

Aus der II. Chirurgischen Universitätsklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. W. SCHINK)

Über Heilung und Beeinflussung experimentell gesetzter Wunden durch lösliches Kollagen

Von

J. HERNÁNDEZ-RICHTER, H. STRUCK und H. SIXT *

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. September 1964)

Die Wundheilung zu fördern und zu verbessern ist das Ziel sehr zahlreicher Untersuchungen gewesen (Lit. bei L. C. MILLS et al.). Auch über die Beeinflussung der Wundheilung durch isoliertes Kollagen oder kollagenhaltige Extrakte liegen Befunde vor. Einige Untersucher sahen hierbei günstige Effekte; andere berichten dagegen über negative Ergebnisse.

PAPPAS u. Mitarb. konnten mit einem auf menschliches Epithel aufgezogenen Kollagenfilm auf Wunden von Mäusen eine Beschleunigung der Wundheilung verfolgen. PRUDDEN et al. erhielten durch örtliche Verpfanzung von säure-pepsin-angedauten Rindertrachealknorpel eine verbesserte Wundheilung am 5. Tage p. o. TEIR et al. erzielten mittels intraperitonealer Injektionen von Hauthomogenaten neugeborener Ratten einen günstigen Effekt auf die Wundheilung bei Ratten. PEACOCK sah ebenfalls bei Ratten mit säurelöslichem Kollagen aus Rattensehnen eine verbesserte Wundheilung, nicht dagegen mit neutralsalzlöslichem Kollagen aus Kalbs Haut. Ebenso konnte INOUE mit artfremdem Kollagen keine positive Beeinflussung der Wundheilung bei Ratten beobachten; einen derartigen Effekt hält er nur unter Verwendung eines „hochspezifischen Materials“ möglich.

Betrachtet man die vorliegenden Mitteilungen nach Kollagenbehandlung, so fällt auf, daß die Untersuchungen mit negativen Befunden fast ausschließlich mit artfremdem Kollagen durchgeführt wurden.

HAMPERL und LUHR berichteten kürzlich über die Zellreaktion und das Verhalten arteigener Kollagenfasern nach Implantation an der Ratte und fanden nur kurzfristige entzündliche Reaktionen. Das implantierte Kollagen blieb dabei über die Beobachtungszeit reizlos im Wirtsgewebe liegen.

In der vorliegenden Arbeit sollen schon früher mitgeteilte Ergebnisse (HERNÁNDEZ-RICHTER und STRUCK) durch feingewebliche Befunde weiter gestützt werden. Außerdem interessierte der Zusammenhang zwischen histologischem Bild und Hydroxyprolinausscheidung im Harn.

Versuchsanordnung und Methodik

Insgesamt 184 männliche Sprague-Dawley-Albinoratten von etwa 300 g Gewicht wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt:

I. Versuche zur Bestimmung des Reißwertes

a) 50 Tiere wurden in Äther-Inhalationsnarkose mit je einem 4,5 cm langen Standardmittelschnitt laparotomiert und in gleichen Abständen die Wunden mit fünf Supramid-einzelknopfnähten durchgreifend wieder verschlossen. In die Wunde verabfolgten wir vorher zwischen Haut-Subcutis und Muskulatur je 0,6 ml einer neutralsalzlöslichen Kollagenlösung

* Chirurgische Univ.-Klinik München (Direktor: Prof. Dr. R. ZENKER).

(1,7%iges Kollagen in 0,85 mNaCl-Lösung). Am 3. p. op. Tag erfolgte eine weitere Depotinjektion von 0,2 ml säurelöslicher Kollagenlösung (2,8%iges Kollagen in 0,85 m NaCl-Lösung) subcutan und intramuskulär ins Wundgebiet und am 5. Tag p. op. als letzte Depotinjektion je 0,5 ml des säurelöslichen Kollagens.

b) 50 gleichartige Tiere wurden laparotomiert, primär vernäht und als Kontrollgruppe verwandt.

Zur Prüfung der Reißfestigkeit nach dem Prinzip von HOWES und HARVEY wurden die Ratten der Gruppe I wieder in Äther-Inhalationsnarkose gebracht und die Bestimmung des genauen Zerreißpunktes und der größten Wundfestigkeit in vivo durchgeführt.

II. Histologische Untersuchungen

- a) 15 Ratten wurden wie Ia behandelt.
- b) 15 Ratten wurden wie Ib behandelt.
- c) 8 weiteren Ratten wurde je 0,1 ml löslichen Kollagens subcutan unter die Bauchhaut injiziert.

Nach 16, 48 Std, 4 und 6 Tagen wurden die Injektionsgebiete entnommen und histologisch untersucht.

d) Zwei frischgetöteten Ratten wurde je 0,1 ml des verwendeten neutralsalzlöslichen Kollagens in ein umgestülptes Dünndarmstück eingebracht, so daß die Darmserosa nach innen lag.

III. Bestimmung des Harn-Hydroxyprolinspiegels

a) 20 Ratten erhielten die Standard-Wunden und erfuhren die gleiche Kollagenbehandlung wie Ia.

b) Bei 8 Tieren erfolgte ebenfalls Wundsetzung, jedoch ohne Kollagenbehandlung (entsprechend Ib).

c) 16 Ratten erhielten ein Kollagendepot durch Injektion unter die Haut und in die Bauchdecken ohne Wundsetzung (entsprechend II c). Die Tiere der Gruppe III wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn in Stoffwechselkäfige gesetzt und täglich der Hydroxyprolinspiegel des 24 Std-Harns nach PROCKOP und UDENFRIEND bestimmt. Die Hydroxyprolinausscheidung wurde bis zum 7. Tag nach Versuchsbeginn der Tiere verfolgt.

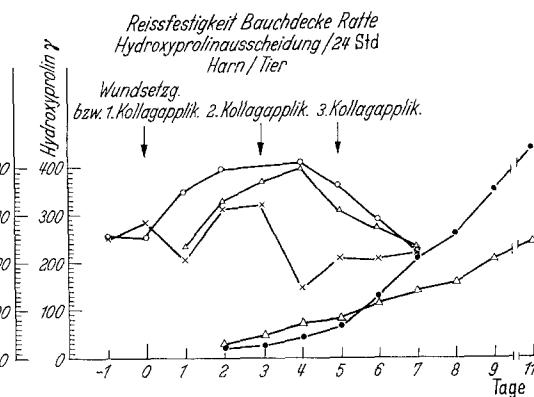


Abb. 1. Beziehung zwischen Kollagenverabreichung, Hydroxyprolinspiegel im Harn und Reißfestigkeit nach experimenteller Wundsetzung. x—x Nur Kollagenapplikation; o—o nur Wundsetzung; Δ—Δ Wundsetzung und Kollagenapplikation. Reißwerte: ●—● Nach Verabreichung von Kollagen; ▲—▲ Standardwerte

IV. Herstellung von neutralsalz- und säurelöslichem Kollagen

Die Gewinnung des neutralsalzlöslichen Kollagens erfolgte durch Extraktion mit 0,45 m NaCl-Lösung aus der Rattenhaut von 3 Wochen alten Sprague-Dawley-Albinoratten, das säurelösliche Kollagen erhielten wir durch anschließende Extraktion mit 0,25 m Citratpuffer (pH 3,7).

Ergebnisse

In Abb. 1 erkennt man eine deutliche Anhebung der Reißwerte bei den Ratten der Gruppe Ia gegenüber den Tieren der Gruppe Ib ab dem sechsten postoperativen Tag, die um den 10.—11. Tag fast die doppelte Höhe erreichen.

Die Kurven der Hydroxyprolinausscheidung zeigen sowohl bei Wundsetzung (○) als auch bei Wundsetzung und Kollagenapplikation (Δ) zunächst einen Anstieg,

um bis zum siebten postoperativen Tag wieder zum Ausgangswert zurückzugehen. Bei alleiniger Kollagenverabreichung ohne Wundsetzung (+) sieht man, daß nach den beiden Kollagenapplikationen ein deutlicher Abfall des Hydroxyprolinspiegels eintritt, der bei der dritten Kollagendarreichung ausbleibt.

Histologische Untersuchungen

Durch Einbringen unserer arteigenen *Kollagenlösung in ein umgestülptes Dünndarmstück* (Versuch II d) sollte zunächst das färberische Verhalten des

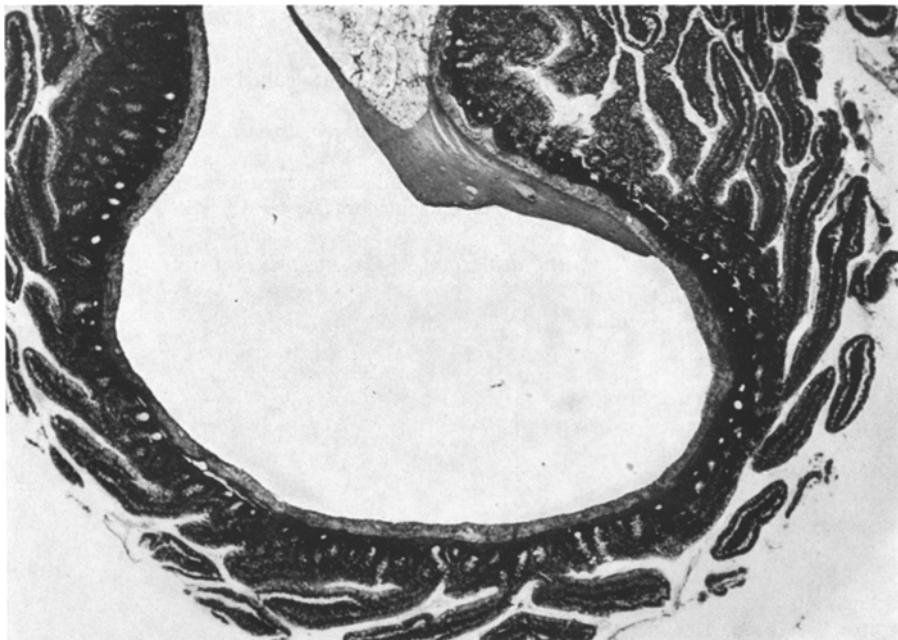


Abb. 2. Darstellung des eingebrachten löslichen Kollagens in evertiertem Dünndarmsäckchen, van Gieson. Man beachte die Farbgleichheit des exogenen Kollagens mit dem kollagenen Bindegewebe der Submucosa. Van Gieson, Ok.: KPL 8×, Obj.: Plan 2,5, Opt.: 1,25

instillierten Kollagens geprüft werden. Im nach VAN GIESON gefärbten Präparat findet sich in dem vom visceralen Peritonealsack ausgekleideten Lumen des umgestülpten Dünndarms eine rotgefärbte homogene Masse, die sich an das Peritonealblatt und den Rest des Mesenterialfettgewebes reizlos anlagert (Abb. 2).

Es ist zu erkennen, daß die eingefüllte Kollagenlösung dieselbe Färbung aufweist wie das kollagene Bindegewebe etwa im Bereich der Submucosa.

Verhalten des unter die Bauchhaut applizierten Kollagens (IIc): Nach 16 Std beobachtet man bereits eine Neubildung von Fibroblasten am Rand des liegengebliebenen Kollagens. Die präexistenten kollagenen Faserbündel erscheinen gequollen und in ihrer Struktur aufgelockert. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man überwiegend Fibroblasten und Fibrocyten mit wenig Granulocyten und Histiocyten. Nach 48 Std ist die entzündliche Infiltration mit Granulocyten stärker, die in die injizierten Kollagenmassen eindringen. Weiter peripherwärts sieht man Histiocyten und bereits faserbildende Bindegewebsszellen, durchsetzt

von Granulocyten. Die präexistenten Fasern sind nicht mehr so stark verquollen wie nach 16 Std. *Nach 4 Tagen* ist das injizierte Kollagen nicht mehr zu sehen. An seiner Stelle erkennt man eine starke Wucherung von Fibroblasten, die an manchen Stellen ungeordnet gelagert sind. Am Rand des ehemaligen Kollagendepots tritt deutliche Faserbildung auf, die im Zentrum noch nicht übermäßig weit fortgeschritten ist. *Nach 6 Tagen* findet sich außerordentlich kräftige Faserbildung und weitgehende Umwandlung der Fibroblasten in Fibrocyten, die immer noch reichlich vorhanden sind.

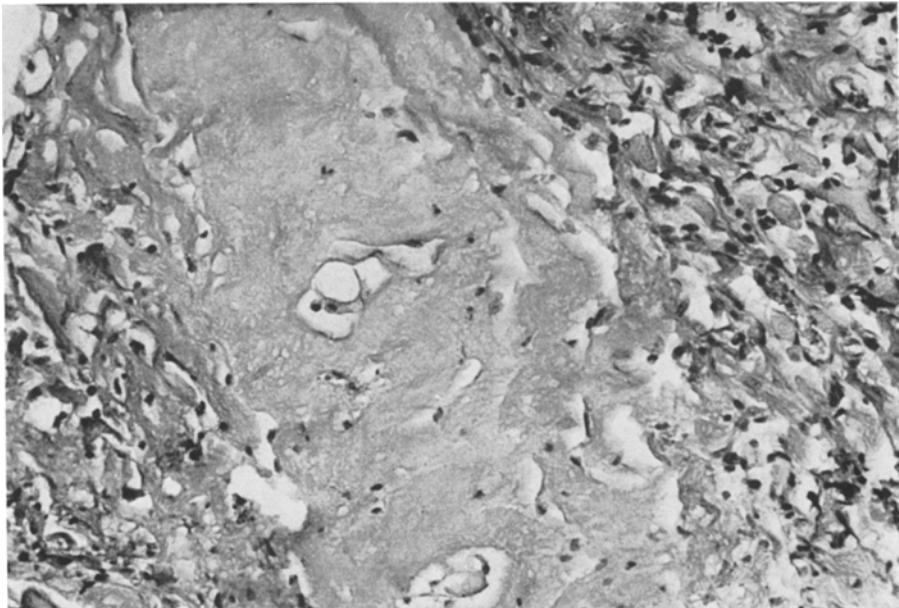


Abb. 3. Noch ziemlich homogenes und exogenes Kollagen, welches nur beginnend lakunäre Hohlräumbildung aufweist. Vom Rande her zunehmende Auflockerung mit Vermehrung von faserbildenden Zellen. van Gieson, Ok.: KPL 8×, Obj.: Plan 16, Opt.: 1,25

Im Anschluß an die obigen Versuche wurden mit *löslichem Kollagen behandelte laparotomierte Ratten* (Versuch IIa) zu verschiedenen Zeiten histologisch untersucht: Stufenschnitte zeigen am 3. Tag p.o. im Bereich der Schnittwunde bereits neugebildete Bindegewebszellen. In der Umgebung von Gefäßen finden sich stärkere frische entzündliche Zellinfiltrate, vorwiegend aus Granulocyten. Die stärkere Vergrößerung weist erst von diesem Zeitpunkt ab Fibroblasten auf, weniger Fibrocyten und vereinzelt Granulocyten. Am 4. Tag p. o. finden sich im wesentlichen ähnliche Befunde. Am 5. Tag p. o. zeigt sich im Bereich des Wundkanals fibroblasten- und fibrocytenreiches Bindegewebe mit stärkerer Neubildung von Fasern. Dazwischen reichlich Histiocyten, Rundzellen und vereinzelt Granulocyten. Besonders stark ist die Sprossung und Neubildung von Fibroblasten im Bereich der Adventitia neugebildeter Gefäße. Untersuchungen am 6. p. o. Tag lassen eine Faserneubildung mit zahlreichen Fibroblasten und Fibrocyten im Bereich des Wundkanals erkennen. Daneben sieht man in der Umgebung von Gefäßen noch Reste entzündlicher Infiltration in Form weniger Granulocyten und Rundzellen.

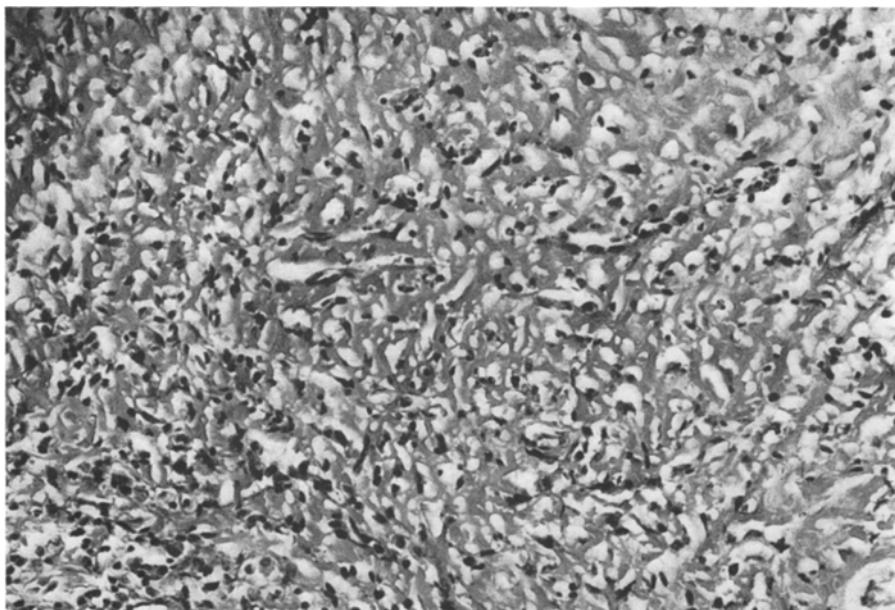


Abb. 4. Fortgeschrittenes lakunäre Struktur der exogenen Kollagenmasse. In den Lakunen liegen Fibroblasten, vereinzelt auch Granulocyten, van Gieson, Ok.: KPL 8×, Obj.: Plan 16, Opt.: 1,25

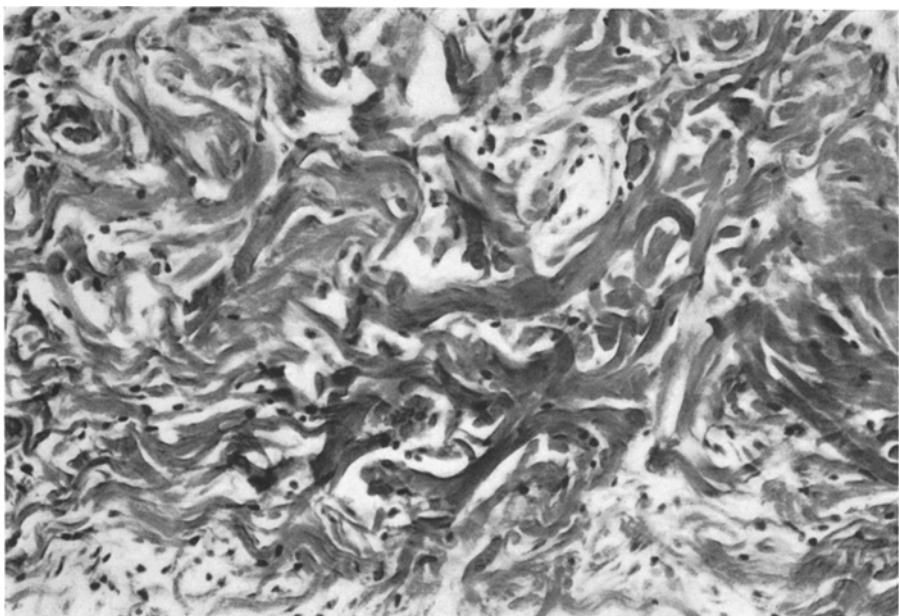


Abb. 5. Stärkere Vergrößerung kräftiger kollagener Faserbündel, 9. Tag p.o. Kollagentier. Entzündliche Infiltratzellen sind nicht mehr zu sehen. van Gieson, Ok.: KPL 8×, Obj.: Plan 40, Opt.: 1,25

Das Kontrollpräparat (6. Tag p. o. ohne Kollagenbehandlung — Versuch II b) zeigt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls Fibroblasten und Fibrocytenbildung, die Faserbildung erscheint weniger ausgeprägt.

Abb. 3 zeigt in der Umgebung des zuletzt injizierten Kollagens (Kollagenlösung wurde stets am Operationstag appliziert, sowie am 3. und 5. Tag p.o. injiziert) eine stärkere Ansammlung von Bindegewebsszellen. Die Faserbildung beginnt stets am Rande des injizierten Materials; Abb. 4 demonstriert die immer folgende lakunäre Auflockerung der Kollagenmassen. In den Lakunen liegen vorwiegend Fibroblasten.

Im Farbbild kann man die reinjizierten Kollagenmassen, rot und von lakunenartigen Hohlräumen durchsetzt, noch besser erkennen. In diesen Hohlräumen befinden sich die faserbildenden Bindegewebsszellen. Man hat den Eindruck, als ob diese Bindegewebsszellen die Lakunen durch „Aushöhlen“ der injizierten Kollagenlösung bilden.

Um den 9. Tag p.o. findet sich bei den Kollagentieren im Wundkanal ein recht faserreiches und zellreiches neugebildetes Bindegewebe.

Kontrollpräparate zeigen zu gleicher Zeit ein fibroblasten- und fibrocytenreiches Bindegewebe, die Faserneubildung ist jedoch weit weniger ausgeprägt mit neugebildeten lockeren, kurzen und wenig ausgerichteten Faserbündeln. Im Gegensatz dazu weisen die Schnitte der Versuchstiere die Ausbildung dichter, langer und wohlgeordneter Faserbündel auf. Allgemein lässt sich sagen, daß im histologischen Präparat die Faserbildung bei den kollagenbehandelten Tieren gegenüber den Kontrollen qualitativ und quantitativ verbessert ist.

Bei stärkerer Vergrößerung sieht man sehr kräftige kollagene Faserbündel. In diesem Bereich der Faserbildung sind immer noch zahlreiche Fibroblasten und Fibrocyten zu sehen, entzündliche Infiltratzellen dagegen nicht mehr (Abb. 5).

Diskussion

Vergleicht man die Ergebnisse der histologischen Untersuchung mit dem Verlauf der Hydroxyprolinausscheidungskurven, so sieht man in den ersten Tagen nach Wundsetzung und gleichzeitiger Injektion von arteigentlichem, löslichem Kollagen eine Erhöhung des Hydroxyprolinspiegels im Harn, die wohl auf den Abbau des körpereigenen Kollagens bei der Wundsetzung zurückzuführen ist. Eine zweite mögliche Ursache des erhöhten Harn-Hydroxyprolinspiegels, eine Neusynthese von Kollagen, lässt sich bis zum 3. Tage p.o. ausschließen, denn erst von diesem Zeitpunkt an werden vereinzelt Fibroblasten beobachtet. Nur im Gewebstest (unverletztes Gewebe) werden schon nach 16 Std die ersten Anzeichen der Fibroblastenbildung beobachtet.

Betrachten wir den Verlauf des Harn-Hydroxyprolinspiegels nach Kollagenverabreichung ohne Wundsetzung, so sieht man eine deutliche Verminderung des Hydroxyprolingehalts nach den beiden ersten Kollagenapplikationen, die aber nach der dritten Kollagendarreichung nicht auftritt. Die Kurve scheint sich wieder dem Normalwert zu nähern. Dieser Kurvenverlauf würde bedeuten, daß die stoffwechselaktiven Kollagenfraktionen, welche den Hydroxyprolingehalt des Harns bewirken, entweder in ihrer Entstehung gehemmt werden (durch Neusynthese oder Abbau von reifem Kollagen) oder aber in harnunfähige Produkte umgewandelt werden. Das histologische Bild bringt diesbezüglich keine Klärung. Man beobachtet nämlich bereits nach 16 Std die ersten Fibroblasten, die in ihrer

Funktion nicht gestört zu sein scheinen, denn nach 4 Tagen liegen die ersten neugebildeten Fasern vor. Die Deutung des Abfalls des Harn-Hydroxyprolinspiegels nach Kollagenapplikation bleibt also vorläufig noch unklar. Einen Hinweis könnte vielleicht die Untersuchung des Serum-Hydroxyprolinspiegels unter den gleichen Versuchsbedingungen bringen. Wir werden später darüber berichten.

Histologisch zeigt sich nach den ersten postoperativen Tagen eine Fibroblastenwucherung. Um die injizierten Kollagenmassen bzw. an ihren Randgebieten, findet sich eine auffällig starke Entwicklung der faserbildenden Zellen. Die bei der stärkeren Vergrößerung im Lakenbereich gefundenen Fibroblasten scheinen mit der Verwertung des Fremdkollagens in Verbindung zu stehen, zumal morphologisch keinerlei Fremdkörperreaktionen nachzuweisen sind.

Die Dehiszenzwerte beim Reißtest zeigen zu diesem Zeitpunkt (4.—5. Tag p.o.) keine auffälligen Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe. Dies ist durchaus verständlich, da die Untersuchungen vom WILLIAMSON zeigen, daß die Festigkeit einer Wunde im wesentlichen auf die Stärke und Qualität der vorhandenen kollagenen Fasern zurückzuführen ist. Etwa um den 6. Tag ändert sich das Bild. Die Hydroxyprolinausscheidung fällt zum Ausgangswert ab, die Reißwerte nehmen in rascher Folge zu und feingeweblich zeigen sich jetzt schon recht fortgeschrittene Faserneubildungen im Bereich des Wundkanals. Zu diesem Zeitpunkt findet man auch im histologischen Bild die ersten deutlichen Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren. Die verbesserte und stärkere Ausbildung langer geordneter Faserbündel bei den Versuchstieren macht sich nun auch in den höheren Reißwerten gegenüber den Kontrolltieren bemerkbar. Nach wie vor finden sich überdies noch reichlich Fibroblasten und Fibrocyten, welche eine weitere Neubildung von Fasern bewirken. In den folgenden Tagen werden diese Beobachtungen noch ausgeprägter: Die Hydroxyprolinausscheidung hat ihren Ausgangswert erreicht, während die Reißwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe die qualitativen und quantitativen Unterschiede in der Faserneubildung zwischen Versuchs- und Kontrolltieren noch deutlicher herausstellen. Insgesamt lassen die feingeweblichen Untersuchungen in zeitlicher Übereinstimmung mit den erhöhten Reißwerten die Bildung eines hochwertigen faserreichen Bindegewebes im Wundkanal erkennen.

Die negativen Befunde der anfangs zitierten Autoren beruhen unseres Erachtens auf der Verwendung von nicht arteigenem Material. Zur Stützung dieser Hypothese sind entsprechende Versuche mit artfremdem Kollagen in Vorbereitung.

Zusammenfassung

Nach Verabfolgung von arteigenem löslichem Kollagen konnte an experimentellen Laparotomiewunden der Ratte ein besserer Wundheilverlauf festgestellt werden in Übereinstimmung mit morphologischen, physikalischen und biochemischen Untersuchungen. Die von anderen Autoren mitgeteilten negativen Ergebnisse bei ähnlichen Versuchen werden auf die artfremde Herkunft des Kollagens zurückgeführt.

On the Effect of Soluble Collagen on Experimentally Induced Wounds and Their Healing

Summary

From the agreement of morphologic, physical, and biochemical studies it could be shown that the course of healing of an experimental laparotomy wound in the rat was better if species-specific soluble collagen were administered. The negative results reported by other authors in similar studies may be related to the heterologous nature of the collagen used.

Literatur

- HAMPERL, H., u. H. G. LUHR: Die „Kollagenplombe“. I. Implantation rekonstituierter Fasern. II. Implantation zerkleinerter nativer Sehnenfasern. *Klin. Wschr.* **42**, 12, 109 (1964).
- HERNÁNDEZ-RICHTER, J., u. H. STRUCK: Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Wundheilung durch lösliches Kollagen. *Münch. med. Wschr.* **106**, 310 (1964).
- INOUE, T.: The “Cartilage Effect” on healing wounds. *Arch. Surg.* **82**, 432 (1961).
- MILLS, L. C., and J. H. MOYER: Inflammation and diseases of connective tissue. Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. 1961.
- PAPPAS, A. M., V. J. EVANS, G. W. HYATT, and W. R. EARLE: Acceleration of skin defect closure. *Surg. Gynec. Obstet.* **113**, 681 (1961).
- PEACOCK, E. E.: Production and polymerization of collagen in healing wounds of rats: some rate-regulating factors. *Ann. Surg.* **155**, 251 (1962).
- , and CH. HILL: Some aspects of fibrogenesis during the healing of primary and secondary wounds. *Surg. Gynec. Obstet.* **115**, 408 (1962).
- PRUDDEN, J. F., T. INOUE, and L. OCAMPO: Effect of subcutaneous cartilage pellets on wound tensile strength. *Arch. Surg.* **85**, 245 (1962).
- TEIR, H., and B. NYSTROM: Organ homogenates to stimulate wound healing in rat. *Arch. Path.* **74**, 499 (1962).
- WILLIAMSON, M. B.: The healing of wounds. New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book 1957.

Priv.-Doz. Dr. J. HERNÁNDEZ-RICHTER
II. Chirurgische Universitätsklinik
5 Köln-Merheim, Ostmerheimerstr. 200