

Frühe Merkmale einer vitalen Reaktion— Untersuchungen an Schnittverletzungen der Rattenhaut*

Ekkehardt Böhm und Milko Tschomakov**

Institut für Rechtsmedizin der Universität München (BRD)

Eingegangen am 11. August 1972

Early Characteristics of a Vital Reaction — Examinations of Incised Wounds
in Rat Skin

Summary. Report about experimental incised wound examinations on rat -skin by Scanning Electron Microscope for diagnosis of early vital changes. We had distinct reactions after 5 sec corresponding to prior observations. Mainly we observed fibrin-agglutinations with enclosed erythrocyts in typical formation. We could not detect similar changes in control-examinations on rat skin after death. This suggests, that a distinct shortening for detection of early vital reactions in man can be expected.

Zusammenfassung. Bericht über experimentelle Untersuchungen an Rattenhaut mit einem Rasterelektronenmikroskop zur Frage der Diagnostizierbarkeit früher vitaler Veränderungen nach Schnittverletzungen. Erste deutliche Befunde waren — entsprechend früheren Gefäßuntersuchungen — bereits 5 sec nach der Gewebsläsion zu erheben. Sie traten besonders auf in Form von Fibrin niederschlägen mit Erythrocyteneinschlüssen in typischer Formation. In Kontrollversuchen an Rattenhaut nach dem Töten der Tiere konnten gleichartige Veränderungen nicht festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen auch für Schnittverletzungen der Menschenhaut eine drastische Verkürzung der Bestimmbarkeit der frühen vitalen Reaktion erwarten.

Key words: Vitale Reaktionen, unmittelbar nach Gewebsläsion — Rasterelektronenmikroskop, Diagnostizierbarkeit früher vitaler Veränderungen.

Einführung

Die forensisch-medizinische Bedeutung der Wundaltersbestimmung und des Vitalitätsbeweises einer Hautverletzung ist bekannt. Der Einbruch histochemischer und biochemischer Methoden in die Diagnostik der vitalen Reaktion erbrachte im letzten Jahrzehnt außerordentliche Fortschritte besonders hinsichtlich der Wundaltersbestimmung.

Früheste enzymhistochemische Befunde bei Hautwunden wurden nach 20 bis 30 min (nach der Läsion) beobachtet (Pioch; Raekallio). Die Schwierigkeit besteht jedoch u. a. darin, daß die einzelnen Autoren keine Einigkeit über den Zeitpunkt des Auftretens der ersten Enzymreaktionen erzielen konnten.

Frühere Reaktionen zeigten sich als Ergebnisse biochemischer Untersuchungen von Hautläsionen (Berg *et al.*; Fazekas; Raekallio; Jarecki *et al.*). Beginnende bio-

* Herrn Prof. Dr. med. B. Mueller zum 75. Geburtstag gewidmet.

** Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereich 51 (Medizinische Molekularbiologie und Biochemie).

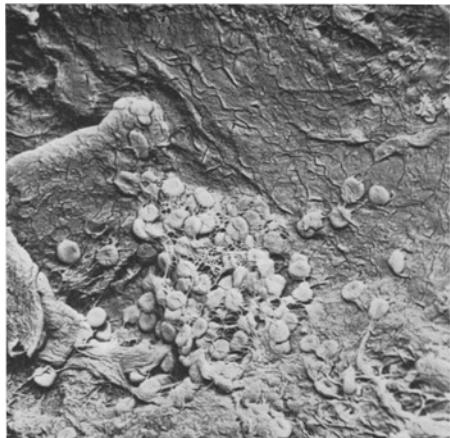


Abb. 1



Abb. 2

Abb. 1. 5 sec-Präparat: Inselförmige Agglomeration von Fibrin und Erythrocyten mit einzelnen Thrombocyten. Fibrinnetze noch locker, Fibrinfäden vielfach zart, deutliche Bündelung der Fibrinfasern. Vergrößerung 1000 \times

Abb. 2. 5 sec-Präparat: Detailvergrößerung aus Abb. 1: Deutlicheres Hervortreten der Fibrin-Komposition mit eingeschlossenen Erythrocyten. Die lockere Komposition des Gerinnsels ist deutlich zu erkennen. Vergrößerung: 5000 \times

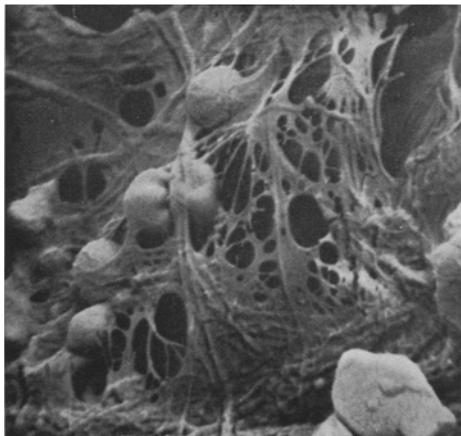


Abb. 3



Abb. 4

Abb. 3. 1 min-Präparat: Dickere Fibrinfäden, stärkere Bündelung der Fasern, Erythrocyten vereinzelt deformiert, dichtere Maschenstruktur der Fibrinnetze. Vergrößerung: 5000 \times

Abb. 4. 1 min-Präparat: Protrusionen der Erythrocytenoberfläche in diesem Bildausschnitt vermehrt, plattenförmige Fibrinbildung in der rechten unteren Bildregion. Vergrößerung: 1800 \times

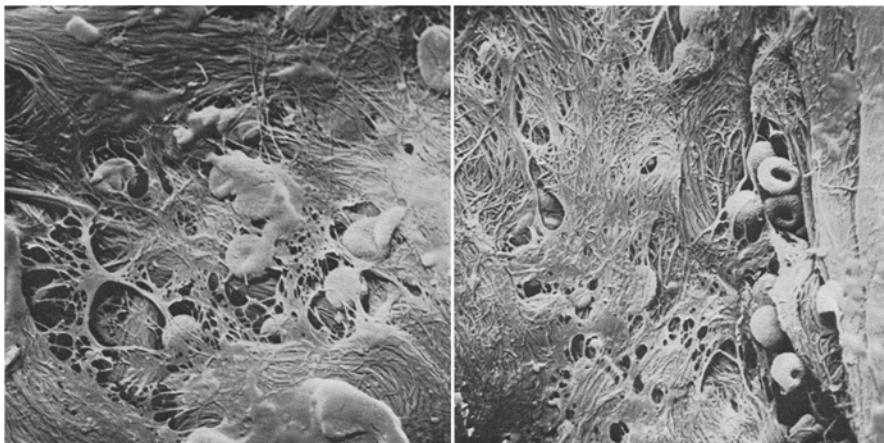


Abb. 5

Abb. 6

Abb. 5. 5 min-Präparat: Weitere Verdichtung der Netzstruktur des Fibrins, fast völlige Bedeckung der Wundfläche mit einer Fibrinapete. Vergrößerung: 2200 \times

Abb. 6. 5 min-Präparat: Fibrinapete mit eingeschlossenen Erythrocyten. Fibrinfasern zu dicken Strängen und flächenhaften Belägen verklebt. Neben der Fibrin/Erythrocyten-Abdichtung der primären Wundfläche einige freie nichtdeformierte Erythrocyten. Vergrößerung: 2200 \times

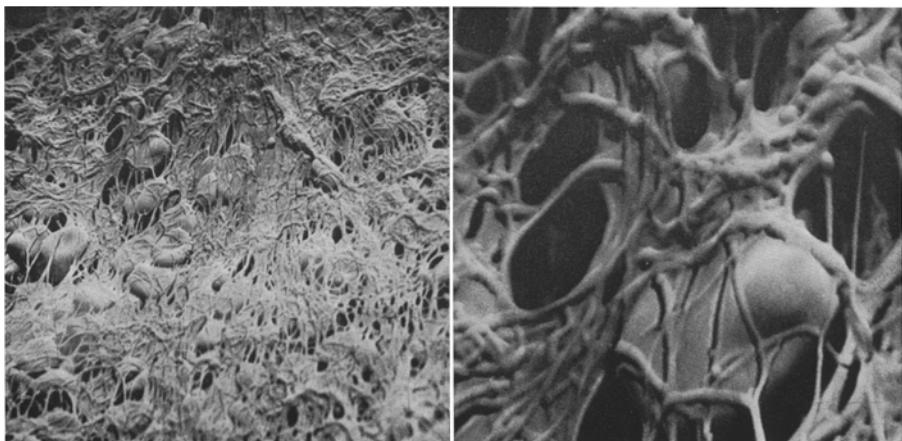


Abb. 7

Abb. 8

Abb. 7. 15 min-Präparat: Stark verdichtete Fibrin-Netzstruktur. Netzmaschenwerk sehr fein bzw. eng, kurzläufige Verknüpfungen der Fibrinfasern. Vergrößerung: 2000 \times

Abb. 8. Detailausschnitt aus Abb. 7: Durch sehr zahlreiche Fibrinfasern gefesselter Erythrocyt, geflechtartige Struktur der Fibrinfaserbündel. Vgl. Abb. 2. Vergrößerung: 10000 \times



Abb. 9

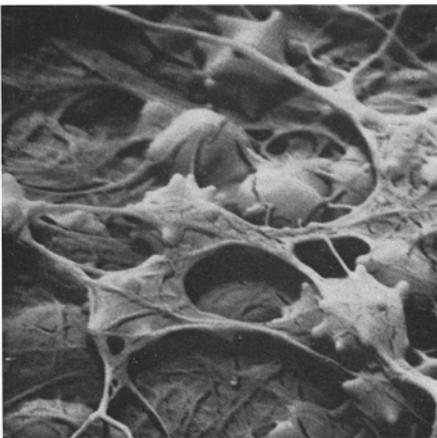


Abb. 10

Abb. 9. 30 min-Präparat: Stärkeres Hervortreten von Lückenbildungen in der die Erythrocyten bedeckenden Fibrinschicht, zeltdachähnliche Fibrinstrukturen als Deckschicht. Vergrößerung: $2000 \times$

Abb. 10. 30 min-Präparat: Doppelschichtstruktur des Fibrins. Neben einer zeltdachartigen, von Fibrinfäden durchzogenen Deckschicht über stechapgelförmig deformierten Erythrocyten ist eine basale Fibrinschicht zu erkennen, der die Erythrocyten aufliegen. Vergrößerung: $5000 \times$

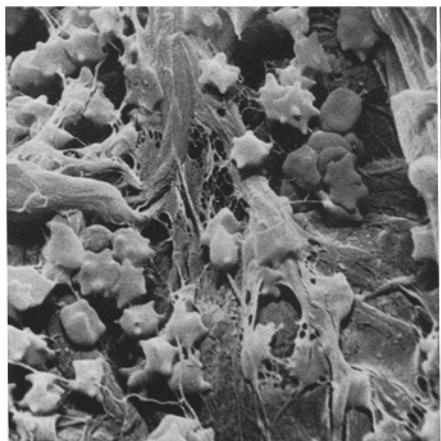


Abb. 11

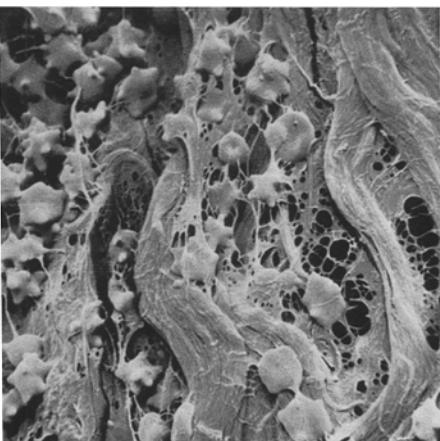


Abb. 12

Abb. 11. 60 min-Präparat: Verstärktes Auftreten von Stechapgelformen der Erythrocyten, großflächige Fibrinschichtenbildung unter weitgehendem Verschwinden der Faserstruktur des Fibrins, plattenförmige Fibrin/Erythrocyten-Aggomerationen. Vergrößerung: $2200 \times$

Abb. 12. Anderer Bezirk eines 60 min-Präparates: Fibrinfaserstruktur hier deutlicher zu erkennen als in Abb. 11. Der Fibrinbelag bedeckt die Bindegewebsfaserbündel filmartig. Neben stechapgelförmigen rundlichen abgeflachten polygonalen Erythrocyten. Vergrößerung $2200 \times$

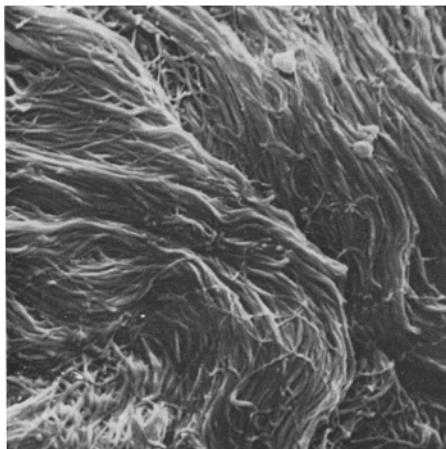


Abb. 13

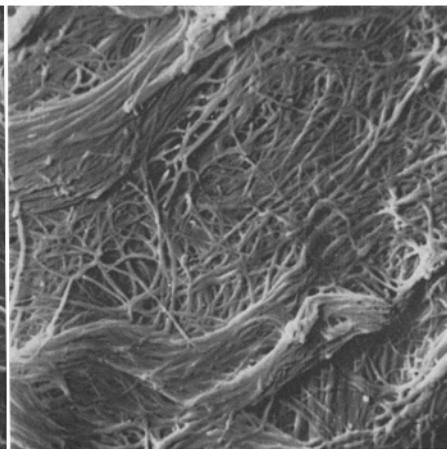


Abb. 14

Abb. 13. Postmortale Schnittverletzung der Rattenhaut nach kurzer Lagerungszeit. Deutliche Längsbündelung der Kollagenfasersysteme. Vergrößerung: 5000 ×

Abb. 14. Postmortale Schnittverletzung der Rattenhaut bei anderem Aufnahmewinkel als Abb. 13 und Auseinanderweichen der Faserverbände. Obwohl durch die präparationsbedingte (Schrumpfung bei Vorspannung) Verzerrung scheinbar quere Verlaufsrichtungen von Kollagenfasern vorkommen, sind eindeutige Strukturunterschiede zu den in den übrigen Abbildungen demonstrierten Fibrinfaserstrukturen leicht zu erkennen. Vergrößerung: 5000 ×

chemisch nachweisbare Veränderungen werden im allgemeinen auf einen Zeitraum von frühestens 2—5 min nach der Läsion gelegt.

Frühere eigene Untersuchungen an Stichverletzungen und Zerreißungen von Blutgefäßen ergaben wesentlich frühere reaktive Veränderungen am Gefäßendothel in Form von Fibrin-Thrombocyten- und Erythrocytenabscheidungen als früheste bisher in der Literatur beschriebene Zeichen einer vitalen Reaktion. Diese Ergebnisse veranlaßten uns zu Untersuchungen von Hautverletzungen unter Anwendung der gleichen Untersuchungsmethodik.

Die Frage der agonalen bzw. supravitalen Reaktion wurde aus mehreren Gründen zunächst nicht verfolgt.

Material und Methode

Die Haut von mit Äther narkotisierten Albinoratten wurde mit einem Rasierapparat enthaart, gesäubert und mit Rasierklingen eingeschnitten. Die Schnittführung erfolgte einerseits flach tangential (1. Versuchsserie), andererseits in einem Winkel von ca. 45° zur Hautoberfläche bis tief in das subctane Gewebe. Die Probenentnahme erfolgte nach folgenden Zeiten: 5 sec, 1, 5, 15, 30 und 60 min. Der Excisionsvorgang selbst erforderte bis zur Spülung mit Natriumcitratlösung weniger als 1 sec, so daß dieser Zeitraum vernachlässigt werden kann. Eine Spülung mit Natriumcitratlösung kann auch ohne weiteres bereits *in situ* vor der Excision erfolgen. Die excidierten Hautstückchen wurden sofort in 3,5%iger Natriumcitrat- und in physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit Nickelnadeln auf Kork scheiben aufgespannt. Die anschließende Fixierung erfolgte in 3,25%iger gepufferter Glutaraldehydlösung (Phosphatpuffer pH 7,2). Die Dehydrierung wurde mit Aceton durchgeführt (50%/100%). Probenmontage, Bedämpfung und Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop (Stereoscan/ Cambridge) erfolgten in üblicher Weise.

Die *Kontrollversuche* (Blindversuche) wurden prinzipiell bei gleicher Präparations- und Untersuchungstechnik durchgeführt. Die Schnittführung erfolgte nach Veräthern der Tiere sofort nach dem Herzstillstand (Thoraxeröffnung), die Entnahme der Präparate erfolgte 5 sec, 5, 30 und 60 min nach Setzung der Läsion.

Zuletzt wurde noch versucht, die bereits mit dem Rasterelektronenmikroskop vorunter-suchten Präparate der vitalen Untersuchungsserie mit einer Rasierklinge nachzuschneiden, um eine Darstellung der Gefäßintima mittelkalibriger Blutgefäße zu erzielen. Die „Nach-schnitte“ wurden in ca. 1 mm Abstand zu den vitalen Schnitten in gleichem Schnittwinkel und zur vitalen Schnittebene parallelem Verlauf angelegt. Die Darstellung von Gefäßinnen-flächen war mit diesem Verfahren zu erreichen, eine bessere Anschnittstechnik erschien uns wünschenswert.

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den von uns an Gefäßbeinstichstellen erhobenen Be-funde fanden wir früheste Veränderungen der Hautschnittflächen bereits 5 sec nach der Schnittführung. Im Gegensatz zu den früheren Befunden standen die Thrombocyten in der ganzen Versuchsserie nie im Vordergrund des Geschehens im Wundbett*. Die dominierende Rolle spielten Fibrin niederschläge und Erythrocyten. Die Fibrin niederschläge waren im 5 sec-Präparat zunächst mehr insel-förmig, teilweise auch in Form fädiger, sehr weitmaschiger netzartiger Strukturen zu finden. Übereinstimmung hinsichtlich der Gefäßbefunde bestand auch in der Faserbündelung des Fibrins über gefesselten Erythrocyten in den insel förmigen Niederschlagszonen. Im weiteren Verlauf der reaktiven Wundflächenveränderun-gen waren besonders markant: zunehmend dichtere Bündelung der Fibrinfäden, forschreitende Bedeckung der Wundfläche mit immer dichteren Fibrinnetzen unter Einschluß von Erythrocyten bis zur Ausbildung einer zusammenhängenden Fibrin tapete. Eine hämostyptische und abdichtende Wirkung kommt dabei offensichtlich auch in der ersten Phase der Wundreaktion den Erythrocyten zu, die — durch eine dichte Netzsicht aus Fibrin fixiert — zu einer ersten Ab-deckung der Wundfläche führen. In der zweiten Phase (zwischen 15 und 30 min) fanden wir stechpolförmige Erythrocytenformen gehäuft. In dieser Phase tritt offensichtlich die Retraktion der Fibringerinnse in den Vordergrund. Der tapeten-förmige Belag wird einerseits von Lückenbildungen unterbrochen, andererseits finden sich weitgehend homogene Beläge, z. B. auf den Bindegewebsfasern, die jedoch teilweise eine der Fibrinvernetzung entsprechende angedeutete Eigen-struktur besitzen (30 min-Präparat). In den zuvor beschriebenen Lücken lassen sich 2 Fibrinlagen differenzieren: eine basale, der Unterlage (Bindegewebe) auf-liegende Schicht mit deutlicher Bündelung der Fibrinfasern und eine oberfläch-liche, die deformierten Erythrocyten bedeckende Schicht. Diese Schicht zeigt viel-fach ein zeltdachförmiges Aussehen, wobei der Morphologie nach die Fibrinfaser-bündel zu plattenartigen, weitgehend homogenen Abdeckungen verschmolzen sind. Im 60 min-Präparat treten die Fibrinfasern noch mehr auseinander, sie er-scheinen dünner, glatter, die Netze weiter, homogen, die Lücken vielfach wie aus einer Folie ausgestanzte Löcher. Die Erythrocyten nehmen — soweit noch morphologisch zu differenzieren — eine polygonale Gestalt an, sind stark ab-geflacht und teilweise noch in zeltdachartigen Fibrinformationen inkorporiert.

* Neueste Ergebnisse von Serienuntersuchungen im 1-3-5-Sekundenbereich bei gleicher Untersuchungstechnik (Böhm und Thilo 1972/73) machen jedoch eine wesentliche Bedeutung der Thrombocyten auch in der frühesten Phase der extravasalen Hämostase wahrscheinlich.

Diskussion

Die vorliegenden Befunde bzw. Ergebnisse sind unserer Meinung nach eindeutig von postmortalen Veränderungen zu differenzieren. Trotzdem halten wir eine präparative Freilegung der subcutanen Blutgefäße noch für wünschenswert, da hiermit eine zusätzliche Absicherung der Befunde vor allem in den frühesten Stadien (Sekundenphänomen) möglich werden dürfte. Dabei spielt nicht nur das Fibrin eine Rolle, sondern die an Endothelläsionen gefundenen Thrombocytenansammlungen, die wir für diagnostisch besonders wertvoll gerade in den Frühstadien halten. Es erscheint uns schon aus theoretischen Gründen unwahrscheinlich, daß sich postmortal oder agonal die beschriebenen Fibrintapeten mit eindeutigem Bezug zur Wundfläche bzw. den kollagenen Fasern des Hautbindegewebes noch ausbilden könnten, abgesehen davon, daß wir in den Kontrollversuchen keine gleichartigen Beobachtungen machen konnten. Voraussetzung für die Diagnose der Vitalität von Hautschnittwunden mit der hier demonstrierten Methode ist jedoch vorläufig noch eine durch die Wundsetzung bzw. Läsion bedingte Eröffnung von Hautgefäßen mittleren Kalibers — Schürfungen mit Capillarläsionen reichen nach den bisherigen Befunden für eine Diagnose nicht aus. Es ist zu erwarten, daß sich auch hier präparativ noch ein Weg finden läßt, der zu eindeutigen Befunden führt.

Das hier gewählte Modell — nämlich Haut — steht prinzipiell selbstverständlich auch für traumatische Läsionen innerer Organe. Die oben gemachten Einschränkungen gelten wahrscheinlich dort ebenso. Weitere Untersuchungsserien — auch an Sektionsmaterial — werden uns Aufschluß darüber geben, ob sich die beschriebene Methodik generell zur sicheren Diagnose auch frühester vitaler Läsionen von Geweben und Organen eignet. Nach den bisher vorliegenden Befunden ist auch eine grobe zeitliche Abschätzung in der ersten Stunde nach Setzung einer Läsion möglich („Wund“-Altersbestimmung). Besonders hervorheben möchten wir noch, daß hier erstmalig früheste reaktive Wundveränderungen demonstriert wurden, die mit keiner anderen Methode in dieser Eindeutigkeit bisher zu erzielen waren.

Besonders betont sei noch, daß die mit der dargelegten Methode erzielten Befunde nicht mit lichtmikroskopischen Fibrinbefunden vergleichbar sind. Durch die unterschiedliche Präparationstechnik vor Durchführung der Fixierung kommt postmortal entstandenes Fibrin wahrscheinlich deshalb nicht zur Darstellung, weil die Verankerung der Fibrinfasern (postmortal) am Kollagen nicht erfolgt, so daß bei Spülung mit Natriumcitratlösung eine völlige Auswaschung erfolgt. Vital entstandenes Fibrin bleibt am Ort der Entstehung fixiert. Die Identifikation des fädigen und netzförmigen Materials als Fibrin war auf Grund der Strukturvermaschung und Vergleich der Struktur mit Fibrin aus In vitro-Versuchen sowie den Befunden anderer Untersucher (auch im Durchstrahlungselektronenmikroskop) möglich. Die Differenzierung gegenüber Hautkollagen war vor allem auf Grund der Quervernetzung der Fibrinfasern eindeutig durchführbar.

Literatur

- Berg, St.: Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. Z. Rechtsmedizin **70**, 121 (1972).
 Berg, St., Ditt, J., Friedrich, D., Bonte, W.: Möglichkeiten der biochemischen Wundaltersbestimmung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **63**, 183 (1968).

- Berg, St., Ditt, J., Kunze, P.: Beziehungen zwischen Histamingehalt und Aktivität der Histidin-decarboxylase im Bereich von Hautverletzungen. *Z. Rechtsmedizin* **69**, 26 (1971).
- Böhm, E., Tschomakov, M.: Ein Sekundenphänomen der vitalen Reaktion, demonstriert an Stichverletzungen von Arterien. *Z. Rechtsmedizin* (im Druck).
- Fazekas, I. Gy., Viragos-Kis, E.: Der Gehalt der Erhängungsfurche an freiem Histamin als vitale Reaktion. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **56**, 250 (1965).
- Frost, H.: Untersuchungen der arteriellen Gefäßinnenfläche mit dem Rasterelektronenmikroskop. Generalisierte intravasculäre Gerinnung, S. 105. Stuttgart: Schattauer 1971.
- Frost, H., Hess, H.: Zur Pathogenese der arteriellen Verschlußkrankheiten (II). *Klin. Wschr.* **47**, 245 (1969).
- Frost, H., Hess, H., Richter, I.: Zur Pathogenese der arteriellen Verschlußkrankheiten. *D. Klin. Wschr.* **20**, 1099 (1968).
- Jarecki, R., Pogacar, P., Günther, G., Klein, H.: Early enzyme changes in skin wounds demonstrated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Z. Rechtsmedizin* **67**, 313 (1970).
- Ludwig, H., Metzger, H.: Das uterine Plazentabett post partum im Rasterelektronenmikroskop, zugleich ein Beitrag zur extravasalen Fibrinbildung. *Arch. Gynäk.* **210**, 251 (1971).
- Ludwig, H.: Ultrastruktur des muralen Thrombus in Uterusvenen. *Phlebologie und Proktologie* **1**, 1 (1972).
- Raekallio, I., Levonen, E.: The appearance of esterases in rat skin wounds. *Ann. Med. exp. Fenn.* **41** (1963).
- Raekallio, I.: Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden mit enzymhistochemischen Methoden. Lübeck: Schmidt-Römhild 1965.
- Raekallio, I.: Enzyme histochemistry of wound healing. (Progr. Histochem. Cytochem. Edit.: W. Graumann, Z. Sojda, A. G. E. Pearse and T. H. Schiebler, Vol. 1, No. 2.) Stuttgart-Portland: Fischer 1970.
- Raekallio, I.: Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods. *Forens. Sci.* **1**, 3—16 (1972).
- Pioch, W.: Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden und ihre Bedeutung für die forensische Praxis. Lübeck: Schmidt-Römhild 1966.
- Pioch, W.: Epidermale Esteraseaktivität als Beweis der vitalen Einwirkung von stumpfer Gewalt. *Beitr. gerichtl. Med.* **25**, 136—145 (1969).

Dr. med. E. Böhm
Institut für Gerichtliche Medizin
D-5100 Aachen, Lochnerstraße 4-20
Bundesrepublik Deutschland