

P. Betz

Histologische Kriterien zur Altersschätzung menschlicher Hautwunden

Eingegangen: 22. April 1999 / Angenommen: 7. Mai 1999

Histological parameters for the age-estimation of human skin wounds

Abstract The aim of this article is to provide current information on morphological parameters useful for a forensic age estimation of human skin wounds. In addition to mainly cellular reactions detectable by routine histological or enzyme histochemical techniques, immunohistochemical parameters and their forensic value are especially discussed.

Key words Wound age · Skin wounds · Morphology

Zusammenfassung Ziel des vorliegenden Beitrages ist es, einen aktuellen Überblick über die morphologischen Parameter zu geben, die momentan zur Altersbestimmung menschlicher Hautwunden zur Verfügung stehen. Neben der Darstellung von Reaktionen, die mit routine-histologischen und enzymhistochemischen Verfahren erfaßt werden können, wird insbesondere auf immunohistochemisch nachweisbare Veränderungen und deren forensische Verwertbarkeit eingegangen.

Schlüsselwörter Wundalter · Hautwunden · Morphologie

Einleitung

Zu den wesentlichen Fragestellungen der forensischen Morphologie zählt die Wundaltersbestimmung und damit die Vitalitätsbeurteilung von Verletzungen. Die Bedeutung dieser Thematik reflektiert sich in einer Vielzahl von Publikationen, die von zahlreichen Arbeitsgruppen unterschiedlichster Fachrichtungen veröffentlicht wurden. Die

Fülle der einschlägigen Literatur ist heute kaum noch überschaubar und kann im Rahmen dieser Arbeit auch nicht annähernd dargestellt werden. Der interessierte Leser sei deshalb auf die Spezialliteratur verwiesen. In diesem Übersichtsartikel sollen vielmehr die aktuell zur Verfügung stehenden Parameter der forensischen Altersbestimmung an der menschlichen Hautwunde angesprochen werden.

Prinzip der Wundheilung und der Wundaltersbestimmung

Die Wundheilung stellt eine Sonderform der Entzündung dar und kann – grob schematisch – in eine vaskuläre, zelluläre und proliferative Phase unterteilt werden. Diese Phasen sind wiederum durch eine ganze Reihe von zeitlich aufeinanderfolgenden bzw. sich auch überschneidenden Einzelveränderungen charakterisiert. Bei der Heilung von Hautwunden läßt sich hierbei vereinfacht folgender, gesetzmäßiger Reaktionsablauf skizzieren:

Jeder relevanten Gewebsalteration folgt eine frühe vaskuläre Reaktion mit Gefäßdilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität. Die hieraus resultierende Stase ermöglicht eine Interaktion zwischen Gefäßendothel und intravaskulären Leukozyten, die über verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 bzw. Selektine vermittelt wird. Auf die sich anschließende intravaskuläre Margination der Leukozyten folgt die aktive Emigration, die durch verschiedene chemotaktische Reize (Proteinfragmente, Komplementkomplexe, Lymphokine, Leukotriene, Thromboxane, Fibrin, Fibronectin etc.) gesteuert wird.

Als erste Zellen hämatogenen Ursprungs infiltrieren Granulozyten das Wundgebiet, die hauptsächlich an der Lyse und Phagozytose nekrotischen Gewebes beteiligt sind und hierzu u.a. Proteinase und Lysozym freisetzen [17, 70]. Darüber hinaus stimulieren diese Zellen u.a. über Monokine und Wachstumsfaktoren die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten. Fibroblastäre Zellen wandern zudem unter dem Einfluß chemotaktischer Signale wie Kollagenfragmente, Fibronectin, Komplementkomplexe und Lymphokine [21, 56] in das Wundgebiet ein

und sezernieren dort Proteine der extrazellulären Matrix und Zelladhäsionsmoleküle wie Fibronectin, Tenascin und verschiedene Kollagen-Subtypen. Letztere dienen dem Ersatz des untergegangenen Gewebes. Einige der fibroblastären Zellen transformieren zu sog. Myofibroblasten, die wegen ihres Gehalts an α -Aktin kontraktile Eigenschaften besitzen und in die Stabilisierung wie auch in die Kontraktion des Granulationsgewebes involviert sind [30, 31, 65]. Das ursprünglich zell- und gefäßreiche Granulationsgewebe transformiert schließlich in die permanente Narbe, wobei an der Reduktion der Zellzahl apoptotische Phänomene beteiligt sind.

Parallel zu den reparativen Veränderungen, die im traumatisierten Bindegewebe ablaufen, werden Keratinozyten stimuliert und aktiviert, die den ursprünglichen epithelialen Defekt durch Proliferation und Migration decken [46, 55]. Die Migration nimmt ihren Ausgang hierbei von der oberflächlichen Keratinozytenschicht der Epidermis wie auch von umliegenden Hautanhangsgebilden [52, 75]. Die Keratinozyten, die ebenfalls Aktin-ähnliche Komponenten enthalten [29], bedienen sich bei ihrer Wanderung einer provisorischen Matrix aus Fibrin und Fibronectin, die nach Abschluß der Reepithelialisation durch eine Basalmembran ersetzt wird [14].

Diese vereinfachte Darstellung verdeutlicht, daß die einzelnen Phasen des Heilungsprozesses durch eine Vielzahl von Einzelveränderungen charakterisiert sind, deren gesetzmäßiges und zeitabhängiges Auftreten im Prinzip schon 1867 von Cohnheim [16] beschrieben wurde. Die chronologisch im Wundgebiet zu beobachtenden Einzelphänomene können histologisch erfaßt und zur Altersschätzung einer unbekannt Wunde herangezogen werden kann.

Der Zeitpunkt der frühesten Nachweisbarkeit einer entsprechenden Reaktion legt im Falle eines positiven Befundes das Mindestalter der jeweiligen Verletzung fest. Tritt eine Reaktion in einem bestimmten Zeitintervall regelmäßig, d.h. in allen Wunden mit einer entsprechenden Überlebenszeit auf, so erlaubt das Fehlen einer positiven Reaktion in einer unbekannt Verletzung den Rückschluß, daß das Alter der Läsion unter- oder aber oberhalb dieser Zeitspanne einzuordnen ist. Da aber das Ausbleiben einer Reaktion v.a. auch durch methodische Faktoren beeinflusst werden kann, sind negative Befunde grundsätzlich mit Zurückhaltung zu interpretieren. Insofern ist das Kriterium der regelmäßigen Nachweisbarkeit unter forensischen Aspekten von deutlich geringerer Aussagekraft als das der frühesten Nachweisbarkeit, welches sich auf die positive Feststellung eines Befundes stützt. Den geringsten forensischen Wert besitzt schließlich das Kriterium der längsten Nachweisbarkeit, welches insbesondere von der individuell zumeist unterschiedlichen ursprünglichen Ausdehnung der Wundfläche abhängt und zudem ebenfalls nur bei negativem Befund eine Aussage erlaubt.

Die bereits angesprochenen Einzelveränderungen können grundsätzlich mit routinehistologischen, mit enzymhistochemischen wie auch mit immunhistochemischen Methoden dargestellt werden.

Der Vorteil der routine-histologischen Färbeverfahren wie z.B. der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der Berli-

ner Blaureaktion liegt im Wesentlichen in deren einfachen und schnellen Durchführbarkeit, der Nachteil hingegen darin, daß nicht jeder Parameter spezifisch und sicher erfaßt werden kann. Auch die enzymhistochemisch detektierbare Zahl an Parametern ist beschränkt, wobei das vergleichsweise unregelmäßige Auftreten positiver Befunde zusätzlich zu berücksichtigen ist. Andererseits scheinen enzymhistochemische Verfahren aber relativ resistent gegenüber Fäulnisinflüssen zu sein, wohingegen immunhistochemische Methoden – allerdings abhängig vom darzustellenden Antigen – auf Fäulnisveränderungen recht empfindlich reagieren. Mit der Immunhistochemie läßt sich jedoch eine Vielzahl wichtiger Antigene, die während der Wundheilung exprimiert werden, zuverlässig und spezifisch nachweisen.

Im Folgenden sollen nun die aktuell zur Verfügung stehenden, mit den verschiedenen histologischen Methoden darstellbaren Parameter angesprochen werden, auf die sich die forensische Altersbestimmung menschlicher Hautwunden momentan stützt.

Routine-Histologie

Im Laufe der Wundheilung infiltrieren zunächst polymorphkernige Granulozyten (PMN) das Wundgebiet, die auch im HE-gefärbten Präparat aufgrund ihrer typischen Kernmorphologie zu identifizieren sind. Bei der Auswertung der Präparate ist allerdings zu berücksichtigen, daß Granulozyten auch passiv im Rahmen der Einblutung in das Gewebe eingeschwemmt werden können. Deshalb sind unter forensischen Gesichtspunkten wohl nur solche Schnitte als sicher positiv zu beurteilen, in denen neutrophile Granulozyten auch außerhalb der direkten Blutungszone aufzufinden sind [10]. Als sicher vitales Zeichen wird man den Nachweis der Gefäßpermeation ansprechen können, wohingegen die intravaskuläre Leukozyten-Margination von einer artifiziellen Anlagerung nicht eindeutig unterschieden werden kann.

Da die früheste Nachweisbarkeit der Granulozyteninfiltration mit ca. 15–30 Minuten nach Wundsetzung angegeben wird [7, 18, 44, 50, 57, 72], belegt ein positiver Befund ein entsprechendes Mindestalter. Ein regelmäßiges Auftreten der Granulozyteninfiltration scheint in der menschlichen Hautwunde nach ungefähr 15 Stunden Überlebenszeit gegeben [5].

Aktiviert Monozyten (Makrophagen) lassen sich im HE-Präparat ebenfalls aufgrund ihrer typischen Morphologie gut identifizieren. Da Makrophagen eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als Neutrophile besitzen, treten sie – bei gleichzeitigem Beginn der Migration – später im Wundgebiet auf [67, 74]. Die früheste Nachweisbarkeit von Makrophagen wird mit ungefähr 3 Stunden mitgeteilt [5, 44, 50], ein regelmäßiges Auftreten eindeutig positiver Reaktionen ist nach ca. 3 Tagen zu erwarten.

Da die vergleichsweise kurzlebigen Granulozyten schneller aus dem Wundgebiet verschwinden, kann der Wechsel von der Prädominanz der Neutrophilen zum mono-histiozytären Zellbild ebenfalls Informationen zum Wundalter

geben. Ein Überwiegen der Makrophagen konnte erstmals ca. 20 Stunden nach Wundsetzung und regelmäßig ab 11 Tagen Überlebenszeit beobachtet werden [5].

Da die Makrophagen hauptsächlich an der Phagozytose nekrotischen Gewebes beteiligt sind, können aufgrund der differentiellen Phagozytoseaktivität auch mit routine-histologischen Verfahren verschiedene Subtypen unterschieden werden.

Lipophagen sind anhand ihres typischen schaumartigen Zytoplasmas bereits im HE-Schnitt sicher anzusprechen und frühestens nach einer Überlebenszeit von 3 Tagen nachweisbar [7]. Die Diagnose von Erythrophagen, die ebenfalls frühestens nach ca. 3 Tagen im Wundgebiet zu erwarten sind, setzt den eindeutigen Nachweis von inkorporierten Erythrozyten voraus. Insofern sind besonders hohe Anforderungen an die Schnittqualität zu stellen.

Die inkorporierten Erythrozyten werden in den Makrophagen abgebaut und hierbei Hämoglobin, welches zu Siderin degradiert wird, freigesetzt. Am Hämoglobinabbau wesentlich beteiligt ist die mikrosomale Hämoxygenase [53, 69]. Das entstehende Hämosiderin ist mit der Berliner Blau-Reaktion leicht zu erfassen und ebenfalls nach ungefähr 3 Tagen erstmals im Wundgebiet darstellbar [2–4, 6, 42, 47].

Hämatoidin (kristallisiertes Bilirubin) ist im Berliner Blau-gefärbten Schnitt aufgrund seiner gold-gelben Farbe sicher von Hämosiderin zu unterscheiden. Da Hämatoidin einer vergleichsweise schnellen Reabsorption unterliegt [41] und zudem nur unter bestimmten, nicht eindeutig bekannten Bedingungen gebildet wird, ist es im Wundgebiet sehr unregelmäßig darstellbar. Als früheste Nachweisbarkeitsgrenze wird eine Woche angegeben [4, 5, 32, 48, 72, 73].

Obwohl Lymphozyten hauptsächlich in chronisch-entzündliche Prozesse involviert sind, wird ein zeitabhängiges Auftreten im Wundgebiet – wenn auch kontrovers – diskutiert. So fanden Raekallio [61] wie auch Helpap [40] lediglich wenige Lymphozyten, Sieracki und Reback [64] hingegen ein Überwiegen lymphozytärer Zellen im entzündlichen Exsudat nach einer Überlebenszeit von 12 Stunden. Man wird diese erheblichen Differenzen möglicherweise am ehesten mit der mitunter schwierigen Unterscheidung der Lymphozyten von anderen Leukozyten erklären können. Unter praktischen Gesichtspunkten wird man wohl nur den Nachweis fleckförmiger Lymphozyten-Infiltrate, die frühestens ca. eine Woche nach Wundsetzung darstellbar sind, als Kriterium für die Wundaltersschätzung heranziehen können [5].

Auch Fibroblasten sind mit routine-histologischen Verfahren nicht immer eindeutig von anderen Zellen zu differenzieren. Die Ausbildung eines zellreichen und zahlreicher Kapillaren enthaltenden Granulationsgewebe bereitet aber auch im HE-gefärbten Präparat keine Schwierigkeiten und ist frühestens nach ca. 3 Tagen zu beobachten.

Parallel zur Reparatur des traumatisierten Bindegewebes verläuft die Deckung des epidermalen Defekts. Der Nachweis migrierender Keratinozyten mit großem Zytoplasmaanteil und ohne die für die intakte Epidermis typische Schichtung ist frühestens nach ungefähr 2 Tagen und

regelmäßig ab einer Überlebenszeit von 9 Tagen möglich. Eine vollständige Deckung des Defekts kann (in chirurgisch versorgten und primär heilenden Wunden) frühestens 5 Tage nach Verletzung erwartet, aber regelmäßig erst nach ca. 21 Tagen gefunden werden [5].

Enzymhistochemie

Enzymhistochemische Verfahren wurden von Raekallio in die Wundaltersbestimmung eingeführt [58, 59, 61], der insbesondere zeitabhängige Unterschiede in der Nachweisbarkeit der Adenosintriphosphatase, der unspezifischen Esterase, der Aminopeptidase und der sauren wie auch alkalischen Phosphatase untersuchte. Raekallio beschrieb im Tierexperiment einen Abfall der Enzymaktivität im inneren Wundbereich und bezeichnete dies als Phänomen der „negativen vitalen Reaktion“, wohingegen in entfernteren Anteilen ein Aktivitätsanstieg auftrat („positive vitale Reaktion“). Die am Meerschweinchen gewonnenen Daten, die einen Aktivitätsanstieg der unspezifischen Esterase und der ATPase nach 30–60 Minuten, gefolgt von einer Reaktion der Aminopeptidase nach 2 Stunden sowie der sauren bzw. alkalischen Phosphatase nach 4 bzw. 8 Stunden ergaben, wurden an 43 Verkehrsunfallopfern überprüft [60]. Hierbei wurde zwar eine „prinzipielle Übertragbarkeit“ gefunden, aber auch 5 Ausnahmen mit deutlich verzögerter Reaktion beschrieben, die Raekallio selbst in einem Fall mit dem fortgeschrittenen Individualalter begründete. Andererseits hatten aber gerade Raekallio und Mäkinen im Tierversuch keine relevante Abhängigkeit der gesteigerten Enzymaktivität vom Individualalter festgestellt [62].

Auch wenn die Ergebnisse Raekallios von einer ganzen Reihe von Autoren im Wesentlichen bestätigt wurden [1, 2, 26, 28, 34, 45, 51, 68], fanden sich doch auch kritische Stimmen, die andere Zeiträume für das früheste Auftreten einer positiven Reaktion nannten [19, 54] und stellenweise sogar über postmortale Aktivitätsanstiege berichteten. Bei aktuelleren Nachuntersuchungen an menschlichen Leichen [5] wurden ebenfalls teils erhebliche Abweichungen von den Zeitangaben Raekallios, allerdings keine postmortale Induzierbarkeit einer positiven Reaktion, gefunden.

Wesentlich für die Interpretation der Arbeiten Raekallios scheint, daß die vornehmlich im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse an der menschlichen Leiche nur „überprüft“ und hierbei einige „Ausnahmen“ gefunden wurden. Allein diese Ausnahmen hätten aber den Rückschluß nahelegen müssen, daß eine Übertragbarkeit auf den Menschen insbesondere unter forensischen Gesichtspunkten nicht ohne weiteres möglich ist. Auf diese Problematik wiesen v.a. Dotzauer und Tamaska [22] hin, und auch Berg [1] bestätigte, daß die von Raekallio beschriebene Regelmäßigkeit der Befunde tatsächlich nur im Tierversuch, nicht aber am Menschen gefunden werden kann.

Unter praktischen Gesichtspunkten wird man die Aussagekraft enzymhistochemischer Verfahren für die Altersbestimmung menschlicher Hautwunden dahingehend be-

schreiben können, daß bei deutlich erhöhter Enzymaktivität auf eine Überlebenszeit mindestens im Stundenbereich zu schließen ist, negative Befunde erlauben hingegen wegen der unregelmäßigen Nachweisbarkeit positiver Reaktionen keine verlässliche Aussage zum Wundalter.

Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren ermöglichen die spezifische Erfassung einer ganzen Reihe von Veränderungen insbesondere auch in der frühen vaskulären Phase, die mit routinehistologischen oder enzymhistochemischen Techniken nicht bzw. nicht eindeutig nachweisbar sind.

Für die Vitalitätsbeurteilung von nur kurz überlebten Wunden bietet sich theoretisch zunächst die Darstellung von Fibrin an, da unmittelbar nach Verletzung die Gerinnungskaskade aktiviert und Fibrin gebildet wird. Andererseits ist aber bekannt, daß auch eine postmortale Fibrinbildung bis zu 6 Stunden nach dem Tod möglich ist [36, 43, 47, 73], die die Aussagekraft dieses Parameters grundsätzlich in Frage stellen kann. Auch wenn von einigen Autoren angenommen wird, daß vitale Fibrin-Formationen morphologisch eindeutig von postmortalen Reaktionen zu unterscheiden sind [12, 13, 27, 38], wird dieser Standpunkt insbesondere auch im Hinblick auf elektronenoptische Befunde kontrovers diskutiert [63]. Die Wertigkeit dieses Parameters als vitales Zeichen muß unter forensischen Gesichtspunkten somit wohl eher zurückhaltend beurteilt werden.

Von wesentlicher Bedeutung für die Leukozytenmigration ist – wie bereits angesprochen – die ebenfalls schnell nach Traumatisierung einsetzende Interaktion zwischen Endothel und Leukozyt. Immunhistochemische Untersuchungen liegen bisher für verschiedene Selektine und Zelladhäsionsmoleküle vor. Eine deutlich verstärkte Expression von P-Selektin soll bereits wenige Minuten und bis zu maximal 7 Stunden nach Wundsetzung zu beobachten sein, wohingegen eine entsprechende Reaktion für E-Selektin zeitlich etwas verzögert nach 1 Stunde und bis zu 17 Tage beschrieben wurde [241]. Positive Befunde für ICAM-1 wurden in einem posttraumatischen Intervall von 1,5 Stunden bis zu 3,5 Tagen gefunden [23]. Grundsätzlich ist bei Darstellung dieser Parameter aber zu berücksichtigen, daß der eindeutige Nachweis der verstärkten Expression eines auch physiologischerweise in unverletzter Haut lokalisierten Antigens durchaus mit Schwierigkeiten verbunden sein kann. Insbesondere muß man sich in diesem Zusammenhang kritisch die Frage stellen, inwieweit methodische Einflußfaktoren wie z.B. inhomogene Antikörperkonzentrationen und Andauung zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnten.

Neben dem frühen Nachweis der Selektine bzw. Zelladhäsionsmoleküle, die die Interaktion zwischen Endothel und Leukozyt vermitteln, kann auch die Darstellung von Fibronectin Hinweise auf die Vitalität einer Verletzung geben. Fibronectin besitzt u.a. chemotaktische Eigenschaften und ist deshalb für die Zellmigration in das Wundgebiet von besonderer Bedeutung [15]. Bereits 1981 berich-

teten Viljanto et al. über eine frühe Nachweisbarkeit von Fibronectin in chirurgischen Wunden von Kindern [71] und auch am Skelettmuskel wurde eine rasche Fibronectin-Reaktion beschrieben [27]. In systematischen Untersuchungen an menschlichen Hautwunden konnten diese Befunde bestätigt und positive Reaktionen in Form von sich verzweigenden und kräftig anfärbbaren Strukturen, die auch außerhalb des Wundrandes und der Blutungszone lokalisiert waren, bereits nach einer Überlebenszeit von 10–20 Minuten beobachtet werden [8]. Obwohl im Tierversuch postmortale Reaktionen beschrieben wurden, die der vitalen Fibronectin-Morphologie vergleichbar sein sollen [35], sind derartige Befunde bisher weder am menschlichen Skelettmuskel noch an der Hautwunde beobachtet worden. Insbesondere unter Berücksichtigung des Grundsatzes, daß im Tierversuch gewonnene Ergebnisse nicht vorbehaltlos auf menschliche Verhältnisse übertragen werden dürfen, kann die Darstellung von Fibronectin nach wie vor als brauchbarer Parameter zur Vitalitätsbeurteilung menschlicher Hautwunden bewertet werden.

Während der Heilung von Hautwunden infiltrieren nicht nur Zellen hämatogenen Ursprungs das Wundgebiet, zusätzlich werden ortsständige, residente Zellen zur Proliferation stimuliert. Der Proliferationsnachweis gelingt u.a. anhand der Darstellung des nukleären Ki 67 Antigens [33], welches mit Zellen in der G₁-, G₂-, S- und M-Phase des Zellzyklus reagiert. Da dieses Antigen allerdings auch im Rahmen des physiologischen Zellersatzes exprimiert wird, muß sich die Definition einer positiven Reaktion an der maximalen Zahl positiv reagierender Zellen in unverletzter Haut orientieren. Hierbei ist es von untergeordneter Bedeutung, ob man den Schwellenwert als Absolut-Wert (Zahl positiver Zellen pro Flächeneinheit) oder aber als Relativ-Wert (Zahl positiver Zellen bezogen auf die Gesamt-Zellzahl pro Flächeneinheit) definiert. Bei entsprechenden Untersuchungen zur fibroblastären Ki 67-Expression in der menschlichen Hautwunde konnten positive Reaktionen (definiert als ≥ 6 Zellen/0,0001 cm²) erstmals nach einer Überlebenszeit von ca. 1,5 Tagen und annähernd regelmäßig ab 6 Tagen Wundalter beobachtet werden [9].

Eng verbunden mit der Proliferation ist das Phänomen des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Apoptotische Erscheinungen können hierbei „indirekt“ z.B. über die Darstellung des p53 Tumor Suppressor Gens, oder aber „direkt“ über den Nachweis fragmentierter DNA erfaßt werden. Dem p53 Tumor Suppressor Gen wird die Eigenschaft zugesprochen, DNA Schäden zu entdecken und die Zelle in der G₁- oder G₂-Phase zu arretieren, um die DNA Reparatur zu ermöglichen. Verläuft diese erfolglos, initiiert p53 die Apoptose und fragmentierte DNA wird nachweisbar [37].

Die morphometrische Auswertung von Hautwunden ergab, daß eine relevant verstärkte Expression von p53 bzw. eine erhöhte Nachweisbarkeit fragmentierter DNA ungefähr 1–2 Tage nach Wundsetzung und zeitlich somit zusammen mit dem Beginn der fibroblastären Proliferation zu erwarten ist [11, 39].

In dieser Phase der Wundheilung treten auch weitere zelluläre Reaktionen auf, deren Erfassung Hinweise zum

Wundalter gibt. Wie bereits angesprochen differenzieren einige Fibroblasten zu Myofibroblasten, die aufgrund ihres Gehaltes an α -Aktin, welcher den Zellen ihren Namen gab, und der Expression verschiedener Basalmembran-Komponenten wiederum in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden können [20, 30, 49]. Laminin- und Heparansulfatproteoglykan (HSPG)-positive Myofibroblasten sind frühestens ab einem Wundalter von ca. 1,5 Tagen zu erwarten, wohingegen eine myofibroblastäre Expression von α -Aktin frühestens nach 4 Tagen und von Kollagen IV erstmals nach ca. 5 Tagen zur Beobachtung kommt [5]. Wegen des unregelmäßigen Auftretens positiver Befunde, welches bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde [66], lassen sich darüber hinausgehende Informationen zur Wundaltersbestimmung anhand des Myofibroblastennachweises nicht gewinnen.

Ähnlich wie bei der Darstellung verschiedener Myofibroblasten-Subtypen erlaubt die Immunhistochemie auch die Differenzierung von Makrophagen-Subpopulationen. So lassen sich Makrophagen mit positiver Reaktion für den „intermediate stage inflammation marker“ (RM 3/1) frühestens nach 7 Tagen, positive Befunde für 25 F 9 („late stage inflammation marker“) erstmals nach 11 Tagen und für G 16/1 („chronic stage inflammation marker“) nach 12 Tagen Überlebenszeit nachweisen [10].

Immunhistochemische Verfahren tragen jedoch nicht nur zur spezifischen Erfassung von Veränderungen auf zellulärer Ebene bei, sie ermöglichen auch die Darstellung einer ganzen Reihe von Reaktionen der extrazellulären Matrix. So tritt Tenascin, welches wie Fibronectin zu den Zelladhäsionsmolekülen gezählt werden kann, bereits nach einer Überlebenszeit von ca. 2 Tagen in typischer Reaktionsmorphologie im Wundgebiet auf [5] und kann nahezu regelmäßig ab 5 Tagen Wundalter erwartet werden.

Im Anschluß an die Zellmigration und -proliferation, aber auch schon parallel zu diesen, wird im Wundgebiet die Synthese verschiedener Kollagene gesteigert, die dem Ersatz des untergegangenen Bindegewebes dient. Positive Befunde für Kollagen III können frühestens nach 2–3 Tagen, für Kollagen V und VI nach 3 Tagen sowie für Kollagen I nach ca. 5 Tagen Wundalter beobachtet werden [5, 25]. Eine regelmäßige Nachweisbarkeit wurde ab dem 6.–7. Tag nach Verletzung beschrieben.

Während die interstitiellen Kollagene im Granulationsgewebe nachweisbar sind, werden die Basalmembran-Kollagene IV und VII wie auch die nicht-kollagenösen Basalmembran-Komponenten Laminin und HSPG zeitabhängig im Rahmen der epidermalen Reparatur exprimiert. Basalmembran-Fragmente sind hierbei frühestens nach 4 Tagen, eine vollständige Wiederherstellung der epidermalen Basalmembran hingegen erst ab 8 Tagen Wundalter zu erwarten [5, 25]. Eine regelmäßige Nachweisbarkeit von Fragmenten der epidermalen Basalmembran kann ab 13 Tagen angenommen werden, eine vollständig wiederhergestellte Basalmembran konnte (in chirurgisch versorgten und primär heilenden Wunden) regelmäßig ab 21 Tagen beobachtet werden.

Die bei der epidermalen Defektheilung synthetisierten Basalmembran-Komponenten werden hauptsächlich von

den proliferierenden und migrierenden Keratinozyten gebildet. Da die Keratinozyten-Migration offensichtlich von der superfizialen Zellschicht ausgeht, die ein anderes Keratin-Expressionsmuster aufweist als die basalen Keratinozyten, sind auch wundaltersabhängige Unterschiede in der Keratin-Expression zu erwarten. Eine vollständige Anfärbbarkeit der neugebildeten Epidermis für den Basalzellschicht-Marker Keratin 5 konnte erstmals nach einer Überlebenszeit von 13 Tagen und regelmäßig nach 23 Tagen gefunden werden [5].

Praktische Anmerkungen

Jede Wundaltersbestimmung steht und fällt mit der Sicherheit, mit welcher ein Befund erhoben wird. Besondere Vorsicht ist daher bei postmortal induzierbaren oder artefiziellen Veränderungen geboten, deren morphologischer Aspekt dem von vitalen Reaktionen gleicht. In diesem Zusammenhang wäre z.B. die immunhistochemische Darstellung von Fibronectin, aber auch die der interstitiellen Kollagene zu nennen.

Da strangförmige, Kollagen-positive Strukturen auch von zertrümmertem bzw. aufgefasertem Bindegewebe stammen können, dürfen nur typische, netzwerkartige Reaktionsmuster, die in Assoziation mit fibroblastären Zellen stehen, als vitale Kollagen-Reaktionen angesprochen werden.

Fibronectin kommt in einer Gewebsform, aber auch in einer löslichen Serumform vor, so daß eine Nachweisbarkeit dieses Antigens auch in postmortalen Blutungen denkbar erscheint. Insofern können nur charakteristische, kräftig reagierende und sich verzweigende Strukturen, die außerhalb von Einblutungen lokalisiert sind, als vitale Reaktionen beurteilt werden. Da zudem am Wundrand Vertrocknungsartefakte auftreten können, die saumartige unspezifische Anfärbungen hervorrufen, empfiehlt es sich grundsätzlich, den Nachweis eines positiven Befundes auf die Feststellung typischer Veränderungen in zentraleren Abschnitten der Präparate zu stützen.

Das Mitführen von negativen wie auch von positiven Kontrollen versteht sich insbesondere bei immunhistochemischen Färbungen von selbst. Präparate mit relevanter Hintergrundfärbung können grundsätzlich nicht verlässlich ausgewertet werden. Besonders hohe Anforderungen an die Qualität der Schnitte, v.a. an die Schnittdicke, erleichtern wesentlich die Auswertung, da sie – bei immunhistochemischen Färbungen – die unspezifische Hintergrundfärbung reduzieren oder aber den sicheren Nachweis eines Parameters – siehe die Darstellung von Erythrophen – überhaupt erst ermöglichen.

Wie bereits bei der Diskussion einzelner Parameter angesprochen, kommt v.a. der Erfassung eines positiven Befundes Bedeutung zu. Das Fehlen einer Reaktion sollte nur in Ausnahmefällen (vorsichtige) Rückschlüsse erlauben und setzt eine regelmäßige Nachweisbarkeit der entsprechenden Reaktion in einem bestimmten Zeitintervall voraus. Da zudem methodische Faktoren die Nachweisbarkeit eines Befundes wesentlich beeinflussen können, muß

eine ausreichende Zahl von Schnitten pro Wunde ausgewertet werden.

Berücksichtigt man diese grundsätzlichen Überlegungen zur Auswertung der Präparate, so lassen sich die mo-

mentan zur Verfügung stehenden Parameter, die zur forensischen Altersbestimmung menschlicher Hautwunden herangezogen werden können, in der chronologischen Reihenfolge ihres Auftretens folgendermaßen zusammenfassen:

Tabelle 1 Routine-histologisch und immunhistochemisch nachweisbare Parameter zur Altersbestimmung menschlicher Hautwunden

Parameter	Nachweisbarkeit		
	früheste	regelmäßige	längste
P-Selektin	Minuten	–	7 Stunden
Fibronektin	10–20 Minuten	> 4 Stunden	Monate
Granulozyten (HE)	15–30 Minuten	≥ 15 Stunden	Monate
E-Selektin	1 Stunde	–	17 Tage
ICAM-1	1,5 Stunden	–	3,5 Tage
Makrophagen (HE)	2–3 Stunden	≥ 3 Tage	Monate
Makrophagen > Granulozyten (HE)	20 Stunden	≥ 11 Tage	Monate
Fibroblasten-Proliferation	1,5 Tage	≥ 6 Tage	–
Fibroblasten-Apoptose	1–2 Tage	–	Monate
Myofibroblasten-Laminin	1,5 Tage	–	Monate
Myofibroblasten-HSPG	1,5 Tage	–	Monate
Tenascin	2 Tage	≥ 5 Tage	Monate
Keratinocyten-Migration (HE)	2 Tage	≥ 9 Tage	–
Kollagen III	2–3 Tage	≥ 6 Tage	Monate
Kollagen V	3 Tage	≥ 6 Tage	Monate
Kollagen VI	3 Tage	≥ 6 Tage	Monate
Lipophagen (HE, Sudan)	3 Tage	–	Monate
Erythrophagen (HE)	3 Tage	–	Monate
Siderophagen/Hämosiderin (Berliner Blau)	3 Tage	–	Monate
Granulationsgewebe (HE)	3 Tage	–	Monate
Myofibroblasten – Kollagen IV	4 Tage	–	Monate
Basalmembran-Fragmente	4 Tage	≥ 13 Tage	21 Tage
Kollagen I	5 Tage	≥ 7 Tage	Monate
Vollständige Reepithelialisation (HE)	5 Tage	≥ 21 Tage	–
Myofibroblasten – α -Aktin	5 Tage	–	Monate
Makrophagen RM 3/1	7 Tage	–	Monate
Vollständige epidermale Basalmembran (HE)	8 Tage	≥ 21 Tage	–
Hämatoidin (Berliner Blau)	8 Tage	–	Monate
Lymphozyten-Infiltrate (HE)	8 Tage	–	Monate
Makrophagen – 25 F 9	11 Tage	–	Monate
Makrophagen – G 16/1	12 Tage	–	–
Keratin 5-positive Basalzellschicht	13 Tage	≥ 23 Tage	–

Literatur

- Berg S (1969) Der Beweiswert der Todeszeitbestimmung (Überlebenszeit). *Beitr Gerichtl Med* 25:61–65
- Berg S (1972) Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. *Z Rechtsmed* 70:121–135
- Berg S (1975) Vitale Reaktionen und Zeiteinschätzungen. In: Mueller B (Hrsg) *Gerichtliche Medizin*, Bd 1. Springer, Berlin Heidelberg New York:327–340
- Berg S, Elbel R (1969) Altersbestimmung subcutaner Blutungen. *Münch Med Wochenschr* 111:1185–1190
- Betz P (1996) Neue Methoden zur histologischen Altersbestimmung menschlicher Hautwunden. In: Berg S, Brinkmann B (Hrsg.) *Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik*, Bd. 20. Schmidt-Römhild, Lübeck
- Betz P, Eisenmenger W (1996) Morphometrical analysis of hemosiderin deposits in relation to wound age. *Int J Legal Med* 108:262–264
- Betz P, Penning R, Eisenmenger W (1991) Lipophagen der Haut als zusätzlicher Parameter für die histologische Wundaltersschätzung. *Rechtsmedizin* 1:139–144
- Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Wiest I, Penning R, Eisenmenger W (1992) Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *Int J Legal Med* 105:21–26
- Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W (1993) The time-dependent localization of Ki 67 antigen-positive cells in human skin wounds. *Int J Legal Med* 106:35–40
- Betz P, Tübel J, Eisenmenger W (1995) Immunohistochemical analysis of markers for different macrophage phenotypes and their use for a forensic wound age estimation. *Int J Legal Med* 107:197–200
- Betz P, Nerlich A, Tübel J, Wiest I, Hausmann R (1997) Detection of cell death in human skin wounds of various ages by an in situ end labelling of nuclear DNA fragments. *Int J Legal Med* 110:240–243
- Böhm E (1978) Der Nachweis der frühen lokalen Vitalreaktion durch Kombination morphologischer Untersuchungsmethoden. *Z Rechtsmed* 81:191–206
- Böhm E, Tschomakov M (1973) Ein Sekundenphänomen der vitalen Reaktion. *Beitr Gerichtl Med* 31:221–229

14. Clark RAF, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB (1982) Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 79:264–269
15. Clark RAF, DellaPelle P, Manseau E, Lanigan JM, Dvorak HF, Colvin RB (1982) Blood vessel fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J Invest Dermatol* 79:269–276
16. Cohnheim J (1867) Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch [A]* 40:1–79
17. Colditz IG (1987) Early accumulation of neutrophils in acute inflammatory lesion. In: Movat HZ (ed) *Leukocyte emigration and its sequelae*. Karger, Basel:14–23
18. Cottier H (1980) Pathogenese. *Handbuch für die ärztliche Fortbildung*. Springer, Berlin Heidelberg New York
19. Dachun W, Jiazhen Z (1992) Localization and quantification of the non-specific esterase in injured skin for timing of wounds. *Forensic Sci Int* 53:203–213
20. Darby I, Skalli O, Gabbiani G (1990) Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21–29
21. Dohlmann JG, Goetzl WJ (1985) Determinants of generation and structural heterogeneity of fibroblast-activating principles of human mononuclear phagocytes. In: Van Furth R (ed) *Mononuclear phagocytes*. Nijhoff, Dordrecht, pp 303–308
22. Dotzauer G, Tamaska L (1968) Hautveränderungen an Leichen. In: (Hrsg) *Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Erg-Bd 1, Teil 1*, pp 708–786
23. Dreßler J, Bachmann L, Kasper M, Hauck JG, Müller E (1997) Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med* 110:299–304
24. Dreßler J, Bachmann L, Koch R, Müller E (1998) Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 112:39–44
25. Eisenmenger W, Nerlich A, Glück G (1988) Die Bedeutung des Kollagens bei der Wundaltersbestimmung. *Z Rechtsmed* 100:79–100
26. Fatteh A (1966) Histochemical distinction between antemortem and postmortem skin wounds. *J Forensic Sci* 11:17–27
27. Fechner G, Hernandez M, Bajanowski T, Sepulchre MA, Brinkmann B (1992) Immunohistochemical alterations after muscle trauma. *Int J Legal Med* 105:203–207
28. Friebe L, Woohsmann H (1968) Die Altersbestimmung von Kanülen-einstichen mittels enzymhistochemischer Methoden. *Dtsch Z Ges Gericht Med* 62:252–260
29. Gabbiani G, Ryan GB (1974) Development of a contractile apparatus in epithelial cells during epidermal and liver regeneration. *J Submicrosc Cytol Pathol* 6:143–157
30. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27:549–550
31. Gabbiani G, Le Lous M, Bailey AJ, Bazin S, Delaunay A (1976) Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol [B]* 21:133–145
32. Gedigk P (1958) Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigments. *Ergeb Allg Pathol Anat* 38:1–45
33. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13–20
34. Gerlach D (1977) Identifizierung und Altersbestimmung von Nadelstichverletzungen in der menschlichen Haut. *Z Rechtsmed* 79:289–295
35. Grellner W, Dimmeler S, Madea B (1998) Immunohistochemical detection of fibronectin in postmortem incised wounds of porcine skin. *Forens Sci Int* 97:109–116
36. Harms D (1971) Postmortale Fibrinolyse beim Menschen. Fischer, Stuttgart
37. Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH, Owen M (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by transactivation-deficient p53. *Genes Dev* 9:2170–2183
38. Hauser R, Fechner G, Brinkmann B (1990) Zur Unterscheidung zwischen intravitalem und postmortalen Blutungen. *Wiener Beitr Gerichtl Med* 48:437–441
39. Hausmann R, Nerlich A, Betz P (1998) The time-related expression of p53 protein in human skin wounds – a quantitative immunohistochemical analysis. *Int J Legal Med* 111:169–172
40. Helpap B (1987) Leitfaden der allgemeinen Entzündungslehre. Springer, Berlin Heidelberg
41. Howarth F, Cooper ERA (1955) The fate of certain foreign colloids and crystalloids after subarachnoid injection. *Acta Anat (Basel)* 25:112–140
42. Hueck W (1912) Pigmentstudien. *Beitr Pathol Anat* 54:68–232
43. Laiho K (1967) Immunohistochemical studies on fibrin in vital and postmortem subcutaneous haemorrhages. *Ann Acad Sci Fenn* 128:1–85
44. Leder LD, Crespin S (1964) Fermenthistochemische Untersuchungen zur Genese der Hautfenstermakrophagen. *Frankfurt Z Pathol* 73:611–628
45. Lindner J (1971) Vitale Reaktionen. *Acta Histochem [Suppl]* 9:435–467
46. Marks R (1981) The healing and nonhealing of wounds and ulcers of the skin. In: Glynn LE (ed) *Tissue repair and regeneration*. Elsevier, Amsterdam, pp 309–342
47. Mueller B (1964) Zur Frage der Unterscheidung von vitalen bzw. agonalen und postmortalen Blutungen. *Acta Med Legal Soc* 17:43–46
48. Muir R, Niven JSF (1935) The local formation of blood pigments. *J Pathol Bacteriol* 41:183–197
49. Nerlich A, Haraida S, Backa D, Schleicher E, Betz P, Höfling B (1991) Immunhistochemische Analyse der extrazellulären Matrix zur Differentialdiagnostik myogener und fibroblastärer Zellproliferation. *Verh Dtsch Ges Pathol* 75:246
50. Ojala K, Lempinen M, Hirvonen J (1969) A comparative study of the character and rapidity of the vital reaction in the incised wounds of human skin and subcutaneous adipose tissue. *J Forensic Med* 16:29–34
51. Oya M (1970) Histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in skin wounds and its application to forensic medicine. *Nippon Hoigahn Zasshi*
52. Pang SC, Daniels WH, Buck RC (1978) Epidermal migration during the healing of suction blisters in rat skin: a scanning and transmission electron microscopy study. *Am J Anat* 153:177–192
53. Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R (1971) The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J Exp Med* 133:1264–1281
54. Pioch W (1969) Epidermale Esterase-Aktivität als Beweis der vitalen Einwirkung von stumpfer Gewalt. *Beitr Gerichtl Med* 25:136–145
55. Pollack SV (1979) Wound healing. A review: I. The biology of wound healing. *J Dermatol Surg Oncol* 5:389–393
56. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH (1978) Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:871–875
57. Prokop O, Göhler W (1976) *Forensische Medizin*. Fischer, Stuttgart New York
58. Raekallio J (1960) Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing. *Nature (London)* 188:234–235
59. Raekallio J (1965) Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. *Schmidt-Römhild, Lübeck*
60. Raekallio J (1967) Application of histochemical methods to the study of traffic accidents. *Acta Med Legal Soc (Liège)* 20:171–178
61. Raekallio J (1970) Enzyme histochemistry of wound healing. Fischer, Stuttgart
62. Raekallio J, Mäkinen PL (1974) The effect of ageing on enzyme histochemical vital reactions. *Z Rechtsmed* 75:105–111
63. Schneider V (1974) Über rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an vital und postmortal entstandenen „Thromben“. *Z Rechtsmed* 74:47–54
64. Sieracki JC, Rebeck JW (1960) Role of the lymphocyte in inflammation. In: Rebeck JW (ed) *The lymphocyte and lymphocytic tissue*. Moeber, New York, pp 71–81
65. Skalli O, Gabbiani G (1988) The biology of the myofibroblast: relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. In: Clark RAF, Henson PM (eds) *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press, New York
66. Skalli O, Schürch W, Seemayer T, Lagacé R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G (1989) Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogenous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60:275–285
67. Spector WG, Willoughby DA (1968) *The pharmacology of inflammation*. University Press, London
68. Tanaka M (1966) The distinction between antemortem skin wounds by esterase activity. *Nippon Haighu Zusshi* 20:231–239
69. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase. *J Biol Chem* 244: 6388–6394
70. Van der Valk P, Herman CJ (1987) Biology and disease. *Leukocyte functions*. *Lab Invest* 57:127–137
71. Viljanto J, Penttinen R, Raekallio J (1981) Fibronectin in early phases of wound healing in children. *Acta Clin Scand* 147:7–13
72. Walcher K (1930) Über vitale Reaktionen. *Dtsch Z Ges Gerichtl Med* 15:16–57
73. Walcher K (1936) Die vitale Reaktion bei der Beurteilung des gewaltsamen Todes. *Dtsch Z Ges Gerichtl Med* 26:193–211
74. Ward PA (1975) Inflammation. In: La Via MF, Hill RB (eds) *Principles of pathobiology*. Oxford Press, New York Oxford London Toronto
75. Winter GD (1972) Epidermal regeneration studied in the domestic pig. In: Maibach HI, Rovee DT (eds) *Epidermal wound healing*. Year Book Medical Publishers, Chicago, pp 71–112