

*Sonderdruckanfragen an:* W. Eisenmenger

weis von Laminin und Kollagen IV ergab, daß mit einer Neubildung erst nach mehr als 5 Tagen und mit einer Komplettierung, in Abhängigkeit von Wundgröße und -behandlung, in den meisten Fällen erst nach 14 Tagen zu rechnen ist.

**Schlüsselwörter:** Wundaltersbestimmung, Kollagenanalyse – Kollagenneubildung, Wundaltersbestimmung

## Einleitung

Mit den makroskopischen, histologischen und biochemischen Vorgängen bei der Wundheilung haben sich Pathologen, Chirurgen und Rechtsmediziner seit vielen Jahrzehnten beschäftigt. Während sich die ersteren aus klinischem Interesse vor allem mit den Störungen der Wundheilung auseinandersetzen, lag das Interesse der Rechtsmedizin speziell bei der Wundaltersbestimmung, da die Entstehungszeit einer Verletzung oftmals von entscheidender Bedeutung bei der Abklärung kriminalistischer und forensischer Fragestellungen ist. Das einschlägige Schrifttum ist, worauf Berg schon 1972 hingewiesen hat, kaum mehr überschaubar, so daß hier nur stellvertretend einige Autoren genannt seien: Marchand (1901); Arey (1936); Allgöwer (1956); Ross und Benditt (1961); Lindner (1962); Zollinger (1962); Oehlert (1966); Hernandez-Richter und Struck (1970). Von den zahlreichen rechtsmedizinischen Untersuchungen zu diesem Thema sind die von Walcher (1930); Raekallio (1965); Pioch (1966) und Berg (1972) von fortdauernder praktischer Bedeutung.

Grundsätzlich unterscheidet man drei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen der Wundheilung, die sich durch pathologisch-anatomische und biochemische Kriterien abgrenzen lassen: Exsudative, proliferative und reparative Phase. Sichtet man die in der rechtsmedizinischen Literatur angegebenen Kriterien der Wundaltersbestimmung, so stellt man fest, daß sich die meisten auf das exsudative Stadium beziehen, wenige nur dagegen auf die beiden späteren Phasen, für die die Synthese kollagenen Bindegewebes kennzeichnend ist. Dies hat seine Ursache ohne Zweifel darin, daß im exsudativen Stadium das in regelhafter Reihenfolge zu beobachtende Auftreten unterschiedlicher Zelltypen gute Anhaltspunkte für die zeitliche Einordnung liefert, während nach der Bildung von Bindegewebsfasern ein relativ stationärer Zustand erreicht wird, der mikroskopisch kaum noch Unterscheidungskriterien bietet.

Voraussetzung der Neubildung kollagenen Bindegewebes ist das Vorhandensein mitogener Stoffe wie des Fibronektins und nicht-mitogener Stoffe wie der Prostaglandine oder des Histamins. Deshalb hat man sich zunächst bemüht, diese Substanzen histochemisch zu erfassen. Vor allem Berg et al. (1968) und Berg (1972) und Raekallio (1965, 1970) haben systematisch die sich hier ergebenden Möglichkeiten überprüft und aus der Kombination des Nachweises der einzelnen Stoffe gute Kriterien zur zeitlichen Einordnung angegeben. Das Auftreten von Mukopolysacchariden als Vorläufer der Kollagensynthese hat Raekallio (1965) allerdings als wenig tauglich zur Altersbestimmung eingestuft.

Zu den Zeitabläufen der Kollagenbildung selbst finden sich im rechtsmedizinischen Schrifttum nur relativ wenige Angaben. Der Beginn der Faserbildung

wird auf den 4. bis 5. Tag festgelegt. Hegemann et al. (1950) wiesen darauf hin, daß sich danach die Veränderungen der polarisationsoptischen Aktivität der Kollagenfibrillen innerhalb der ersten 6 Monate zur Altersbestimmung verwenden ließen. Eine routinemäßige Anwendung dieses Vorschlages in der forensischen Praxis ist aber unseres Wissens bisher nicht erfolgt.

Die Einführung immunhistochemischer Methoden versprach tiefere Einblicke in das Verhalten des Kollagens während der Wundheilung. Vor allem die Differenzierung verschiedener Kollagentypen und die Kollagenreifung schien nun durch selektive Darstellung mikroskopisch faßbar. Denn Kollagen, das wichtigste Strukturprotein des Bindegewebes, ist nicht ein einzelnes Protein, sondern kommt in unterschiedlichen Typen vor. Bisher sind mindestens 10 verschiedene Typen bekannt, die sich in ihrem Aufbau und der makromolekularen Struktur teils prinzipiell unterscheiden und nach ihrem Vorkommen im Gewebe in interstitielle und Basalmembrankollagene unterteilt werden. Grundsätzlich bestehen die interstitiellen Kollagene aus drei Polypeptid-Ketten, sogenannten Alpha-Ketten, die ihrerseits aus je ca. 1.000 Aminosäuren zusammengesetzt sind. Diese Alpha-Ketten sind zu einer Helix verdrillt. Die Enden der Helix dagegen sind nicht in der Form der dreifachen Spirale angeordnet. Diese kurzen, nicht-helikalen Bereiche sind wichtig für die Quervernetzung. Die Alpha-Ketten sind charakteristischerweise reich an den Aminosäuren Prolin und Lysin, welche meist in ihrer hydroxylierten Form vorliegen und ferner an Glycin, das fast an jeder dritten Position lokalisiert ist. Die Länge eines solchen interstitiellen Kollagenmoleküls liegt bei ca. 300 nm, der Durchmesser bei 1,4 nm. Einen Überblick über die verschiedenen Kollagentypen und ihr Vorkommen gibt Tabelle 1 (nach Hein et al. 1985).

Zu den interstitiellen Kollagenen werden die Typen I bis III und V gerechnet. Typ IV, das Basalmembrankollagen, unterscheidet sich von ihnen durch seine deutlich größeren Alpha-Ketten, hat deshalb ein höheres Molekulargewicht (180 kD) und weist außer den Helix-Formationen globuläre Segmente auf.

**Tabelle 1.** Polymorphismus des Kollagens (nach Hein et al. 1985)

Typen	$\alpha$ -Ketten	Vorkommen
Typ I	$\alpha_1(\text{I})$ $\alpha_2(\text{I})$	Knochen, Sehne, Haut, innere Organe
Typ II	$\alpha_1(\text{II})$	Knorpel, Glaskörper des Auges
Typ III	$\alpha_1(\text{III})$	Haut, innere Organe
Typ IV	$\alpha_1(\text{IV})$ $\alpha_2(\text{IV})$	Basalmembran
Typ V	$\alpha_1(\text{V})$ $\alpha_2(\text{V})$ $\alpha_3(\text{V})$	zellgebunden, Basalmembran assoziiert
Typ VI	$\alpha_1(\text{VI})$ $\alpha_2(\text{VI})$ $\alpha_3(\text{VI})$	Haut, innere Organe, Blutgefäße (Intima), Gebärmutter, Plazenta
Typ VII	unklar	Amnion, Verankerungsfibrillen
Typ VIII	$\alpha(\text{VIII})$	Endothelzellen
Typ IX	$\alpha(\text{IX})$ $\alpha(\text{IX})$ $\alpha(\text{IX})$	hyaliner Knorpel
Typ X	$\alpha(\text{X})$	epiphysialer Knorpel

Die interstitiellen Kollagene werden in einer Vorläuferform synthetisiert. Diese Prokollagene sind dadurch charakterisiert, daß sie an den nicht-helikalen Enden zusätzliche Peptide, die sogenannten Prokollagen-Peptide, aufweisen.

Einblicke in die genetischen Grundlagen der Kollagensynthese liegen vor allem für die interstitiellen Typen vor. Es hat sich gezeigt, daß die codierenden Gene sehr groß sind, aber nur ein Teil der Aminosäuresequenzen, die sogenannten Exons, ihre Information bei der Kollagensynthese codierend weitergibt. Daneben finden sich sogenannte Introns, deren Information nicht in den Proteinen wiederkehrt. Im Rahmen der Transkription kommt es zur Bildung einer sehr großen Vorläufer-RNS, aus der diese Introns enzymatisch entfernt werden. Daraus resultiert eine Messenger-RNS, die translatierbar ist. Nach der Translation durchlaufen alle Kollagenmoleküle eine große Zahl sogenannter posttranslationaler Modifikationen, die enzymatisch gesteuert werden und sowohl intra- wie extrazellulär erfolgen. Beispielsweise werden einige Prolin- und Lysinreste hydroxyliert oder Hydroxylysinreste gluko- und galaktosyliert. Noch intrazellulär werden die Alpha-Ketten ausgewählt und zur Tripel-Helix geformt. Die Ausschleusung der nun vorliegenden Moleküle erfolgt über den Golgi-Apparat. Extrazellulär werden die amino- und carboxyterminalen Prokollagenpeptide durch Proteasen abgespalten und es kommt zur Aggregation der einzelnen Moleküle. Unter Einwirkung des Enzyms Lysyloxidase kommt es schließlich zur Aldehydbildung der an den nicht-helikalen Enden lokalisierten Lysin- und Hydroxylysinreste. Durch sogenannte Amadori-Umlagerung können dann stabile Quervernetzungen benachbarter Moleküle entstehen, die dem neugebildeten Gewebe die erforderliche Festigkeit verleihen.

Diese Vorgänge sind biochemisch eindeutig aufgeklärt. Nachdem die Kollagene I und III die wichtigsten interstitiellen Typen der Haut sind, galt ihnen das besondere Interesse. Es ergab sich, daß Typ III-Kollagen in der frühen Wundheilungsphase verstärkt produziert wird. Barnes et al. (1976) berichteten, daß in Hautwunden von Meerschweinchen nach 10 Tagen der Gehalt an Typ III-Kollagen deutlich höher war, als zu späteren Zeitpunkten, und ebenfalls nach 10 Tagen fand Bailey (1975) ein Überwiegen des Gehalts an Typ III-Kollagen gegenüber dem Typ I. Autoradiographisch ließ sich bereits nach 38 h im Tierversuch eine vermehrte Typ III-Kollagensynthese nachweisen (Clore et al. 1979).

Die vorgenannten Ergebnisse wurden anhand von Tierversuchen gewonnen, eine Anwendung am menschlichen Untersuchungsgut mit forensischer Fragestellung scheiterte allerdings methodisch aus mehreren Gründen. Einleuchtend ist, daß eine autoradiographische Markierung neu synthetisierten Kollagens am Menschen grundsätzlich ausscheidet. Die chemische Analyse dagegen hat ihre limitierenden Faktoren in der unvollständigen Extraktion und den unterschiedlichen Lösungsraten der verschiedenen Kollagentypen in verschiedenen Solventien, letztlich auch in den geringen Absolutwerten der Differenzen bei biochemischer Analyse, so daß z. B. methodisch bedingte Streuungen statistisch signifikante Unterschiede verdecken können.

Mit der Entwicklung der immunhistologischen Methoden wurde es möglich, selektiv bestimmte Grundsubstanzen von Geweben und Zellpopulationen auf der Basis von Antigen-Antikörper-Reaktionen zu erfassen und diese Reaktio-

nen histologisch sichtbar zu machen. Es bot sich an, das Auftreten der einzelnen Kollagentypen und ihrer Vorstufen im Rahmen der Wundheilung damit zu untersuchen, nachdem Furthmayr und Timpl (1976) über immunochemische Trennmöglichkeiten berichtet hatten. 1978 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe um Gay, der auch der Rechtsmediziner Raekallio angehörte, Ergebnisse einer Untersuchung, die sich mit dem Auftreten von Prokollagen und Kollagen der Typen I und III in heilenden menschlichen Wunden beschäftigte. Die Autoren hatten bei 10 Kindern zwischen 2½ und 14 Jahren, welche aus unterschiedlichen Indikationen operiert worden waren, an den Wundenden schwammartige Silikonimplantate, sogenannte „Cellstics“, am Ende der Operation eingebracht. Nach 24 bis 120 Stunden Verweildauer in den Wunden wurden die Implantate durch Zug entfernt, bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und Gefrierschnitte angefertigt, die mit Antiseren gegen Prokollagen und Kollagen I und III behandelt wurden. Erfolgte Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode sichtbar gemacht. Hierbei zeigte sich, daß in Implantaten, die 24 bis 48 h in der Wunde verblieben waren, erstmals Prokollagen und Kollagen III, dagegen noch kein Kollagen I vorhanden war. Nach 72 h wurden geringe Mengen Prokollagen und Kollagen I beobachtet. Im weiteren Verlauf wurde eine starke Zunahme des Kollagen I bei einem Wundalter von 96 bis 120 h registriert, während Prokollagen I und III und Kollagen III in etwa auf dem gleichen Stand blieben. Die quantitativen Aussagen basierten hierbei auf einer Schätzung der sichtbaren fluoreszenzoptischen Phänomene. Remberger und Hübner untersuchten 1979 Zell- und Gewebsreaktionen nach Implantation von xenogenem Kollagenschaum. Auch sie fanden eine Synthese von Kollagen III schon 3 Tage nach Implantation, Kollagen I dagegen erst später. Da diese Arbeit nicht mit dem Ziel der Wundaltersbestimmung durchgeführt wurde, enthält sie auch keine exakteren zeitlichen Angaben über das Auftreten der Kollagentypen.

Kurkinen et al. (1980) implantierten Zellulose-Schwämmchen, die zuvor 7 Tage in der Bauchhöhle von Mäusen belassen worden waren, bei den gleichen Tieren subkutan in der Halshaut und beobachteten das Auftreten von Fibronektin, Prokollagen und Kollagen I und III. Sie fanden ein sequentielles Auftreten von Fibronektin, Prokollagen III, Kollagen III und Kollagen I zwischen dem 2. und 7. Tag nach Wundsetzung, dagegen kein Prokollagen I. Exaktere Zeitangaben fehlen auch hier, da die Fragestellung nicht auf die Wundaltersbestimmung gerichtet war.

Außer diesen Untersuchungen zum Verhalten der interstitiellen Kollagene existieren auch erste Erkenntnisse zur Resynthese von Kollagen IV, aus dem, wie eingangs aufgeführt, sich die Basalmembran zu wesentlichen Teilen zusammensetzt. Grundsätzlich ist bekannt, daß es in einem sehr frühen Stadium der Heilung von Hautwunden – bereits Stunden nach der Wundentstehung – zu einer verstärkten Teilung und gerichteten Wanderung der randständigen Epithelzellen kommt, um die epitheliale Oberfläche wieder herzustellen. Dem geht, wie Oehlert und Büchner (1961) beobachteten, eine Vermehrung der Basalzellen in wundfernen Hautabschnitten voraus. Dies wurde so gedeutet, daß durch dieses primäre Zellwachstum ein Druck entstehe, der eine Zellverschiebung in Richtung der Wunde bedinge. Als Ursache des wundfernen Zellwachs-

tums seinerseits wurde der Verlust eines Mitosehemmstoffes durch Abstrom in den Wundbereich postuliert. Je nach Größe der Wundfläche kommt es zu einer zunehmenden epithelialen Deckung. Durch Kontaktinhibition stellen die wandernden Epithelzellen ihre Migration ein. In der Folge kommt es zu einer Ausreifung bis zur Neubildung des verhornenden Plattenepithels.

Clark et al. (1982) fanden experimentell bei Meerschweinchen, daß die wandernden Epithelzellen zunächst noch keine Basalmembran hatten, sondern daß die Migration auf einer provisorischen Matrix aus Fibrin und Fibronectin erfolgte. Erst nach Beendigung der Reepithelisation der Wunde tauchten die normalen Proteine der Basalmembran, Kollagen IV und Laminin auf. Dies geschah nach 7 bis 9 Tagen. Gleichzeitig kam es zu einem Schwund des Fibrins und Fibronectins. Auch diese Arbeit war bezüglich zeitlicher Festlegungen nicht so exakt, daß sie auf forensische Fragestellungen hätte übertragen werden können. Es kommt hinzu, daß bekanntermaßen die Wundheilung bei Kleintieren, die häufig zu Tierversuchen benutzt werden, wie Meerschweinchen oder Ratten, im Regelfall schneller abläuft als beim Menschen. Da es aber die Anforderungen an die Beweissicherheit im deutschen Strafverfahren nicht zulassen, daß mit vagen Angaben oder nicht exakt übertragbaren Tierversuchen ein Nachweis geführt wird, erschienen uns die Feststellungen aus den Untersuchungen von Clark et al. (1982), ebenso wie die eingangs zitierten Ergebnisse zur interstitiellen Kollagensynthese, nicht aussagekräftig und sicher genug für die forensische Praxis. Wir haben uns deswegen vom Experiment, speziell vom Tierexperiment, als Ausgangsbasis gelöst und Fälle aus dem Obduktionsgut zufällig herausgegriffen, so daß sowohl Lebensalter als auch Gesundheitszustand und Wundentstehung wie Wundbehandlung sehr variabel waren.

Wir sind außerdem einer Idee nachgegangen, die sich aus Untersuchungen von Dunphy und Udupa (1955); Grillo et al. (1958); Zeitz et al. (1978) und Hering et al. (1983) ergab. Diese Autoren berichteten übereinstimmend über einen zeitabhängigen, linearen Anstieg der Kollagenkonzentration im Narbengewebe bei Meerschweinchen und Ratten. Sie fanden nach Wundsetzung jeweils einen deutlichen Abfall der Kollagenkonzentration und dann den zitierten Anstieg, der jedoch nie die ursprünglichen Werte normaler Haut erreichte. Zeitz et al. (1978) hatten die Kollagen-Biosynthese über die Hydroxyprolinkonzentration erfaßt und ab dem 3. Tag nach Wundsetzung ebenfalls kontinuierlich ansteigende Werte gefunden. Aus diesen Ergebnissen ließ sich hypothetisch hoffen, daß eine quantitative Kollagenanalyse menschlichen Narbengewebes exakte Meßwerte liefern würde, die eng mit dem Wundalter korreliert sein könnten.

## Material und Methoden<sup>1</sup>

Es wurden insgesamt 94 Proben von Hautwunden Verstorbenen, die in gerichtlichem Auftrag obduziert wurden, entnommen. Voraussetzung war, daß exakte Angaben über die Entstehungszeit der Wunden vorlagen. 23 der Proben wurden zur quantitativen Analyse, 71 zur qualitativen verwendet. Das mittlere Lebensalter der Verstorbenen lag bei 50 Jahren mit

<sup>1</sup> Die experimentellen Untersuchungen sind wesentlicher Bestandteil der in Vorbereitung befindlichen zahnärztlichen Dissertation von Herrn Dr. med. G. Glück

Grenzwerten von 7 und 93 Jahren. Das Geschlechterverhältnis bei den Proben zur qualitativen Analyse betrug 34:37 männlich/weiblich.

#### *Methode zur quantitativen Kollagenbestimmung*

Aus dem Wundbereich wurden mehrere kleine Gewebstückchen mit einem Gewicht im Milligrammbereich entnommen. Mit einem Mindestabstand von 1 cm zum Wundgebiet wurden weitere, gleichartige Hautproben gesichert, die zur Bestimmung des Standards dienen. Nach Lyophilisierung (ca. 12-20 h) wurden die Trockengewichte der Proben bestimmt. Dann wurden den Hautstückchen ca. 2 ml 6N-HCl mit 1/2000 Mercaptoäthanol zugesetzt, anschließend wurden sie in N<sub>2</sub>-Atmosphäre in Glasröhrchen eingeschweißt und für 20–24 h bei 110°C hydrolysiert. Die HCl wurde danach im Evaporator entfernt. Das Hydrolysat (Aminosäuren) wurde in Auftragspuffer (Zitronensäure mit Na-Zitrat pH 2,1 aufgelöst. Die Aminosäure-Analyse wurde mittels eines HPLC-(High-Pressure-Liquid-Chromatography)-Analysators vorgenommen. Die Sensitivität des Analysators betrug ca. 0,5 nmol/Aminosäure. Der automatische Nachweis der eluierten Aminosäuren erfolgte mittels Ninhydrinreaktion und photometrischer Bestimmung des Gehaltes der jeweiligen Aminosäure im Vergleich zu Standardwerten. Die Chromatogramme zur Bestimmung der Aminosäuremenge wurden automatisch integriert.<sup>2</sup>

Die Berechnung der Kollagenkonzentration erfolgte dann nach folgender Formel:

$$\text{Kollagenkonzentration in } \mu\text{g pro mg Trockengewicht} = \frac{\text{Hydroxyprolin (nmol)} \times 7,5 \times 132 \times 10^3}{\text{Trockengewicht (mg)}}$$

Der Faktor 7,5 stellt den mittleren Umrechnungsfaktor von Hydroxyprolin zu Kollagen dar. Der Faktor 132 entspricht dem Molekulargewicht von Hydroxyprolin.

Die Berechnung des Verhältnisses von Kollagen zu nicht kollagenem Protein wird nach folgender Formel vorgenommen (Wiestner et al. 1979):

$$\text{Kollagen/Nichtkollagenes Protein (\%)} = \frac{2 \times \text{Hydroxyprolin}}{(\text{Prolin-Hydroxyprolin}) \times 5 + 2 \times \text{Hydroxyprolin}}$$

#### *Beschreibung der Methode zur qualitativen Kollagenbestimmung*

Es wurden Gefrierschnitte von 4–6 µm Dicke hergestellt und diese mit spezifischen Antikörpern gegen Prokollagen I, Kollagen I und III, Fibronectin und die Basalmembrananteile Laminin und Kollagen IV oberflächlich benetzend beschichtet. Die spezifischen Antikörper waren mit der von Timpl et al. (1977) beschriebenen Methode in Kaninchen erzeugt worden. Anschließend wurde das Gewebe 30 min lang in einer feuchten Kammer inkubiert, um es vor Austrocknung zu schützen. Überschüssiger Antikörper wurde danach in phosphatpufferter Salzlösung (PBS) abgewaschen. Sodann erfolgte eine Überschichtung des Gewebes mit einem FITC (Fluoro-Iso-Thiocyanat) markierten Antikaninchen-Globulin als Zweitantikörper. In einer feuchten Kammer erfolgte die Kopplungsreaktion des Zweitantikörpers an den spezifischen Erstantikörper innerhalb von 15 min, anschließend wurde überschüssiger Antikörper wiederum in einem Bad mit PBS für ca. 3 min ausgewaschen. Die Gewebsschnitte wurden dann in PBS-Glyzerinlösung (Verhältnis 1 : 9) eingedeckt.

Die Begutachtung der so hergestellten Präparate erfolgte in einem Leitz-Fluoreszenz-Mikroskop (Emissionswellenlänge 490 nm, Fluoreszenzwellenlänge 520 nm). Das Auftreten von Fluoreszenz in den untersuchten Wundpartien wurde semiquantitativ geschätzt nach folgenden Kriterien:

<sup>2</sup> Für die Hilfe bei der Aminosäurenanalyse haben wir Herrn Dr.med.P.Müller, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, herzlich zu danken

- 0 = keine Reaktion im Wundgebiet  
 (+) = sehr schwache, beginnende Randreaktion (entsprechend Beginn der Einsprossung von Kollagenfasern)  
 1+ = geringe, vornehmlich im Rand lokalisierte Reaktion  
 2+ = deutliche Reaktion im Wundgebiet  
 3+ = starke Reaktion im Wundgebiet.

Bei jeder Färbereihe wurden Kontrollschnitte, die entweder ohne spezifische Erstantikörper oder aber mit einer Präinkubation mit Kaninchenserum behandelt worden waren, mitgeführt. Die Befunde wurden durch Photoaufnahmen mit Hilfe eines Leitz-Photoaufsatzes auf das Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

## Ergebnisse

### *Quantitative Kollagenanalyse*

23 Gewebssausschnitte aus Hautwunden wurden mit unverletztem benachbartem Gewebe („Standardgewebe“) verglichen. Die Proben stammten von unterschiedlichen Regionen an Kopf, Rumpf und Gliedmaßen. Es zeigte sich bereits bei der quantitativen Bestimmung des Kollagengehaltes/pro Trockengewicht innerhalb des Standardgewebes eine sehr hohe Streuung der Werte. Beispielsweise wurden am Stamm sehr hohe Kollagenkonzentrationen vorgefunden, niedrige dagegen im Schädelbereich.

Auch bezüglich des prozentualen Anteils von Kollagen am Gesamtprotein der Haut waren beträchtliche Schwankungen zu verzeichnen, wobei ebenfalls relativ niedrige Anteile im Schädelbereich, hohe Anteile dagegen im Rumpfbereich gemessen wurden. Mit Ausnahme von 4 Fällen konnten wir erwartungsgemäß eine mehr oder weniger starke Abnahme des Kollagengehaltes im Wundgewebe messen, so daß der Quotient zwischen absolutem Kollagengehalt in Wunde und Standardgewebe unter 1,0 lag mit Streuungen zwischen 0,02 und 0,97. Dies entspricht den Befunden, die Hering et al. (1983) und die anderen, eingangs zitierten Autoren bei Tierversuchen fanden. Bei den vier abweichenden Fällen vermuten wir methodische Fehler; ansonsten käme wohl nur eine Keloidbildung zur Erklärung in Betracht, die aber zu diesen Zeitpunkten der Wundheilung noch nicht diskutiert werden kann.

Bezüglich des Anteils von Kollagen am Gesamtprotein im Wundgewebe im Verhältnis zum Standardgewebe konnten wir 14mal eine Erniedrigung und 9mal eine Erhöhung registrieren mit stark streuenden Absolutwerten, so daß auch hier Aussagen über regelhafte, insbesondere zeitkorrelierte Entwicklungen nicht möglich erscheinen. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

Der Quotient aus der Kollagenkonzentration im Wundgewebe und der im Standardgewebe des gleichen Patienten wurde in Abhängigkeit vom Wundalter graphisch dargestellt. Hierbei wurde auch zwischen chirurgisch vorbehandelten (genäht bzw. geklammert) Wunden und unbehandelten Wunden unterschieden (Abb. 1).

Sowohl aus der Tabelle wie aus der graphischen Darstellung ergibt sich, daß eine Korrelation zwischen Wundalter und Kollagengehalt im Wundbereich nicht gegeben ist.



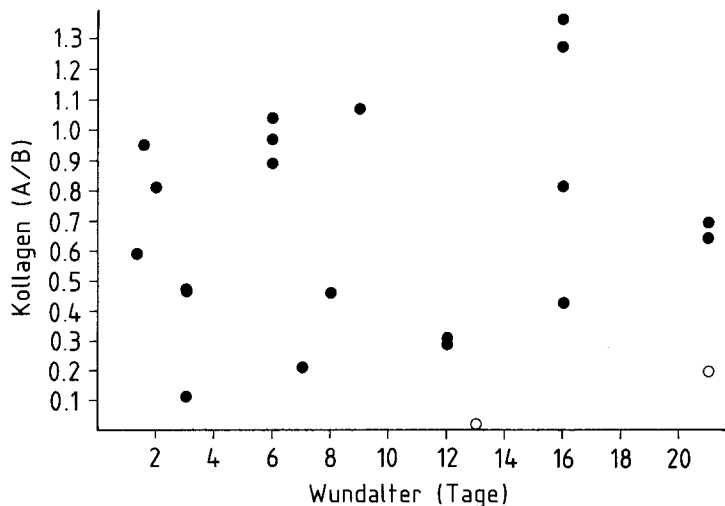
**Tabelle 2.** Absoluter und relativer Kollagengehalt von Wundgewebe und gesundem Standardgewebe und Quotient der Absolutwerte

Proben-Nr.	Wundalter in Tagen und Region	Kollagengehalt		Quotient a/b	Kollagen-Protein %-Angabe	
		Wundgew. (a)	Standardgew. (b)		a	b
		(mg Kollagen/mg Trockengew.)				
a	b					
1	32 h – Kopfschwarte	77,7	131,5	0,59	16,4	17,8
2	38 h – Kopfschwarte	87,1	91,6	0,95	22,3	24,4
3	2 d – Brustdrüse	421,4	515,09	0,81	33,3	31,6
4	3 d – Stirn	8,2	70,1	0,11	21,2	19,2
5	3 d – Scheitelhöhe	44,0	94,5	0,46	16,2	19,2
6	3 d – Hüfte	194,2	410,0	0,47	27,6	35,0
7	6 d – Unterbauch	199,2	191,9	1,04	31,2	26,1
8	6 d – Oberschenkel	112,3	125,7	0,89	28,2	28,7
9	6 d – Rücken	102,4	105,4	0,97	28,3	20,6
10	7 d – Hüfte	73,4	346,0	0,21	26,3	24,2
11	8 d – Oberarm	68,0	147,3	0,46	30,0	26,3
12	9 d – Kopfschwarte	134,9	125,8	1,07	33,3	27,0
13	12 d – Oberschenkel	123,8	395,7	0,31	21,7	22,5
14	12 d – Nabel	110,0	352,3	0,31	25,1	28,3
15	12 d – obere Brustregion	66,5	224,1	0,29	31,8	28,9
16	13 d – Knie	7,4	257,7	0,02	24,1	29,3
17	16 d – Knie	346,0	269,8	1,28	21,9	23,3
18	16 d – Unterschenkel	200,1	145,0	1,37	26,0	23,2
19	16 d – Knie	69,7	160,9	0,43	27,4	28,4
20	16 d – Bauch	127,6	154,9	0,82	32,0	32,3
21	21 d – Knie	146,0	206,2	0,70	13,9	22,4
22	21 d – Innenknöchel	47,2	232,5	0,20	11,3	21,8
23	21 d – Oberschenkel	271,6	412,4	0,65	23,2	26,9

*Qualitative Analyse der interstitiellen Kollagentypen*

Von den 71 Proben wurden 40 zur immunhistochemischen Darstellung der interstitiellen Kollagentypen bzw. deren Vorläufer verwendet. 24 Proben wurden auf das Vorkommen von Kollagen III, 6 auf das von Prokollagen I und 10 auf das von Kollagen I untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3, 4 und 5 wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß Kollagen III bei 2 Wunden mit einem Entstehungsalter von 34 und 39 Stunden gerade im Randbereich erkennbar aufzutreten begann. Regelmäßig fand sich dieser Kollagentyp nach mehr als 2 Tagen. Bei der semi-quantitativen Abschätzung des Kollagen III-Gehaltes im Wundspalt zeigten sich allerdings noch deutliche Unterschiede insofern, als z.T. spärliche, z.T. schon erhebliche Kollagenneubildung beobachtet werden konnte. Abb. 2a und



**Abb. 1.** Quantitative Kollagenkonzentration (Quotient aus Konzentration in Wund- und Standardgewebe) in Abhängigkeit vom Wundalter. *Leere Punkte:* Ohne chirurgische Naht

b zeigen das normale histologische Bild und die immunhistochemische Darstellung von Typ III-Kollagen an einer 3 Tage alten Wunde aus der Hüftregion, die chirurgisch mit Metallklammern verschlossen worden war (Probe Nr. 8). Man erkennt hierbei schon ein feinfaseriges Netzwerk aus Kollagen III im Wundgewebe.

Nach mehr als 6 Tagen fand sich in sämtlichen Proben eine deutliche Durchsetzung des Wundspaltes mit Fasern aus Kollagen III, diese waren jedoch ohne erkennbare Ausrichtung (Abb. 3).

Nach einem Wundalter von 12 Tagen und mehr war der Wundspalt komplett durchsetzt mit Kollagen III. Früher vorhandene, fluoreszenzoptisch leer erscheinene Areale waren kaum noch vorhanden. Darüber hinaus war es zu einer netzförmigen Orientierung der Kollagenfasern gekommen (Abb. 4).

Prokollagen I fanden wir frühestens ab einem Wundalter von 4 Tagen. Eine 5 Tage alte Kinnwunde zeigte dann aber schon eine sehr deutliche Reaktion (Abb. 5). In älteren Wunden (16 bzw. 21 Tage) war, vergleichbar dem Kollagen III, eine starke Durchsetzung des Wundgewebes mit feinen, vorwiegend perizellulär gelegenen Fasern von Prokollagen I vorhanden. Kollagen I fanden wir in zwei 3 Tage alten und einer 4 Tage alten Wunde nicht. Bei zwei Wunden mit einem Alter von 6 Tagen und 6 Tagen 19 h war eine geringe positive Randreaktion zu registrieren. Bei einem Wundalter von 8–12 Tagen wurde die Reaktion deutlicher und ab dem 12. Tag fanden sich durchweg stark positive Reaktionen mit Antikörpern dieses Kollagentyps im Wundgewebe. Abb. 6 zeigt das Fehlen von Fluoreszenz im Wundspalt einer 3 Tage alten Wunde, Abb. 7 die spärlichen Randreaktionen einer 6,5 Tage alten Wunde und Abb. 8 das dichte Kollagenetzwerk unter der reepithelialisierten Wunde, 12 Tage nach Wundsetzung. In dieser letzten Phase, nach 12 Tagen und mehr, zeigte sich eine charakteristische kabelartige Anordnung der Type I-Kollagenbündel parallel zur Hautoberfläche.

**Tabelle 3.** Vorkommen von Kollagen III im Wundgewebe

Proben-Nr.	Alter/ Geschlecht	Wundalter (Stunden- Tage)	Entnahmeort	Wund- ver- schluß	Kollagen III
1	46-w	32 h	Kopfschwarte	1	0
2	54-m	34 h	Schläfe	3	(+)
3	17-m	39 h	Schienbeinkante	1	(+)
4	43-w	2 d	Schläfe	1	0
5	48-w	2 d 17 h	Bauch	1	++
6	41-m	2 d 17 h	Unterschenkel	3	++
7	50-w	3 d	Kopfschwarte	1	+
8	75-w	3 d	Hüfte	2	+
9	17-m	3 d	Finger	3	++
10	29-m	3 d 18 h	Bauch	1	+
11	80-w	3,5 d	Unterschenkel	1	+
12	82-w	4 d	Hüfte	1	+
13	7-m	4 d	Ellenbogen	3	+
14	31-m	4 d	Kopfschwarte	1	(+)
15	60-m	4 d	Schläfe	3	(+)
16	77-m	4 d 11 h	Stirn	1	+
17	43-m	6 d	Unterbauch	1	++
18	18-m	6 d 19 h	Kinn	3	++
19	18-m	6 d 19 h	Lendenregion	3	++
20	43-w	8 d	Oberarm	1	++
21	19-m	12 d	Nabel	1	+++
22	19-m	12 d	obere Brustregion	1	+++
23	74-w	13 d	Knie	3	+++
24	77-w	21 d	Knie	1	+++

1 = chir. Naht; 2 = Klammer; 3 = keine Naht; 0 = keine Reaktion im Wundgebiet; (+) = sehr schwache, beginnende Randreaktion; + = geringe, noch vornehmlich im Wundrand lokalisierte Reaktion; ++ = deutliche Reaktion im Wundgebiet; +++ = starke Reaktion im Wundgebiet

### *Qualitative Darstellung der Basalmembran*

An 31 Wundgewebsproben wurden Kollagen IV und Laminin als Basalmembran – spezifische Komponenten immunhistochemisch zur Darstellung gebracht. Wir haben hierbei überprüft, in welchen Zeitabschnitten unter der regenerierenden Epithelschicht die Basalmembran bruchstückweise auftauchte, sich zunehmend komplettierte und schließlich vollständig wiederhergestellt war. Die Ergebnisse gibt Tabelle 6 wieder. Entsprechend der fehlenden Epithelialisierung der Wunde konnte bis zu einem Wundalter von 5 Tagen auch keine Basalmembran im Wundgebiet nachgewiesen werden (Abb. 9). In direkter Korrelation zur Epithelproliferation und zunehmenden Epithelialisierung fanden sich ab dem 6. Tag Basalmembranbruchstücke (Abb. 10). Erstmals war eine komplette epitheliale Basalmembran bei einer Wunde in der Knöchelre-

**Tabelle 4.** Vorkommen von Prokollagen I im Wundgewebe

Proben-Nr.	Alter/ Geschlecht	Wundalter (Stunden- Tage)	Entnahmeort	Wund- ver- schluß	Pro- kollagen I
1	45 - m	38 h	Kopfschwarte	3	0
2	21 - w	2 d	Mamma	1	0
3	59 - m	4 d	Zeigefinger	1	+
4	20 - m	5 d	Kinn	1	+
5	52 - m	16 d	Bauch	3	+++
6	77 - w	21 d	Oberschenkel	1	+++

1 = chir. Naht; 2 = Klammer; 3 = keine Naht

**Tabelle 5.** Vorkommen von Kollagen I im Wundgewebe

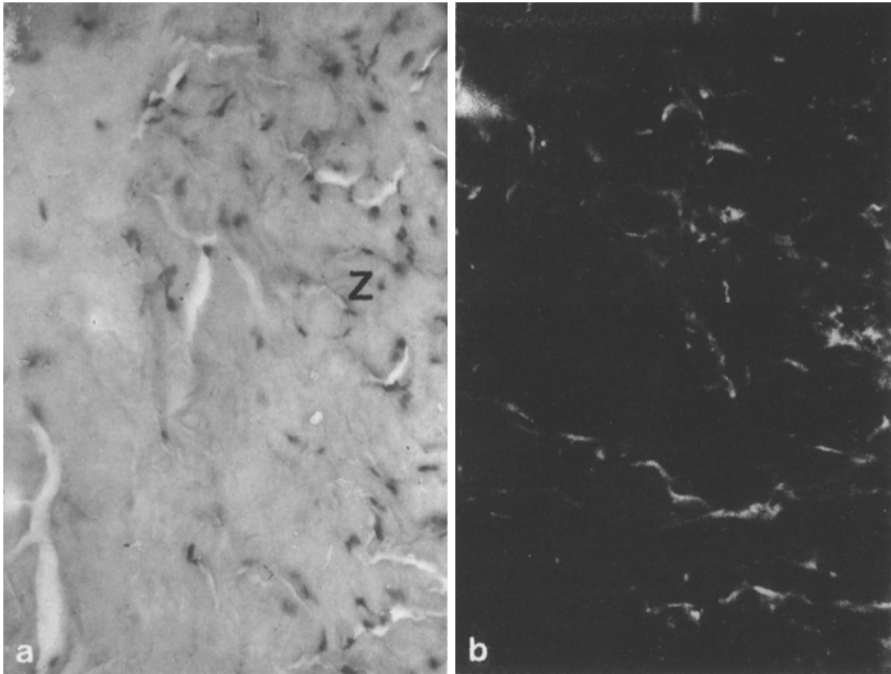
Proben-Nr.	Alter/ Geschlecht	Wundalter (Stunden- Tage)	Entnahmeort	Wund- ver- schluß	Kollagen I
1	17 - m	3 d	Zeigefinger	3	0
2	75 - w	3 d	Hüfte	2	0
3	18 - w	4 d	Brustwand	3	0
4	43 - w	6 d	Unterbauch	1	(+)
5	18 - m	6 d 19 h	Kinn	3	(+)
6	43 - w	8 d	Oberarm	1	+
7	63 - m	9 d	Kopfschwarte	1	+
8	19 - m	12 d	Nabel	1	+++
9	19 - m	12 d	obere Brustregion	1	+++
10	77 - w	21 d	Knie	1	+++

0 = keine Reaktion im Wundgebiet; (+) = sehr schwache, beginnende Randreaktion; + = geringe, noch vornehmlich im Wundrand lokalisierte Reaktion; ++ = deutliche Reaktion im Wundgebiet; +++ = starke Reaktion im Wundgebiet

gion (Probe Nr. 19) nach 9 Tagen aufzufinden. Allerdings muß hervorgehoben werden, daß bei gleichalten Wunden es auch vorkam, daß die Strukturen einer sich bildenden Basalmembran noch völlig fehlten. Solche starken Schwankungen mit teils kompletten, teils inkompletten, teils auch völlig fehlenden Basalmembranen betrafen vor allem das Wundalter zwischen 9. und 14. Tag. Ab dem 14. Tag fanden wir in allen Proben eine vollständige Basalmembran (Abb. 11). Diese Ergebnisse waren wiederum unabhängig vom Alter des Patienten, seinem Geschlecht und dem Entnahmeort und der Art der Wundversorgung.

## Diskussion

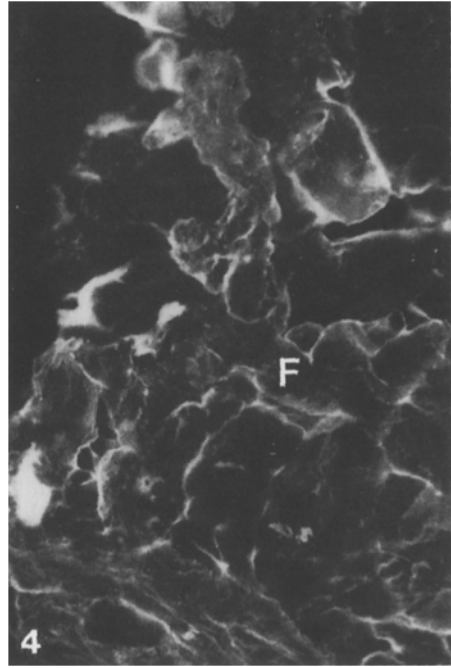
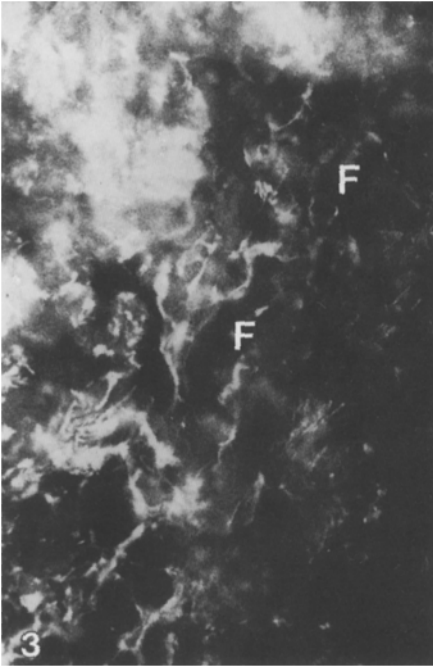
Im Hinblick auf die Ergebnisse, die Dunphy et al. (1955); Grillo et al. (1958) und Hering et al. (1983), an Tierversuchen gewonnen hatten, hatten wir große



**Abb. 2.** **a** 3 Tage alte Hüftwunde. Vom Wundrand einsprossende mesenchymale Zellen (Z). He; Vergrößerung 292  $\times$ . **b** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen III an der gleichen Wunde. Feinfaseriges Netzwerk aus Kollagen III mit großen Zwischenräumen. Vergrößerung 292  $\times$

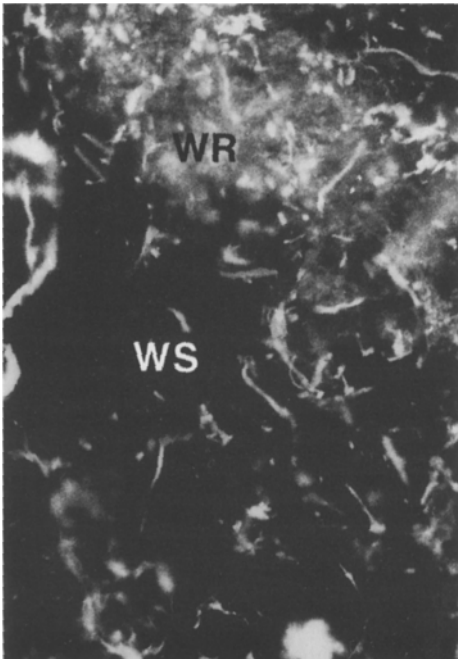
Hoffnung auf die quantitative Kollagenanalyse im Wundgewebe gesetzt. Die genannten Autoren hatten nämlich übereinstimmend über einen linearen Anstieg der Kollagenkonzentration im Narbengewebe bei Ratten und Meerschweinchen in Abhängigkeit vom Wundalter berichtet. Zunächst fanden sie erniedrigte Kollagenkonzentrationen, die im fortschreitenden Heilungsverlauf zunahmten, jedoch in keinem Fall die Werte normaler Haut erreichten. Auch Zeitz et al. (1978) hatten durch Messungen der Hydroxyprolinkonzentration eine kontinuierliche Zunahme des Kollagengehaltes gefunden.

Um so enttäuschender sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen an Wunden in menschlicher Haut. Zwar fanden auch wir im Wundgewebe in den meisten Fällen eine niedrigere Kollagenkonzentration im Vergleich zum unverletzten Standardgewebe, aber gesetzmäßig ablaufende, zeitkorrelierte Veränderungen konnten wir nicht bestätigen. Dabei war uns bewußt, daß beim Menschen in Abhängigkeit von Lebensalter, Geschlecht und Körperregion der Kollagengehalt erheblichen Schwankungen unterliegt. So hatte Niemetz (1984) in Hautproben gesunder und an Sklerodermie erkrankter Patienten bereits starke Konzentrationsunterschiede gefunden und wir konnten dies, wie die Werte in Tabelle 2 ausweisen, ebenfalls bestätigen. So fanden wir an der Kopfhaut niedrigere Kollagenkonzentrationen als in Haut vom Stamm und den Extremitäten. Durch Quotientenbildung zwischen Narbengewebe und benachbartem Standard-

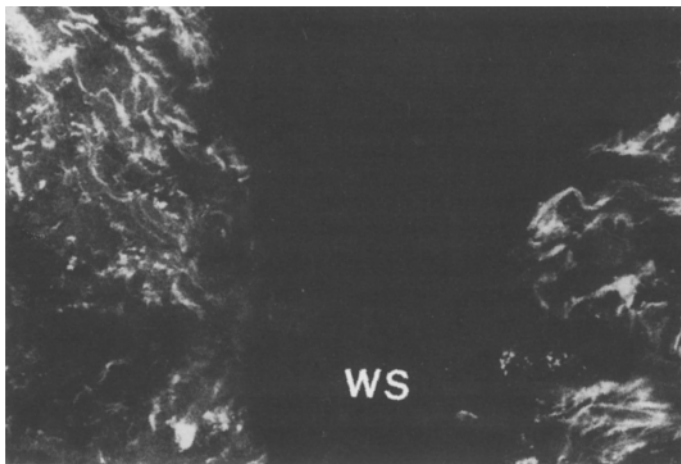


**Abb. 3.** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen III; 6 Tage alte Bauchwunde. Deutliche Zunahme der Faserdichte (*F*), noch ohne spezifische Ausrichtung. Vergrößerung 292 ×

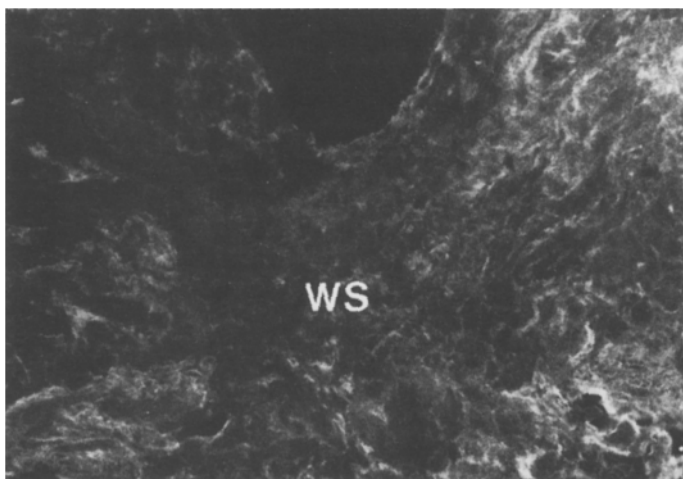
**Abb. 4.** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen III; 13 Tage alte Kniewunde. Fasern noch stärker verdichtet und nun vernetzt. Vergrößerung 292 ×



**Abb. 5.** Immunhistochemische Darstellung von Prokollagen I; 5 Tage alte Kinnwunde. Erhebliche, bandförmige Ansammlungen im Wundrand (*WR*), einzelne Fasern im granulierenden Wundspalt (*WS*). Vergrößerung 182,5 ×

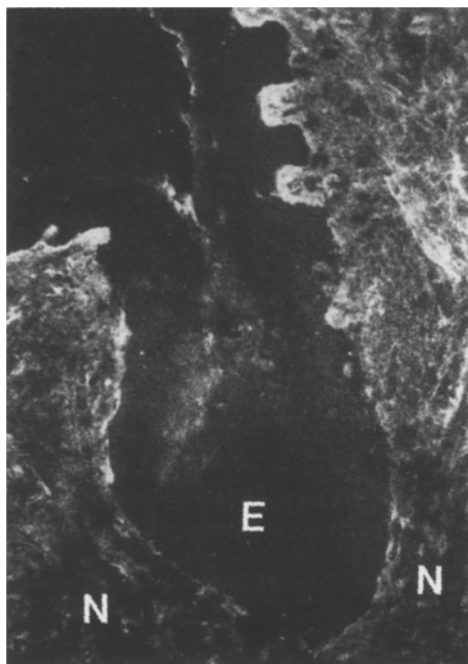


**Abb. 6.** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen I; 3 Tage alte Hüftwunde. Keine Fluoreszenz im Wundspalt (WS), Vergrößerung 73 ×

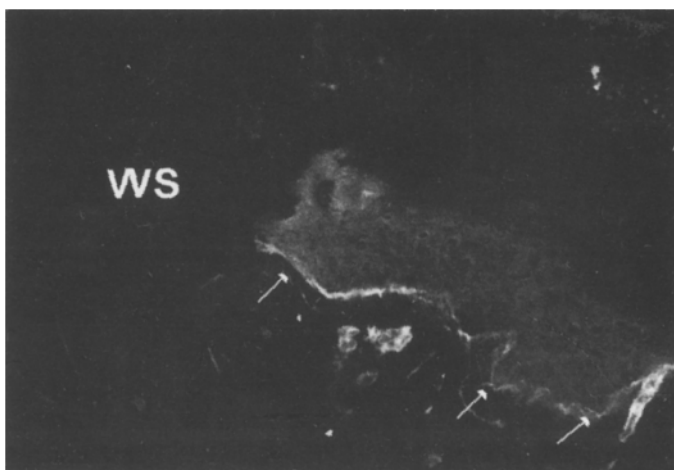


**Abb. 7.** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen I; 6,5 Tage alte Kinnwunde. Einsetzende Fluoreszenz als feines Fasernetz im Wundspalt (WS). Vergrößerung 73 ×

gewebe hatten wir allerdings gehofft, diese physiologischen Schwankungen nivellieren zu können. Eine Erklärung dafür, daß von verschiedenen Autorengruppen bei verschiedenen Versuchstieren ein linearer zeitabhängiger Anstieg des Kollagengehaltes gefunden wurde und wir dies an unseren Proben vom Menschen nicht bestätigen konnten, haben wir nicht. Methodische Fehler konnten wir, trotz eingehender Prüfung des Untersuchungsganges, nicht feststellen. Unsere Hoffnungen, für die forensische Praxis eine einfache, zahlenmäßig erfaßbare Bestimmungsmethode des Wundalters mit der quantitativen Kollagenanalyse in die Hand zu bekommen, haben sich damit nicht erfüllt.



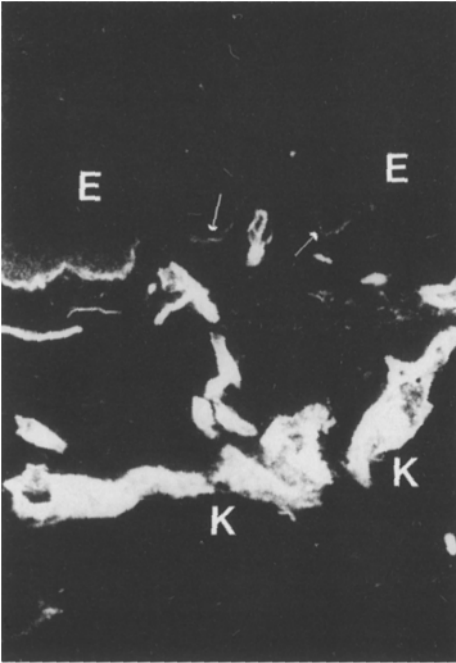
**Abb. 8.** Immunhistochemische Darstellung von Kollagen I; 12 Tage alte Wunde am Jugulum. Wunde vollständig reepithelialisiert (E). Kabelartige Faserzüge parallel zur Hautoberfläche. Vergrößerung 73 ×



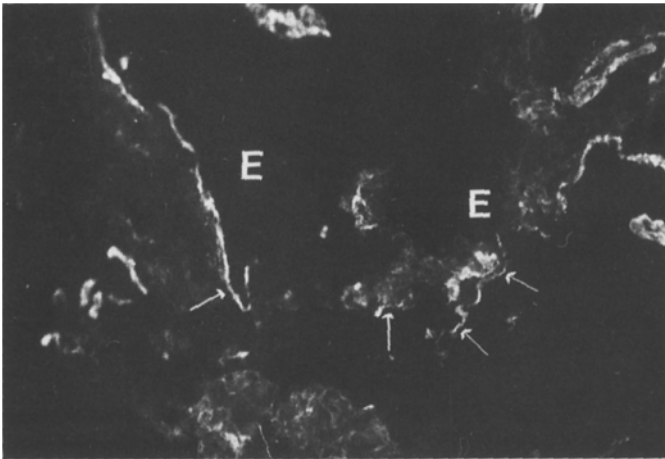
**Abb. 9.** Immunhistochemische Darstellung der Basalmembran mittels Laminin; 2 Tage alte Brustwunde. Abbruch der Basalmembran (Pfeile) in der Nähe des Wundspaltes (WS). Vergrößerung 292 ×

Die Untersuchungen zum qualitativen Nachweis interstitiellen Kollagens und Prokollagens bestätigen am nicht ausgewählten Obduktionsgut eines rechtsmedizinischen Institutes Ergebnisse, die teils experimentell in Tierversuchen, teils auch in Wunden eines ausgesuchten Patientenkollektivs erhoben





**Abb. 10.** Immunhistochemische Darstellung der Basalmembran mittels Kollagen IV; 6 Tage alte Bauchwunde. Unter dem proliferierenden Epithel (*E*) Basalmembranbruchstücke (*Pfeile*). *K*: Sprossende Kapillaren. Vergrößerung 182,5 ×



**Abb. 11.** Immunhistochemische Darstellung der Basalmembran mittels Laminin; 16 Tage alte Bauchwunde. Basalmembran komplettiert (*Pfeile*). Vergrößerung 182,5 ×

worden waren. In den bereits zitierten Arbeiten war festgestellt worden, daß nach dem Auftreten von Fibronectin zunächst Kollagen III, später Kollagen I synthetisiert wird, wobei Prokollagen und Kollagen III schon zwischen dem 1. und 2. Tag nach Wundsetzung u. U. nachweisbar waren. Prokollagen I und Kollagen I waren bei Kindern ab dem 3. Tag in Implantaten im Wundspalt aufgefunden worden.

**Tabelle 6.** Vorkommen der epithelialen Basalmembran (BM) im Wundgewebe

Proben-Nr.	Alter/ Geschlecht	Wundalter (Tage- Stunden)	Entnahmeort	Wund- ver- schluß	Nachweis der BM
1	21-w	2 d	Mamma	1	0
2	50-w	3 d	Stirn	1	0
3	75-w	3 d	Hüfte	2	0
4	77-w	5 d	Innenknöchel	1	inkompl.
5	28-w	6 d	Bauch	2	inkompl.
6	43-w	6 d	Oberschenkel	1	0
7	43-w	6 d	Unterbauch	1	inkompl.
8	18-m	6 d 19 h	Kinn	3	inkompl.
9	46-w	6,5 d	Hüfte	1	inkompl.
10	81-w	6,5 d	Oberarm	3	0
11	84-m	7 d	Hüfte	1	inkompl.
12	25-m	7 d	Schädel	3	inkompl.
13	36-m	8 d	Innenknöchel	1	inkompl.
14	11-w	8 d	Schädel	1	0
15	67-w	8 d	Stirn	1	inkompl.
16	67-w	8 d	Schläfe	1	inkompl.
17	19-m	9 d	Oberschenkel	3	inkompl.
18	74-w	9 d	Knöchel	1	kompl.
19	84-w	9 d	Oberschenkel	1	0
20	11-w	10 d	Schädel	1	0
21	76-w	12 d	Oberschenkel	3	kompl.
22	19-m	12 d	Nabel	1	inkompl.
23	72-m	13 d	Unterschenkel	1	inkompl.
24	74-w	13 d	Knie	3	inkompl.
25	64-w	14 d	Kopfschwarte	1	kompl.
26	82-w	14 d	Fuß	1	kompl.
27	52-m	16 d	Bauch	3	kompl.
28	52-m	16 d	Bauch	3	kompl.
29	52-m	16 d	Bauch	3	kompl.
30	77-w	21 d	Oberschenkel	1	kompl.
31	93-m	36 d	Oberschenkel	1	kompl.

1 = chir. Naht; 2 = Klammer; 3 = keine Naht; 0 = keine epitheliale BM vorhanden; inkompl. = nur fragmentierte und nicht durchgehend vorhandene epitheliale BM; kompl. = vollständige epitheliale BM

Von den 71 zu qualitativen Untersuchungen entnommenen Hautproben waren 53 Gewebstücke zur Darstellung der interstitiellen Kollagentypen verwandt worden und 40 Präparate verwertbar. Daß ein Teil der Proben mangelhaft war, lag zum einen daran, daß bei Wundgewebe früher Wundaltersstufen es bei der Herstellung von Gefrierschnitten zu Gewebseinrissen kam, da der Wundspalt einen locus minoris resistentiae darstellte. Ein zerrissenes Gewebe an dieser Stelle erschwerte aber die Begutachtung so, daß wir diese Schnitte

aussonderten. Zum anderen konnte in einigen Fällen aufgrund autolytischer Prozesse keine sichere Beurteilung der Epidermis und des Wundspaltes getroffen werden. Bei den verwertbaren Proben fanden wir frühestens bei einem Wundalter von 2 Tagen eine beginnende Einsprossung kollagener Matrix, die zunächst ausschließlich aus Typ III Kollagen bestand. Antikörperseren gegen Prokollagen III standen uns nicht zur Verfügung. Nachdem Kollagen III bereits zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen werden kann, muß davon ausgegangen werden, daß die Vorstufe, nämlich Prokollagen III, zeitlich schon etwas früher auftritt. Somit können wir die Ergebnisse von Gay et al. (1978) aus den experimentellen Untersuchungen an Zellulose-Implantaten in kindlichen Operationswunden voll bestätigen. Da unsere Untersuchungsproben von Patienten unterschiedlichen Lebensalters und von Hautwunden unterschiedlicher Entstehungsart sowie nach unterschiedlicher Wundbehandlung stammten, sind die Ergebnisse von Gay et al. (1978) folglich uneingeschränkt übertragbar auf alle Hautwunden des Menschen und damit forensisch verwertbar. Will man allerdings auf das Grenzwertdenken im juristischen Bereich abheben, so reicht weder die Fallzahl der Arbeitsgruppe um Gay noch unsere eigene Fallzahl aus, um hier exakte zeitliche Grenzen des Auftretens anzugeben. Wir möchten nicht ausschließen, daß bei Kindern bzw. Jugendlichen aufgrund einer höheren Stoffwechsellpotenz des Bindegewebes die Neuproduktion von Prokollagen und Kollagen III um Stunden früher einsetzen kann als bei Erwachsenen und alten Personen.

Das Auftreten von Prokollagen I erfolgt ca. 2 Tage nach dem von Kollagen III. Auch insofern besteht eine Übereinstimmung unserer Untersuchungen mit den Beobachtungen von Gay et al. (1978). Eine scharfe Trennungslinie des Auftretens von Kollagen III und Prokollagen I halten wir allerdings aufgrund unserer geringen Fallzahl noch nicht für möglich. Es fehlen in unserem Untersuchungsgut Wunden in regelmäßig zunehmenden Zeitabständen und gerade zwischen 2. und 4. Tag und 5. und 16. Tag fehlen Probenkollektive. Tendenziell sind jedoch Aussagen, wie oben angeführt, möglich.

Kollagen I fanden wir in keiner Wunde mit einem Alter von weniger als 6 Tagen. Insofern weichen unsere Ergebnisse von den Untersuchungen von Gay et al. (1978) ab, die bereits nach 72 h einen ansteigenden Gehalt an Kollagen I festgestellt hatten. Den weiteren Verlauf mit einem kontinuierlichen Anstieg des Kollagen I-Gehaltes bei semiquantitativer Abschätzung am histologischen Schnitt konnten auch wir bestätigen. Wir haben durch die Untersuchung auch älteren Wundgewebes darüber hinaus Kriterien gefunden, die für die Einschätzung des Wundalters herangezogen werden können, nämlich die zunehmende Dichte des Fasernetzes und ihre kabelartige Ausrichtung parallel zum Verlauf der Wundränder. Dies ist sicher Folge der intermolekularen Quervernetzung des Wundkollagens als Grundlage der klinisch bekannten Zunahme der Reißfestigkeit einer Wunde. Auch bezüglich des Auftretens von Kollagen I haben wir keine Abhängigkeit vom Entnahmeort, Lebensalter, Geschlecht und Entstehung bzw. Behandlung der Wunde feststellen können.

Zu unseren Untersuchungen bezüglich der Neubildung einer epithelialen Basalmembran existierten bisher keine vergleichbaren Untersuchungen an menschlichen Hautwunden. Clark et al. (1982) hatten tierexperimentell gefun-

den, daß die die Wundoberfläche überwandernden Epithelzellen auf einer provisorischen Matrix aus Fibronectin und Fibrin aufliegen und daß es erst nach Beendigung der Reepithelialisierung zur Ausbildung einer regelrechten Basalmembran kommt. Diese Neubildung sahen sie um den 7.–9. Tag nach der Wundentstehung.

Wir haben an 31 Gewebeproben mit spezifischen Antikörpern gegen das Basalmembranprotein Laminin und den ausschließlich in Basalmembranen vorkommenden Kollagentyp IV die Rekonstruktion der Basalmembran beim Menschen überprüft. Es zeigte sich hierbei, daß beide Substanzen gleichzeitig auftraten und sich gleich gut darstellen ließen, so daß man beim Nachweis der Rekonstruktion der Basalmembran wahlweise Laminin oder Kollagen IV darstellen kann. Eine bruchstückhafte, inkomplette Ablagerung von diesen Basalmembrankomponenten fand sich im Wundareal frühestens 5 Tage nach Wundentstehung. Eine Komplettierung fanden wir erstmals nach 9 Tagen und nach mehr als 14 Tagen war die Basalmembran stets vollständig vorhanden. Problematisch erscheint, daß im Zeitraum zwischen 9.–14. Tag sowohl Wunden angetroffen wurden ohne Neubildung einer Basalmembran, wie auch solche mit inkompletten Regeneraten und vollständigen Basalmembranen. Dadurch relativiert sich die Aussage, daß ab dem 14. Tag immer mit einer kompletten Basalmembran gerechnet werden könne, denn es ist schwer vorstellbar, daß eine Wunde, die am 9. bzw. 10. Tag noch keinerlei Regenerat erkennen läßt, am 14. Tag bereits eine komplette Basalmembran aufweist. Die beiden Wunden, die am 9. und 10. Tag noch keine Regenerate aufwiesen, waren großflächig. Man wird also der an und für sich logischen Überlegung, daß die Neubildung einer kompletten Basalmembran abhängig sein muß von der zu deckenden Wundfläche, auch praktische forensische Bedeutung einräumen müssen. Daraus ergibt sich, daß wohl auch die Art der Wundversorgung, die die Größe der Wundfläche beeinflusst, Auswirkungen auf die zeitliche Abfolge der Basalmembranbildung haben muß, auch wenn wir dies bei unseren Fällen aufgrund der geringen Fallzahl nicht positiv belegen konnten. Keinerlei Abhängigkeit konnten wir bezüglich Lebensalter, Geschlecht und Entnahmeort registrieren.

Unsere Untersuchungen sind sicher noch nicht geeignet, verlässliche Werte für die forensische Praxis zu liefern. Wir verstehen unsere Ergebnisse als Teil einer Grundlagenforschung, die ein besseres Verständnis des täglich beobachteten Ablaufes der Wundheilung in der proliferativen und reparativen Phase ermöglicht. Es scheint nach unseren Versuchen bereits vertretbar, die von anderen Autoren in Tierversuchen und an einem speziellen menschlichen Patientenkollektiv gewonnenen Ergebnisse für Personen jedweden Lebensalters, beiderlei Geschlechtes und für verschiedene Arten der Wundentstehung und Wundlokalisierung zu generalisieren. Das entscheidende rechtsmedizinische Anliegen besteht darin, Grenzwerte für die forensische Praxis zu erarbeiten. Hierzu ist die Zahl unserer Untersuchungen wie auch das Vorkommen größerer Kollektive gleichen Wundalters noch zu klein. Eine Untersuchungsmethode wird auch nur dann Anspruch erheben können, in der täglichen Praxis angewandt zu werden, wenn die erforderlichen Ingredienzien billig und unbegrenzt zur Verfügung stehen. Wir hatten spezifische Antikörper gegen die unterschiedlichen Kollagene und ihre Vorstufen nur unter dankenswerter Mithilfe vom Max-Planck-Institut

für Biochemie Martinsried, zur Verfügung. Solange solche Seren allerdings nicht für jederman käuflich zugänglich sind, sind der Anwendung in der Insti-  
tutsroutine enge Grenzen gesetzt.

Seit Durchführung unserer Versuche hat sich auch ein Wandel in der Präfe-  
renz der immunhistochemischen Methoden ergeben. Die von uns angewandte  
Immunfluoreszenzmethode liefert zwar für den Augenblick subjektiv gut beur-  
teilbare Ergebnisse. Das Ausbleichen der Schnitte und der damit im Zusam-  
menhang stehende Verlust der Fluoreszenz macht aber eine sofortige photogra-  
phische Dokumentation erforderlich. Kommt es hierbei zu Fehlern bzw. Stö-  
rungen der photographischen Dokumentation, sind die Befunde nicht mehr re-  
produzierbar. Die in der Pathologie deswegen bevorzugten Methoden von PAP  
und ABC werden folglich auch bei einer zukünftigen forensischen Nutzung die  
Methoden der Wahl darstellen.

## Literatur

- Allgöwer M (1956) The cellular basis of wound repair. Thomas, Springfield/Ill.  
Arey LB (1936) Wound healing. *Physiol Rev* 16:327  
Bailey AJ (1975) Collagen polymorphism in experimental granulation tissue. *Biochem Bio-  
phys Res Commun* 66:1160  
Barnes MJ, Morton LF, Bennett RC, Bailey AJ, Sims TJ (1976) Presence of type III-Collagen  
in guinea-pig dermal scar. *Biochem J* 157:263  
Berg S (1972) Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. *Z Rechtsmed* 70:121  
Berg S, Ditt J, Friedrich R, Bonte W (1968) Möglichkeiten der biochemischen Wundaltersbe-  
stimmung. *Dtsch Z Ges. Gerichtl Med* 63:183  
Clark RAF, Lanigan JM, Dellepella P (1982a) Fibronectin and fibrin provide a provisional  
matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*  
79:264  
Clark RAF, Dellepella P, Manseau E (1982b) Blood vessel fibronectin increases in conjunc-  
tion with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J  
Invest Dermatol* 79:269  
Clore JN, Cohen JK, Diegelmann RF (1979) Quantitation of collagen-types I and III during  
wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med* 161:337  
Dunphy JE, Udupa KN (1955) Chemical and histochemical sequence in the normal healing of  
wounds. *N Engl J Med* 253:224  
Dunphy JE (1964) Wound healing. Butterworth, London  
Furthmayr H, Timpl R (1976) Immunocytochemistry of Collagens and Procollagens. *Int Rev Con-  
nect Tissue Res* 7:61  
Gay St, Viljanto J, Raekallio J, Penttinen R (1978) Collagen types in early phases of wound  
healing in children. *Acta Chir Scand* 144:205  
Grillo HC, Watts GT, Gross J (1958) Studies in wound healing: I. Contraction and the wound  
contents. *Ann Surg* 158:145  
Hegemann G, Nickell J, Tischler F (1950) Beobachtungen über den Wechsel der Doppel-  
brechfähigkeit und der Trypsinresistenz kollagener Fasern beim Altern von Narbenge-  
webe. *Klin Wochenschr* 28:362  
Hein R, Nerlich A, Müller P, Krieg T (1985) Angeborene Erkrankungen des Kollagens. *Inter-  
nist* 26:420  
Hering TM, Marchand RE, Anderson JM (1983) Type V Collagen during granulation tissue  
development. *Exp Mol Pathol* 39:219  
Hernandez-Richter HJ, Struck H (1970) Die Wundheilung. Thieme, Stuttgart  
Kurkinen M, Vaheri A, Roberts PJ, Stenman S (1980) Sequential appearance of fibronectin  
and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 43:47

- Lindner J (1962) Die Morphologie der Wundheilung. Langenbecks Arch Chir 301:39
- Marchand F (1901) Der Prozeß der Wundheilung mit Einschluß der Transplantation. Enke, Stuttgart
- Niemetz HC (1984) Hautdicke, Trockengewicht und Hydroxyprolin-Gehalt von Hautproben beim Gesunden und beim Sklerodermie-Patienten. Inaugural Diss, LMU München
- Oehlert W, Büchner T (1961) Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen Regeneration am mehrschichtigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-Darmtraktes der weißen Maus. Beitr Pathol Anat 125:373
- Oehlert W (1966) Die Zellneubildung im Epithel und im Granulationsgewebe bei der Wundheilung. Wundheilung und Wundnaht. Urban und Schwarzenberg, München
- Pioch W (1966) Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Raekallio J (1965) Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Raekallio J (1970) Enzyme histochemistry of wound healing. Fischer, Stuttgart
- Remberger U, Hübner G (1979) Experimentelle Untersuchungen über Zell- und Gewebsreaktionen nach Implantation von xenogenem Kollagenschaum. Res Exp Med (Berl) 175:67
- Ross R, Benditt EP (1961) Wound healing and collagen formation. J Biophys Biochem Cytol 11:677
- Timpl R, Wick G, Gay St (1977) Antibodies to distinct types of collagens and procollagens, their application in immunohistology. J Immunol Methods 18:165
- Walcher K (1930) Über vitale Reaktionen. Dtsch Z Ges Gerichtl Med 15:16
- Wiestner M, Krieg T, Hörlein D et al. (1979) Inhibiting effect of procollagen peptides on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. J Biol Chem 254:7016
- Zeitz M, Ruiz-Torres A, Merker HJ (1978) Collagen Metabolism in granulating wounds of rat skin. Arch Dermatol Res 263:207

Eingegangen am 7. September 1987