

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
des Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

**Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren:
Nutzbarkeit für Wundaltersschätzung und Prü-
fung der Wundvitalität unter forensischen Frage-
stellungen?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anouk Niedecker

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Ritz-Timme

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Für Jule.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Niedecker, A., Huhn, R., Ritz-Timme, St., Mayer, F. (2021), Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples, *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02563-6>

Zusammenfassung

Die Wundaltersschätzung spielt eine wichtige Rolle in der forensischen Routinearbeit und ist bis heute aufgrund ihrer Komplexität eines der zentralen Felder der forensischen Forschung. Bis jetzt konnte kein universell einsetzbarer und verlässlicher Marker, bzw. ein entsprechendes Markerset, für die forensische Wundaltersschätzung etabliert werden. Neben der Beurteilung des Wundalters gilt es auch, die Wundvitalität zu bestimmen – also zu untersuchen, ob eine Wunde vor oder nach dem Tod zugefügt wurde.

Untersuchungen der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9, sowie deren Inhibitor TIMP-1 zeigten u.a. einen vermehrten Nachweis der Marker in mechanisch verletztem Herzmuskelgewebe. Vor diesem Hintergrund widmet sich diese Studie den Markern MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 hinsichtlich ihres Potentials für die Wundaltersschätzung. Ein umfangreiches Kollektiv aus verletzten Skelett- und Herzmuskelproben aus humanen Obduktionsasservaten wurde immunhistochemisch auf die Marker MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 untersucht. Um den Anforderungen an die Etablierung neuer Marker möglichst gerecht zu werden, kam neben der Untersuchung von humanen Proben (Verletzungen mit definierten Wundaltern) auch ein Tiermodell (perfundierte Rattenherzens an der Langendorff-Anlage) zum Einsatz, das Generierung von Verletzungen mit definierten Wundalter erlaubte.

Die Ergebnisse aller drei Marker stellten sich sehr inhomogen dar, sodass MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 nicht als Marker der Wundaltersschätzung geeignet sind. Lediglich die Resultate für TIMP-1 lassen vermuten, dass TIMP-1 möglicherweise zwischen vital zugefügten und postmortal entstandenen Wunden unterscheiden kann. Darüber hinaus zeigt die Studie die Notwendigkeit auf, mögliche Marker für die forensische Wundaltersschätzung und die Wundvitalität unter Berücksichtigung eines adäquaten Probenkollektivs weiter zu untersuchen.

Abstract

Estimating the age of a wound is a central aspect of forensic daily work. Yet, wound age estimation still is one of the main fields of forensic research due to its complexity. Next to estimating the age of a wound, determining the vitality of a wound, meaning evaluating whether a wound was inflicted before or after the individual's death, plays a central role in the fields of forensic.

Even though wound age and wound vitality are the subjects of numerous studies over the last decades, no marker or marker set has yet been found that is unrestrictedly reliable.

A recent study on the markers matrixmetalloproteinases 2 and 9 and their inhibitor TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases) in myocardial infarctions detected these markers not only in the regions of infarction, but also in myocardium which was wounded due to vessel ligatures and positioning of ECG electrodes. Thus, the study at hand focusses on investigating upon whether MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 could prospectively be of use for wound age estimation. For this, an extensive collective of human tissue samples from wounded heart muscle and skeletal muscle drawn from autopsies was gathered. For each sample wound age was estimated with the help of HE staining (Hematoxylin & Eosin) before immunohistochemical staining for each marker. In addition, an animal model was used: the isolated perfused Langendorff rat heart. This approach enabled to generate vital and postmortem inflicted wounds with a defined wound age. Moreover, by combining both methods examination of the transferability of the results was possible.

The results of our study were very inhomogeneous, showing major scattering for all three markers. In conclusion, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 might not be suitable for estimating the age of a wound. However, the results for TIMP-1 lead to the insinuation that TIMP-1 might be helpful to distinguish between vital and postmortem inflicted wounds in the future. With the help of a broad approach and a larger number of samples, this study also highlights some of the problems forensic research groups are facing when examining possible markers or marker sets of wound age and/ or wound vitality.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
et al.	et alii, et aliae, et alia
EZM	Extrazelluläre Matrix
IL-...	Interleukin
Kap.	Kapitel
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
No.	Nummer
S.	Seite
TF	<i>Tissue</i> Faktor
TGF-...	<i>Tumor Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases</i>
TNF-...	Tumornekrosefaktor
Vol.	<i>Volume</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Einführung</i>	1
1.2	<i>Die Wundheilung</i>	1
1.3	<i>Die forensische Wundaltersschätzung</i>	3
1.4	<i>Die Wundvitalität</i>	5
1.5	<i>Die Matrixmetalloproteinase</i>	7
1.6	<i>Die Tissue-Inhibitors of Matrixmetalloproteinases</i>	8
1.7	<i>Zusammenspiel der MMPs und TIMPs während der Wundheilung</i>	9
1.8	<i>Das Langendorff Modell</i>	10
1.9	<i>Ziele der Arbeit</i>	11
2	<i>Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples, Niedecker A., Huhn R., Ritz-Timme St., Mayer F., International Journal of Legal Medicine 2021, Springer Verlag</i>	13
3	Diskussion	14
3.1	<i>Die Problematik der forensischen Wundaltersschätzung</i>	14
3.2	<i>MMPs und TIMPs als mögliche Marker für die forensische Wundaltersschätzung</i> ... 14	
3.2.1	Vergleich der Ergebnisse nach Gewebeart.....	16
3.2.2	Vergleich zwischen tierexperimentell gewonnenen und humanen Probenmaterial 17	
3.3	<i>Die Ergebnisse im Kontext der Frage der Wundvitalität</i>	19
3.4	<i>Limitationen der Studie</i>	21
3.5	<i>Schlussfolgerungen</i>	22
4	Literatur- und Quellenverzeichnis	24
5	Anhang	33

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Wundaltersschätzung spielt eine wichtige Rolle in der rechtsmedizinischen Routinearbeit und ist bis heute eines der zentralen Felder der forensischen Forschung. Sie dient der Rekonstruktion und Beurteilung der zeitlichen Abfolge von Verletzungen. Das Alter einer oder mehrerer Wunden kann wichtige Hinweise auf die Frage geben, ob Verletzungsbilder mit potentiellen Tathergängen korrelieren (1). Neben der Eingrenzung des Alters einer Wunde ist auch die Beurteilung der Wundvitalität in vielen Fällen von entscheidender Bedeutung. Es gilt zu beurteilen, ob eine Wunde vor Eintritt des Todes zugefügt wurde oder erst postmortal (2). Dies ist jedoch auch heute noch ein bislang nur teilweise gelöstes Problem der forensischen Wissenschaft (3).

Aus diesem Grund ist die Forschung auf dem Gebiet der forensischen Wundaltersschätzung auch in der jetzigen Zeit noch relevant und aktiv. Neben den makroskopisch beurteilbaren Befunden liegt das Hauptaugenmerk der Forschung heutzutage vor allem auf den mikroskopischen Gewebsveränderungen im Wundgebiet.

1.2 Die Wundheilung

Eine Verletzung stellt einen Kontinuitätsverlust des betroffenen Gewebes dar (4). Der menschliche Körper reagiert auf eine Verletzung mit komplexen Prozessen, um Blutungen zu stoppen, die Wunde zu schließen und Mikroorganismen innerhalb der entstandenen Wunde zu töten (5). Ziel ist die Reparatur des verletzten Gewebes (3). Die Prozesse der Wundheilung verlaufen zeitlich koordiniert und mittels Interaktion verschiedenster Zellen, Mediatoren und Bestandteilen der ext-

razellulären Matrix (EZM) ab (6, 7). Sie werden durch multiple Faktoren ausgelöst, beispielsweise bei mechanischer Verletzung des Gewebes durch scharfe oder stumpfe Gewalteinwirkung (8).

Wild und Auböck (9) teilten die Wundheilung in vier verschiedene Phasen ein, welche sich gegenseitig beeinflussen können: die Hämostase, die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Remodellierungsphase. Gosain und DiPietro (10) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis und unterteilten die Wundheilung in Hautwunden in die Phasen der Hämostase, der Inflammation, der Proliferation und der Resolution.

Bezogen auf Wild und Auböck (9) beginnt die Hämostase mit dem vorzeitigen Verschluss der Wunde und der Aktivierung der Gerinnungskaskade. Hierbei werden kaskadenartig und mit einigen Verstärkermechanismen Gerinnungsfaktoren – globuläre Proteine, die normalerweise zymogen, d.h. inaktiv vorliegen – in ihre aktive Form gebracht (11). Im Falle einer mechanischen Verletzung wird die Gerinnung exogen aktiviert und der *Tissue* Faktor (TF) freigesetzt. Im weiteren Verlauf werden unter anderem Faktor X und Faktor V aktiviert, die zusammen mit Calcium auf Phospholipidoberflächen einen Komplex bilden und schließlich die Thrombusbildung durch Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin induzieren (11).

Gleichzeitig werden Wachstumsfaktoren und Zytokine aus Thrombozyten freigesetzt, welche als Mediatoren der Wundheilung unter anderem zu einem Einwandern weiterer Zellen in die Wundregion führen (9). Nicht zuletzt durch Chemotaxis wird das Einwandern Entzündungszellen in die Wundregion induziert und somit die Entzündungsphase eingeleitet (9).

Die Entzündungsphase wird durch die Migration von Entzündungszellen, besonders neutrophiler Granulozyten, eingeleitet. Es folgt die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, sowie die Einwanderung von Lymphozyten in die Wunde (9, 12).

Die Proliferationsphase einige Tage nach Verletzung zeichnet sich durch die Bildung von Granulationsgewebe, sowie die Neubildung von Blutgefäßen aus (9). In der Remodellierungsphase, welche bis zu zwei Jahre andauern kann, erfolgt die Synthese von stabilem Kollagen und das Granulationsgewebe wird zu Narbengewebe umgewandelt (9).

Die Prozesse der Wundheilung unterliegen in ihrer Dauer und in ihrem Ablauf interindividuellen Schwankungen und sind von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. So ist die Wundheilung bei Rauchern oder Diabetes-Patienten, aber auch im hohen Lebensalter deutlich verlangsamt und erschwert (8). Auch bei verschiedenen Krankheiten, wie etwa Tuberkulose, kann es zur Chronifizierung einer Wunde kommen (8). Exogene Faktoren, wie etwa Medikamente, oder aber auch Abweichungen von der normalen Körpertemperatur in beide Richtungen, wirken sich ebenfalls auf die Wundheilung aus (13).

Daher gilt es, bei der Untersuchung von Wunden hinsichtlich ihres Alters und ihrer Vitalität, verschiedenste Faktoren zu bedenken: nicht nur die Art des verletzten Gewebes hat Einfluss auf die Wundheilung, sondern auch individuelle Faktoren, wie etwa bestehende Erkrankungen und das Alter einer Person (6).

1.3 Die forensische Wundaltersschätzung

Die forensische Wundaltersschätzung beruht unter anderem auf der histologischen Beurteilung einer Wunde und des Auftretens verschiedener Zellen und Marker im verletzten Gewebe (14).

Betz (15) gelang es bereits 1994, eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in Wundgebiete zwanzig bis dreißig Minuten nach Entstehung einer Läsion in Proben von humanen Hautwunden nachzuweisen. Kurz darauf gelang der Nachweis von Fibronectin nach etwa zehn bis zwanzig Minuten in histologischen Schnitten (13).

Madea (13) definiert drei Stadien für die Wundaltersbestimmung an Hautwunden: Die Phänomene der Vitalität bei einer Überlebenszeit von bis zu dreißig Minuten, die Phänomene der kurzen Überlebenszeit im Intervall dreißig Minuten bis vierundzwanzig Stunden (bspw. die Granulozyteninfiltration nach wenigen Stunden), sowie die Phänomene der längeren Überlebenszeit nach vierundzwanzig Stunden (13). Letzteres beinhaltet bspw. die Kollagenbildung ab einem Wundalter von etwa zwei bis drei Tagen (13). Betz (15) registrierte bei der Untersuchung von humanen Hautwunden eine vollständige Reepithelialisierung ab einer Überlebenszeit von etwa einundzwanzig Tagen.

Wie zuvor beschrieben, reagiert der Körper auf mechanische Verletzungen mit zeitlich aufeinander abgestimmten und ineinandergreifenden Reaktionen (10). Diese Reaktionen lassen sich konventionell-histologisch erst nach zwanzig bis dreißig Minuten Überlebenszeit durch die Migration der Granulozyten nachweisen (15). Die aktuelle Forschung im Gebiet der Wundheilung widmet sich daher dem Intervall vor der Reaktion der Granulozyten.

In den letzten Jahrhunderten konnten enorme Fortschritte auf dem Gebiet der Histochemie durch Weiterentwicklung und Verbesserung bestehender Techniken und nicht zuletzt durch die Immunhistochemie erzielt werden (16, 17, 18). Die Immunhistochemie ist von großer Bedeutung und verspricht in den letzten Jahren Fortschritte auf zahlreichen Gebieten der forensischen Forschung (6). Sowohl Grellner et al. (19) als auch Casse et al. (20) kamen unabhängig voneinander zu dem Ergebnis, dass die Immunhistochemie die zuverlässigste Untersuchungsmethode darstelle und für die forensische Wundaltersschätzung weiterhin als Methode der Wahl zu werten ist.

Immunhistochemische Marker könnten das Intervall bis zur Migration der Granulozyten schließen (2). In mehreren Studien gelang zudem mittels Enzymhistochemie der Nachweis von erhöhten Serotonin- und Histaminkonzentrationen in Wunden mit unterschiedlichen Wundaltern (3). Außerdem zeigen sich immunhistochemisch bereits nach wenigen Minuten TGF-beta1, nach etwa zehn bis zwanzig Minuten auch TGF-alpha, IL-1 beta, TNF-alpha und IL-6 (13). Wie zuvor beschrieben, konnte durch Weiterentwicklung bekannter Methoden und auch durch die Einführung neuer Untersuchungsmethoden bereits einige Fortschritte auf dem Forschungsgebiet der forensischen Wundaltersschätzung erzielt werden (6). Wie bereits Cecchi et al. (6) in ihrem Review zur Wundaltersdiagnostik aufführten, hat die ausgewählte Methodik einer Studie Einfluss auf deren *Outcome*. So scheint es, dass sich das früheste beobachtete Auftreten der untersuchten Marker bei immunhistochemischen Untersuchungen von dem frühesten Auftreten in anderen Untersuchungsmethoden unterscheidet (6).

Trotz der Fortschritte auf dem Forschungsgebiet der forensischen Wundaltersschätzung, gestaltet es sich weiterhin schwierig, zuverlässige und universell nutzbare Marker zu finden. Zwar wurden bisher bereits zahlreiche potentielle und

vielversprechende Marker für die forensische Wundaltersschätzung untersucht, anhand derer Rückschlüsse auf die Chronologie der Prozesse der Wundheilung möglich waren. Allerdings unterliegen diese Marker zahlreichen externen und internen Einflussfaktoren. Aus diesem Grund stellt die forensische Wundaltersschätzung auch heute noch aufgrund ihrer Komplexität eine Herausforderung der forensischen Forschung dar. Unzureichende Spezifität, die Limitationen der Technik und die limitierte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zählen zu den Faktoren, die laut Li et al. (21) die Etablierung geeigneter Marker für die forensische Wundaltersschätzung erschweren. Die Arbeitsgruppe um Casse et al. (20) kam zu demselben Ergebnis und leitete daraus ab, dass sich zukünftige Studien für eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse vielen Herausforderungen (adäquate Probenanzahl, Kontrollen, unabhängige Untersucher) stellen müssen und dass die kombinierte Untersuchung verschiedener Marker womöglich aufschlussreich sein könnte. Darüber hinaus kamen Li et al. (21) zu dem Schluss, dass die Forschung zur forensischen Wundaltersschätzung sich nicht zuletzt problematisch gestaltet, da die Verfügbarkeit von humanen Wundproben mit einem bekannten Todeszeitpunkt sehr gering sei.

Eine weitere Problematik ist, dass sich die Datengrundlage auf dem Gebiet der forensischen Wundaltersschätzung und Wundvitalität zurzeit hauptsächlich auf Untersuchungen von menschlichen Hautpräparaten bezieht. Die hierdurch gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf Proben anderer Gewebearten übertragen, sodass potentielle Marker auch in anderen Gewebearten untersucht werden sollten.

Es ist daher notwendig, weitere Untersuchungen von bereits bekannten Markern, aber auch zu neuen, vielversprechenden Markern in unterschiedlichsten Gewebearten durchzuführen.

1.4 Die Wundvitalität

Der Begriff der Vitalität einer Wunde wurde unter anderem von Walcher (22) geprägt, welcher vitale Reaktionen zunächst als „[...] Reaktionen lebenden tierischen oder menschlichen Gewebes auf Reize bzw. Verletzungen irgendwelcher

Art“ beschrieb. Vitale Reaktionen sind demnach nur in zu Lebzeiten zugefügten Wunden, nicht jedoch bei postmortal entstandenen Verletzungen nachweisbar (3) und sind daher ein Beweis für eine erhaltene Funktionalität des Gewebes bei Wundsetzung (23). Ihre Komplexität macht es auch heute noch schwierig die Prozesse der Wundvitalität vollständig zu verstehen und damit letztlich auch Aussagen über die Vitalität einer Wunde zu treffen (3).

Madea et al. (23) zufolge lassen sich vitale Reaktionen in verschiedene Kategorien unterteilen: Vitale Reaktionen, vitale Prozesse und vitale Zeichen. Während vitale Reaktionen lokale Reaktionen des verletzten Gewebes darstellen, bilden vitale Prozesse die Reaktionen des Gesamtorganismus‘ ab (23). Vitale Zeichen hingegen lassen sich nur bei erhaltener Funktionalität des Organismus‘ abgrenzen und umfassen daher Befunde, welche auf eine Bildung im lebenden Gewebe hinweisen (24, 13).

Bereits in den 1960er Jahren führte Raekallio Studien zur Wundvitalität durch und untersuchte unterschiedliche Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität in vitalen Hautwunden (3, 25). Hierbei gelang es ihm, die Wundzone in eine zentrale und eine periphere Zone zu unterteilen: Die zentrale Zone lokalisierte Raekallio am Wundrand einer vitalen Wunde und definierte sie durch eine abnehmende Enzymaktivität innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden nach Wundsetzung (25). Dies bezeichnete Raekallio als negative vitale Reaktion (25). Die periphere Zone hingegen zeichnet sich durch eine zunehmende Enzymaktivität nach etwa einer Stunde aus, was Raekallio als positive vitale Reaktion benannte (25). Somit reflektiere die zentrale Zone die einsetzende Nekrose, während die periphere Zone die aktive Reparatur des Gewebes widerspiegele (3).

Oehmichen (24) zufolge sollten für die Beurteilung der Wundvitalität folgende Punkte untersucht und differenziert werden:

- 1) morphologische und biochemische Phänomene
- 2) Evaluation in Hinblick auf das postmortale Intervall und auf die verschiedenen Umgebungstemperaturen
- 3) Die Abgrenzung von agonalen und supravitalen Veränderungen von vitalen Reaktionen

Nach Einsetzen eines Kreislaufstillstandes beginnt die sogenannte Supravitalphase (26). Verschiedene Gewebe- und Zellarten können jeweils einen bestimmten Zeitraum lang unter Ischämiebedingungen überleben, d.h. sie sind imstande auch nach einem irreversiblen Kreislaufstillstand ihre Funktion für eine gewisse Zeit aufrecht zu erhalten und unter anaeroben Bedingungen Stoffwechselprozesse ablaufen zu lassen, sogenannte supravitale Reaktionen (26). Mediatoren, die im Rahmen supravitaler Reaktionen eine Rolle spielen müssen jedoch unbedingt von Markern der Vitalität abgegrenzt werden.

Für die Arbeit in der Rechtsmedizin ist es daher wichtig, dass unterschieden werden kann, ob eine Vitalreaktion vorliegt oder ob es sich um postmortale oder supravitale Veränderungen handelt (3).

1.5 Die Matrixmetalloproteinasen

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) ist eine Gruppe von fünfundzwanzig Enzymen, die ein Zinkion an ihrer katalytischen Seite tragen. Ihre Endopeptidase-Funktion richtet sich primär auf den Abbau der EZM und ihrer Bestandteile (5). Zahlreiche Studien sprachen den Matrixmetalloproteinasen zudem eine wichtige Rolle im Prozess des *Remodeling* bei der Wundheilung zu (bspw. 27, 28).

Matrixmetalloproteinasen lassen sich in mehrere Subgruppen einteilen, deren Spezifität sich insgesamt jedoch hauptsächlich auf die Komponenten der EZM richtet (29). Sie werden von verschiedenen inflammatorischen Zellen gebildet und liegen in proaktiver Form vor. Ihre Expression kann auch in Form einer Signalantwort durch bspw. Wachstumsfaktoren induziert werden (30). Die Expression von Matrixmetalloproteinase 2 und auch 9 erfolgt unter anderem in Herzmuskelzellen (31).

Eine Subgruppe der Matrixmetalloproteinasen stellen die Gelatinasen dar; eine Gruppe aus zwei Enzymen. Gelatinase A - oder auch MMP-2 - ist im Gegensatz zu Gelatinase B - oder auch MMP-9 - molekular kleiner und wird vor allem durch Fibroblasten gebildet (29). Gelatinasen können auch Kollagen spalten, jedoch nur, wenn zuvor die Tripelhelixstruktur des Kollagens durchbrochen wurde und

so Gelatin entsteht (29). Beide Gelatinasen wurden in erhöhter Konzentration bei Mastektomie- und Myoplastiewunden gefunden und scheinen im Prozess der Wundheilung wichtige Aufgaben zu übernehmen: MMP-2-Level waren hierbei während des Wundheilungsprozesses stabil, während die höchste Konzentration von MMP-9 zwischen dem zweiten und vierten Tag registriert wurde (29). Auch konnten aktives MMP-2 und MMP-9 in erhöhter Konzentration in chronischen Wunden nachgewiesen werden, wobei die Level von MMP-9 deutlich über denen von MMP-2 lagen (32).

Neben der Degradation von Kollagen, konnte zudem nachgewiesen werden, dass Matrixmetalloproteinasen unter anderem auch für die Degradation von Fibronectin – einem wichtigen Glykoprotein der EZM – zuständig sind (33).

Beide Gelatinasen gelten als Marker der frühen Wundheilung. MMP-2 ist darüber hinaus auch in unverletzter Haut zu finden und hält hier die Kollagenhomöostase aufrecht (34). Sowohl MMP-2, als auch MMP-9 konnten in Untersuchungen von Magenkarzinomen mit Prozessen der Angiogenese und der Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (35).

Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen wird über verschiedenste Wege reguliert, unter anderem auf genetischer und molekularer Ebene (29). Die wichtigste und primäre Regulation erfolgt jedoch durch die spezifischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, die *Tissue-Inhibitor of Matrixmetalloproteinases* (29).

1.6 Die *Tissue-Inhibitors of Matrixmetalloproteinases*

Die *Tissue-Inhibitors of Matrixmetalloproteinases* – kurz TIMPs – sind eine Gruppe von vier Enzymen, die spezifisch die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen regulieren (36). Dies geschieht durch Interaktion mit der katalytischen Region der MMPs und Bildung eines stabilen Komplexes, welcher wiederum weniger aktiv gegen die EZM und ihre Bestandteile vorgeht (29). Dementsprechend können TIMPs durch Bindung von MMPs deren Aktivität unterbinden und so unter anderem die MMP-abhängige Zellmigration und die *Remodeling*-Prozesse im Gewebe regulieren (37). Hierbei zeigen einzelne TIMPs spezifische Affinitäten zu verschiedenen MMPs: bspw. weist TIMP-1 eine hohe Affinität zu MMP-1 und MMP-

9 auf, wohingegen TIMP-2 hochaffin MMP-2 bindet (38). TIMPs fungieren als Signalmoleküle und beeinflussen unabhängig von ihrer Inhibition der MMPs zahlreiche biologische Prozesse (39). So begünstigt TIMP-1 das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung, während einige Studien einen suppressiven Effekt von TIMP-1 auf die Apoptose, die Angiogenese und das Tumorwachstum nachweisen konnten (39, 40).

Vaalamo et al. (41) zufolge erfolgt eine Regulation von TIMP-1 temporär und ortsbezogen während Wundheilungsprozessen in der Haut. Der Arbeitsgruppe gelang der Nachweis von TIMP-1 mRNA in proliferativem Epithel in drei bis fünf Tage alten, normal heilenden Wunden (41).

1.7 Zusammenspiel der MMPs und TIMPs während der Wundheilung

Das Zusammenspiel aus MMPs und TIMPs scheint eine zentrale Rolle in Phasen der Wundheilung, aber auch bei der Entstehung einiger Krankheiten zu spielen. In chronischen Wunden konnte die Arbeitsgruppe um Armstrong und Jude (29) erhöhte Level an MMP-1 und MMP-8 bei zeitgleich erniedrigten Leveln von TIMP-1 nachweisen. Eine Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs scheint demnach die Wundheilung zu beeinträchtigen (42, 41).

2004 konnten Gosain und DiPietro (10) in einem Review zahlreicher Studien eine Korrelation zwischen dem Lebensalter und der Expression der Matrixmetalloproteinasen herstellen. So erfolge im Alter eine Überexpression von Matrixmetalloproteinasen bei gleichzeitiger Unterexpression ihrer Inhibitoren (TIMPs). Dadurch resultiere eine spätere Wundschließung und ein höheres Risiko für Infektionen und Komplikationen (10).

Liu et al. (43) untersuchten die Konzentrationen von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in Wundflüssigkeit diabetischer Ulzera verschiedenen Alters mit dem Ergebnis, dass eine erhöhte Konzentration von MMP-9 bei gleichzeitig erniedrigter TIMP-1-Konzentration für eine verzögerte Wundheilung sprechen. Den Autoren zufolge käme die Messung der Konzentrationen von Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren (TIMPs) in Betracht, diabetische Ulzera mit einem Risiko für eine schlechte Wundheilung zu identifizieren (43). Auch die Arbeitsgruppe um Ayuk

et al. (44) assoziierten eine Imbalance zwischen MMPs und TIMPs mit einer Chronifizierung einer Wunde, besonders bei Diabetes-Patienten.

Hadler-Olsen et al. (45) gelangten in einem Mini-Review 2010 zu dem Schluss, dass Matrixmetalloproteinasen durch Prozessieren eines Substrats zwar auch einen Krankheitsprozess unterbinden können. Den Autoren zufolge kann das Prozessieren eines anderen Substrats durch ein und dieselbe Matrixmetalloprotease allerdings auch den gegenteiligen Effekt haben und einen Krankheitsprozess begünstigen (45).

In einer Studie an Herzinfarkten von der Forschungsgruppe um Mayer (46) konnten MMP-2, MMP-9 und auch TIMP-1 nicht nur in Infarktregionen vermehrt nachgewiesen werden, sondern auch an Stellen, welche zuvor durch Positionierung der EKG-Sonden oder Gefäßligaturen verletzt wurden.

1.8 Das Langendorff Modell

Das Langendorff Modell wurde erstmals 1895 von Oscar Langendorff beschrieben (47). Es wurde für das bessere Verständnis der Herzphysiologie entworfen und gilt auch heute noch als eine der wichtigsten experimentellen Möglichkeiten, um Auswirkungen auf die Herzphysiologie und die Herzarbeit zu untersuchen (48).

Für das Langendorff Modell muss das Herz eines Säugetiers binnen weniger Minuten nach Entnahme am Aortenstumpf an eine spiralförmige Glassäule angehängen werden, welche mit einer Pufferlösung gefüllt ist und das Herz nunmehr retrograd perfundieren kann (47). Mittels dieser Pufferlösung, wie etwa dem hier verwendeten und weit verbreitetem Krebs-Henseleit-Puffer, gelingt es, einen Kreislauf zu simulieren und das Herz am Schlagen zu halten.

Der Krebs-Henseleit-Puffer spiegelt die ionische Zusammensetzung des Blutplasmas wider, ohne jedoch zelluläre Blutbestandteile wie Leukozyten, Erythrozyten oder Gerinnungsfaktoren zu enthalten (49). Zusätzlich erlaubt ein Ballon, welcher über das linke Herzohr in den linken Ventrikel eingeführt wird, eine kontinuierliche Druckmessung, sowie die Erhebung weiterer Parameter (47).

Das isoliert-perfundierte Langendorff-Herz ist auch heute noch eine geeignete Methode, um beispielsweise den pharmakologischen Einfluss verschiedenster

Medikamente auf die Herzphysiologie und auch die Koronargefäße zu untersuchen (50). Darüber hinaus ermöglicht es, Verletzungen mit einem definierten Wundalter im Herzmuskel zu generieren und ist daher von großer Bedeutung für diese Arbeit.

1.9 Ziele der Arbeit

Grundlage der Arbeit bildete eine vorausgegangene Infarktstudie von Mayer et al. (46), welche ein vermehrtes Auftreten der Marker MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im Langendorff-Modell auch in durch EKG-Elektroden und Gefäßligaturen geschädigten Herzmuskelzellen nachwies. Im Blick auf diese Befunde lag die Annahme nahe, dass diese Marker für Wundaltersschätzung und die Untersuchung der Wundvitalität nutzbar sein könnten. Vor diesem Hintergrund wurden für diese Arbeit Proben von verletztem, humanem Skelettmuskel- und Herzmuskelgewebe aus Obduktionsasservaten des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikum Düsseldorf, sowie verletzte Rattenherzen mithilfe der Langendorff-Anlage hinsichtlich der Nachweisbarkeit der obigen Marker untersucht. Gleichzeitig sollte anhand dieser Untersuchungen die aktuelle Problematik der forensischen Wundaltersschätzung und Wundvitalität aufgezeigt werden und für zukünftige Studien nachvollziehbarer gemacht werden (51).

Folgende Fragen sollen beantwortet werden (51):

- Können MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 sowohl bei Verletzungen im Skelett- als auch bei Verletzungen im Herzmuskel immunhistochemisch nachgewiesen werden?
- In welcher zeitlichen Abfolge und nach welcher Zeit nach Verletzungsbeibringung sind die Marker im Gewebe nachweisbar?
- Sind hierbei Unterschiede im Skelettmuskel und Herzmuskel festzustellen?
- Können die Marker bei der Unterscheidung zwischen vital und postmortal entstandenen Verletzungen helfen?

Der tierexperimentelle Anteil der Arbeit richtete sich nach den Standards des „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ des „*US National Institutes of Health*“ (NIH Publikation Nummer 85-23, 1996) und wurde durch das Tier-Ethikkommittee Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Projektnummer O 27/11). Die Untersuchung der humanen Proben wurde durch das Ethikkommittee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Projektnummer 5833).

2 Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples, Niedecker A., Huhn R., Ritz-Timme St., Mayer F., International Journal of Legal Medicine 2021, Springer Verlag

International Journal of Legal Medicine
https://doi.org/10.1007/s00414-021-02563-6

ORIGINAL ARTICLE



Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples

A. Niedecker¹ · R. Huhn² · St. Ritz-Timme³ · F. Mayer³

Received: 7 October 2020 / Accepted: 8 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

The estimation of wound age and wound vitality is a recurring task in forensic routine work and has been subject of forensic research for a long time. By now, an unrestrictedly reliable marker or set of markers has not been found. In a study on myocardial infarctions, matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 as well as tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) were detected immunohistochemically in mechanically wounded myocardium (ECG electrodes, vessel ligations). Against this background, the potency of MMP-9, MMP-2, and TIMP-1 as markers for the estimation of wound age and wound vitality was tested in a broad approach with human tissue samples drawn during autopsies and with an animal model, the isolated perfused Langendorff heart. The study comprised samples of injured human skeletal muscle, injured human myocardium, rats' hearts with vital wounds, and rats' hearts with postmortem-inflicted wounds that were all stained immunohistochemically. The results showed great scattering, leading to the conclusion that MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 are not suitable for wound age estimation. Merely the results for TIMP-1 suggested that this marker might be able to differentiate between vital and postmortem-inflicted wounds. With a view to the promising results of the preceding study, the results underline the necessity to test possible markers of wound age/wound vitality on a large and diverse sample set.

Keywords Wound age · Wound vitality · Immunohistochemistry · Myocardium · Skeletal muscle

Introduction

Reconstructing events of physical violence by evaluating the point of time when wounds have been inflicted is a recurring task in forensic routine work. Not surprisingly, wound age estimation has been a central field of forensic research for a long time.

Once injured by force, the body tissues respond with numerous molecular and cellular reactions in order to fix the damage: Wound healing is activated. The chronological course of wound healing can be divided in different

phases, which are characterized by various processes and mediators [1]. Estimating the wound age and/or the vitality of wounds is based on identifying the phases of wound healing by detecting these processes/mediators and putting them into a temporal context. Besides evaluating the macroscopic appearance of an injury, wound age estimation also comprises an assessment of microscopic and molecular alterations.

A recent review by Li et al. [2] stated that progress towards a more precise estimation of vitality and the age of wounds has been made during the last years. However, the authors also point out that an unrestrictedly reliable marker or set of markers has not been identified yet. Research problems are mainly seen in the availability and quantity of human tissue samples with sufficient information on wound age and wound vitality, as well as the results' reproducibility, the examiner's experience and methodological limitations. Casse et al. [3] arrive at a similar conclusion. According to their study, research on wound age estimation and wound vitality demands the consideration of various factors to ensure not only high specificity and sensitivity, but also the

✉ F. Mayer
felix.mayer@med.uni-duesseldorf.de

¹ Institute for Legal Medicine at the University Hospital Essen, 45147 Essen, Germany

² Department of Anesthesiology, the University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

³ Institute for Legal Medicine at the University Hospital Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

reproducibility of the results. They underline the necessity of control groups and the differentiation between antemortem and postmortem wounds with a simultaneously adequate number of samples.

This necessity derives from the phenomenon of the so-called biological death, meaning the death of each single cell a certain time after the death of the organism, the “individual death”. In 2010, Alaeddini et al. [4] stated that the interval of survival varies in different body tissues due to their own survival mechanisms. In this time span, some physiologic processes might still go on and bias the estimation of wound age. They might even suggest vitality of an injury that has actually been inflicted postmortem. A review by Dunjić et al. [5] also suggests that the activity of cells after the individual death depends on the type of tissue. Consequently, transferring research findings from a specific type of wound to other body tissues is nearly impossible [4].

A recent study of our own research group on myocardial infarctions came up with positive immunohistochemical staining for matrix metalloproteases (MMP) 2 and 9 and their inhibitor TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteases) not only in ischemic areas, but also adjacent to wounds inflicted mechanically by electrodes or vessel ligations in rats’ hearts [6]. In contrast, myocardial samples without an injury, ischemia, or other determinable harms (increased workload due to pulmonary embolism, cardiac resuscitation) represented no (increased) staining. MMPs are zinc-requiring proteolytic enzymes that are synthesized as zymogens, meaning in a proactive form, and are activated after an injury [7]. In healthy tissue, MMPs are expressed continuously on a low level. Their expression increases when tissues are being remodeled [8], in physiologic as well as pathologic processes [7]. They play a central role especially in the early phase of wound healing by degrading extracellular matrix (EM) [9].

In humans, more than twenty different, class-divided MMPs have been identified [10], one important sub-group are the gelatinases (MMP-2 and MMP-9). Due to repeats homologous to fibronectin type II in their catalytic domains, they specifically degrade different types of collagens in the EM [11]. High levels of MMP-2 and MMP-9 were detected in wounds after surgery and in chronic wounds [12, 13]. Furthermore, studies on skin samples and studies on ovarian carcinoma cells have shown that MMP-9 influences wound healing by activating TGF- β via proteolysis and inducing the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [14, 15]. A study on MMP-2 knockout mice was able to show that MMP-2 plays a key role in angiogenesis and tumor progression [16]. The activation of MMPs is complex and strictly regulated on multiple stages [17]. The primary control instance are TIMPs, a family of four enzymes (TIMP-1 to TIMP-4). They inhibit MMPs and thus inhibit the degradation of EM. TIMP-1 has a high affinity to MMP-9 and

its inactive form, progelatinase B [18]. The interaction of MMPs and TIMPs seems to be important for wound healing [19]. In a review, Conlon et al. [8] stated that MMPs not only act as proteolytic enzymes and inducers of the expression of signal molecules; moreover, they induce the activation of other MMPs. The different ways of MMP activation seem to intertwine. Previous studies also indicate that the ratio between MMPs and TIMPs is of great importance for wound healing. Ladwig et al. [19] showed that the ratio of MMP-9 and TIMP-1 could be used as an indicator of wound healing in wound fluid of pressure ulcers. A dysregulation of MMPs and TIMPs seems to be one of the reasons why wound healing is defective in chronic wounds [20]. In a study on dermal wounds, Gillard et al. [9] discovered elevated expression of MMP-9, MMP-2, and TIMP-1 especially in early phases of wound healing, concluding that MMP-9 might be important for angiogenesis, whereas MMP-2 might play a role in tissue transformation.

In addition to our own research results [6], all these findings suggest that a closer look on the applicability of MMPs and TIMPs in the context of wound age estimation and wound vitality could be worthwhile. Though promising, our findings in the preceding study [6] only gave a hint that MMPs and TIMPs can be detected immunohistochemically in the early phase of wound healing of myocardial tissue—other important questions, however, remained unanswered:

- Can MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 be detected immunohistochemically not only in injured myocardium, but also in skeletal muscle?
- If so, does their occurrence depend on the “age” of the examined wounds?
- Are there differences between the two types of muscle tissue?
- Can the markers help to differentiate between vital and postmortem-inflicted wounds?

We aimed on addressing these questions with a broad and complex approach. The immunohistochemical detectability of MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 was examined in two types of injured muscle tissue, myocardium and skeletal muscle. Moreover, we worked with postmortem drawn, human tissue samples and with an animal model, the isolated perfused Langendorff heart. This model allowed us to generate myocardial wounds with a defined “age” as well as postmortem-inflicted wounds.

Materials and methods

Animal experiments were performed in accordance with the German legislation on protection of animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by

the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). The protocol for the Langendorff system was approved by the local Animal Ethics Committee (project no. O 27/11). The examination of human myocardium and skeletal muscle samples drawn during autopsies was approved by the ethical committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (project no. 5833).

Human study samples

A total of 208 tissue samples of muscle wounds, skeletal muscle (140 samples) and myocardium (68 samples), were selected from 141 autopsies at the Department of Legal Medicine at the University Hospital Düsseldorf, Germany, in the period from 2006 to 2017. We included different types of violence (strangulation, blunt force, sharp force, polytrauma, myocardial injuries due to surgery, and myocardial injuries due to infarction). The age of the tissue donors ranged between 16 months and 94 years and both sexes were included.

In a first step, wound age of each sample was estimated roughly according to the available data (assumed time period between infliction of wound and death of the individual). The estimate was refined by additionally considering hematoxylin&eosin (HE) staining results and classifying the findings according to Cummings et al. [21]:

- A: very short survival time, few min max.—no signs of inflammation, no neutrophilic infiltration
- B: few min up to 4 h—single perivascular neutrophils
- C: 4 h up to 8 h—enhanced neutrophilic infiltration
- D: 8 h up to 12 h—infiltration of neutrophils, macrophages, and fibroblasts

Isolated perfused Langendorff heart

We used white male Wistar rats aged 2–3 months. The weight ranged between 250 and 350 g. The preparation of the rats' hearts was performed as described before [6]: The rats were kept on a 12:12 light/dark schedule (lights on at 0600 h) with food and water ad libitum. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of Pentobarbital (90 mg kg⁻¹) and Heparin (0.2 ml). The depth of sedation was verified by the absence of reactions to pain. In this state, the rats were decapitated, an immediate thoracotomy was conducted and hearts were excised and mounted onto the Langendorff system. The hearts were perfused with modified Krebs–Henseleit-Buffer:

- 118 mM sodium chloride (VWR Chemicals Prolabo)
- 4.7 mM potassium chloride (Fluka)

- 1.2 mM magnesium sulfate hepta-hydrate (Sigma-Aldrich)
- 1.2 mM potassium dihydrogen phosphate (Merck)
- 25 mM sodium hydrogen carbonate (Roth)
- 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (Roth)
- 11 mM D-glucose (VWR Life Science and Roth)
- 1 mM L-lactic acid sodium salt (Serva)
- 2.25 mM calcium chloride (Merck)

Heart function was monitored by observing heart rate, intraventricular pressure, and electrocardiogram (ECG). For data digitalization, we used an analog to digital converter (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd., Castle hill, Australia) with a sampling rate of 500 Hz. Data documentation was carried out frequently by using Chart for Windows v5.0 (AD-Instruments).

Rats' hearts with vital wounds

After a stabilization period of about 20 min on the Langendorff system, 16 hearts were injured by stabbing the wall of the left chamber with a scalpel. After defined time intervals of 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min, the hearts were removed from the Langendorff system and directly immersed in 4% formalin. An overview of the study protocol is given in Fig. 1.

Rats' hearts with postmortem-inflicted wounds

Eight hearts were excised after decapitation without being attached to the Langendorff system. After a defined time interval, they were injured by stabbing the wall of the left chamber with a scalpel: Two hearts each were stitched immediately, 10 min and 180 min after they had stopped beating; after another 180 min, the six hearts were fixed in 4% formalin. Furthermore, two hearts were injured 20 min after they had stopped beating and were fixed in 4% formalin after another 240 min (see also Fig. 1).

Immunohistochemical analysis

Identical staining methods were used for both human study samples and rat study samples and were performed as described before by Mayer et al. [6]:

Tissue sections were deparaffinized, washed in distilled water three times for 5 min and washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min.

- MMP-2: Slides were boiled in citrate buffer pH 6.0 for 10–15 min, cooled, and then washed in distilled water two times for 5 min. Primary antibody against MMP-2 (Medac, rabbit, E 18,012) was used in a concentration of 1:200, and the slides were incubated over night at +4

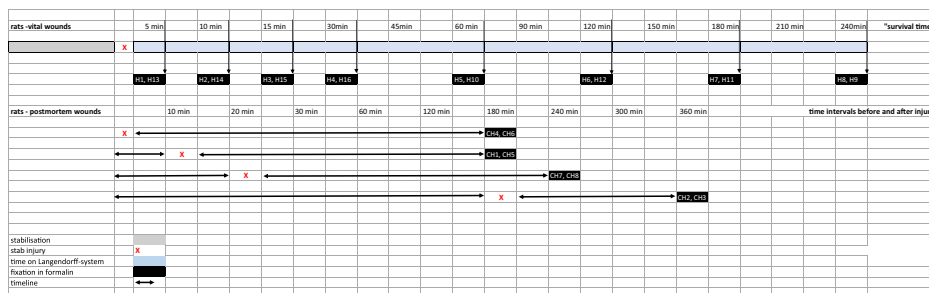


Fig. 1 Study protocols for rats' hearts with vital wounds (H1-H16) and with postmortem-inflicted wounds (CH1-CH8). Hearts with vital wounds were mounted onto the Langendorff system, injured by stabbing the left chamber after a stabilisation period of 20 min and fixed

in formalin after different "survival times". Hearts with postmortem-inflicted injuries were injured by stabbing the left chamber. Time intervals before and after stabbing varied

C. Slides were washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 20–25 min.

- **MMP-9:** Slides were treated with proteinase K (Dako, S3020) for 7 min and washed two times in TBS buffer with 0.5% Tween 20 for 5 min. Primary antibody against MMP-9 (Biorbyt orb, rabbit, 13,583) was used in a concentration of 1:300, and the slides were incubated over night at +4 C. Slides were washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 10–15 min.
- **TIMP-1:** Primary antibody against TIMP-1 (Biorbyt orb, rabbit, 195,994) was used in a concentration of 1:300, and the slides were incubated over night at +4 C. Slides were then washed in TBS buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked with 0.03% H₂O₂ for 10–15 min.

After blocking of endogenous peroxidase, all slides were washed in distilled water two times for 5 min and then in TBS buffer with 0.5% Tween 20 two times for 5 min. Afterwards, all slides were incubated with a peroxidase-marked polymer (Medac, Histofine1 Simple Stain MAX PO against rabbit, 414,142) for 30 min. Slides were stained with AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole, Cohesion Biosciences) and counterstained with Mayers hematoxylin (Merck, HX87717149).

Evaluation system for immunohistochemical analysis

To standardize the results of the immunohistochemical analysis, we used the following evaluation system as published before [6]:

MMP-9 and TIMP-1:

- 0: No visible staining
- I: Positive staining of single cells
- II: Positive staining of cell groups
- III: Positive staining of large tissue areas

MMP-2:

- 0: No visible staining
- I: Positive staining of EM in the perivascular regions
- II: Positive staining of EM in larger areas
- III: Positive staining not only of EM but also of intracellular

Results

General observations

Whereas positive staining for MMP-9 and TIMP-1 was found strictly intracellular, positive staining reactions for MMP-2 were also found in the EM. These findings correlate with the results of Mayer et al. [6].

Slides from human samples that had been stored in formalin for a longer time showed less distinct staining results compared to those samples collected more recently (2015–2017). In order to exclude a relevant influence of storage time on our results, we evaluated the slides of the "older" cases separately and compared them to the "younger" ones without finding any differences. We also checked, if the causative type of violence has an impact on the occurrence of the markers, again, no differences were found. Therefore, the results in this

publication comprise all collected samples without separating them into the different types of violence for a clearer depiction.

Human skeletal muscle

Table 1 is enclosed for detailed results; examples for staining results are presented in Fig. 2.

MMP-9 Positive staining results for MMP-9 were found in all wound age groups, even in samples with very short survival times. The intensity of staining was mostly equivalent to grade II or even III. However, there was also a considerable number of samples showing no positive staining at all. The share of samples with negative staining was especially large in wound age group D.

TIMP-1 The majority of samples of wound age groups A and B presented positive staining results with an intensity according to grade II or III. In wound age groups C and especially D, the share of samples with negative staining was larger.

MMP-2 Strong positive staining results for MMP-2 according to grades II and III were found in all samples regardless of the wound age group. Negative staining was found in age groups B to D but their share was rather small.

Human myocardium

Table 2 presents the detailed results for human myocardium injuries. Examples for staining results can be found in Fig. 3.

MMP-9 A high number of samples in wound age group A showed staining results with intensities grade II and III. The share of grade III was especially high in wounds that followed an infarction. However, nearly half of the samples in group A showed no positive staining. Similar

findings could be observed for group B. The single sample in group D presented no positive staining.

TIMP-1 The majority of samples of wounds in group A showed results with staining intensities grade II and III. Again, the share of grade III was especially high in wounds that followed an infarction. Also, a considerable number of samples showed no positive staining at all. The same accounted for samples in group B. The one sample in group D presented a staining intensity grade I.

MMP-2 Staining results in group A mainly presented intensities grade II and III with a considerable high share of grade III in infarction-derived wounds. In group B, the share of samples with a staining intensity grade I was greater. The sample in group D also presented positive staining with intensity grade I. Negative staining results for MMP-2 were only found in single cases.

Rats' hearts—vital wounds

Table 3 shows the detailed results of rat hearts with vital wounds.

MMP-9 Only two positive staining results with intensity grade I were observed in one heart with a survival time of 30 min and in one heart with a survival time of 3 h. In all other cases, staining was negative.

TIMP-1 There was only one heart with a survival time of 1 h that showed discreet positive staining. All other hearts showed no positive staining at all.

MMP-2 Nine hearts showed positive staining results with intensities grade I and especially grade II. The shortest survival time with positive staining results was 15 min. From the hearts with longer survival times, only one heart with a survival time of 1 h stained positive.

Table 1 Staining results of samples of human skeletal muscle injuries. Samples are categorized according to the estimated survival times of the wounds (groups A-D). "n" equals the number of samples in each group. The evaluation is based on a staging system used in a previous study [7]: MMP-2: 0=no visible staining, I=positive stain-

ing of extracellular matrix (EM) in the perivascular regions, II=positive staining of EM in larger areas, III=positive staining not only of EM but also of intracellular. MMP-9 and TIMP-1: 0=no visible staining, I=positive staining of single cells, II=positive staining of cell groups, III=positive staining of large tissue areas

Human—skel-etal muscle	A (few min max.) n=27				B (few min-4 h) n=91				C (4-8 h) n=11				D (8-12 h) n=11			
	III	II	I	0	III	II	I	0	III	II	I	0	III	II	I	0
	MMP-9	8	8	2	9	18	26	23	24	3	5	2	1	2	1	3
TIMP-1	6	12	3	6	19	34	18	20	3	2	3	3	3	1	2	5
MMP-2	4	17	6	0	34	35	18	4	4	3	3	1	5	4	1	1

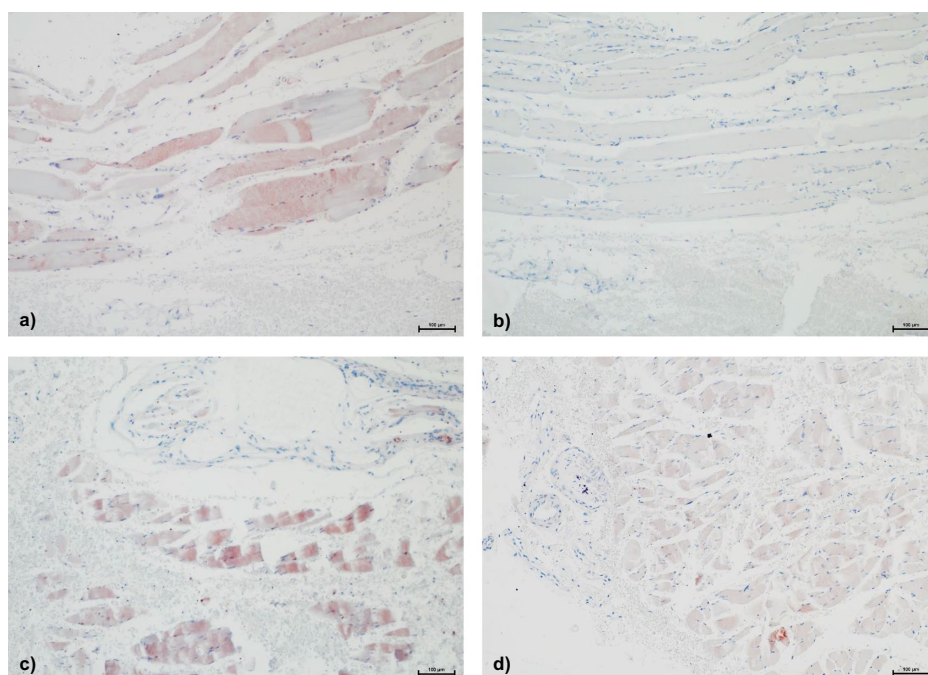


Fig. 2 Examples of very inhomogeneous staining results of human skeletal muscle injuries (100-fold magnification). **a** Wound age group D (8–12 h), MMP-9, staining intensity III. **b** Wound age group D (8–12 h), TIMP-1, staining intensity 0. **c** Wound age group B (few min–4 h), MMP-9, staining intensity III. **d** Wound age group B (few min–4 h), TIMP-1, staining intensity III

Rats’ hearts—postmortem-inflicted wounds

Table 4 shows the detailed results of rats’ hearts with post-mortem-inflicted wounds, and examples of staining results are presented in Fig. 4.

MMP-9 Three hearts presented positive staining results with intensities grade I and II. The time spans between the end of heartbeat and the infliction of the wounds var-

Table 2 Staining results of samples of human myocardium injuries. Samples are categorized according to the estimated survival times after infliction of wounds (groups A-D). “n” equals the number of samples in each group. The evaluation is based on a staging system used in a previous study [6]: MMP-2: 0=no visible staining, 1=positive staining of extracellular matrix (EM) in the perivascular regions, II=positive staining of EM in larger areas, III=positive staining not only of EM but also of intracellular. MMP-9 and TIMP-1: 0=no visible staining, 1=positive staining of single cells, II=positive staining of cell groups, III=positive staining of large tissue areas

Human—myocardium	A (few min max.)				B (few min-4 h)				C (4-8 h)				D (8-12 h)			
	n = 52				n = 15				n = 0				n = 1			
	III	II	I	0	III	II	I	0	III	II	I	0	III	II	I	0
MMP-9	11	11	6	24	2	5	1	7	0	0	0	0	0	0	0	1
TIMP-1	18	9	7	18	8	2	1	4	0	0	0	0	0	1	0	0
MMP-2	17	19	13	3	6	4	4	1	0	0	0	0	0	0	1	0

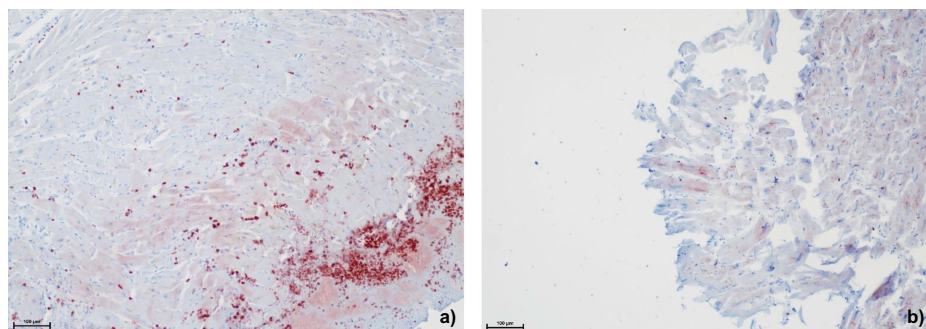


Fig. 3 Comparison between staining results (MMP-9, 100-fold magnification) of human myocardium injuries due to **a** infarction with staining intensity III and **b** sharp violence with staining intensity III. In both cases, a survival time according to group A has to be assumed

ied between 0 min and 3 h in all cases, and the time span after wound infliction was 3 h.

MMP-2 Three hearts presented negative staining results, including the two hearts with wounds inflicted 20 min after the heart had stopped beating. All the other hearts showed positive staining with intensities grade I and especially grade II.

Table 3 Staining results of rats' hearts with vital wounds. Survival time equals the time between injury and fixation of the hearts in formalin. The evaluation is based on a staging system used in a previous study [6]: MMP-2: 0=no visible staining, I=positive staining of extracellular matrix (EM) in the perivascular regions, II=positive staining of EM in larger areas, III=positive staining not only of EM but also of intracellular. MMP-9 and TIMP-1: 0=no visible staining, I=positive staining of single cells, II=positive staining of cell groups, III=positive staining of large tissue areas

Rats—vital wounds	Survival time	TIMP-1	MMP-2	MMP-9
H1	5 min	0	0	0
H2	10 min	0	0	0
H3	15 min	0	II	0
H4	30 min	0	II	I
H5	1 h	I	II	0
H6	2 h	0	II	0
H7	3 h	0	II	I
H8	4 h	0	I	0
H9	4 h	0	II	0
H10	1 h	0	0	0
H11	3 h	0	II	0
H12	2 h	0	I	0
H13	5 min	0	0	0
H14	10 min	0	0	0
H15	15 min	0	0	0
H16	30 min	0	0	0

TIMP-1 None of the hearts presented positive staining results.

Discussion

We addressed the challenges that go along with forensic wound age estimation as illustrated above by a unique sample collection comprised in the study: Not only were we able to include two different types of tissues (skeletal muscle and myocardium) from two species (humans, rats), the sample set also includes wounds with a defined

Table 4 Staining results of rats' hearts with postmortem-inflicted wounds. The time spans equal the time between death and injury, and between injury and fixation of hearts in formalin. The evaluation is based on a staging system used in a previous study [6]: MMP-2: 0=no visible staining, I=positive staining of extracellular matrix (EM) in the perivascular regions, II=positive staining of EM in larger areas, III=positive staining not only of EM but also of intracellular. MMP-9 and TIMP-1: 0=no visible staining, I=positive staining of single cells, II=positive staining of cell groups, III=positive staining of large tissue areas

Rats—post mortem wounds	Time intervals after death and after injury	TIMP-1	MMP-2	MMP-9
CH1	10 min—stab—3 h	0	II	I
CH2	3 h—stab—3 h	0	II	II
CH3	3 h—stab—3 h	0	I	0
CH4	stab—3 h	0	II	I
CH5	10 min—stab—3 h	0	0	0
CH6	stab—3 h	0	I	0
CH7	20 min—stab—4 h	0	0	0
CH8	20 min—stab—4 h	0	0	0

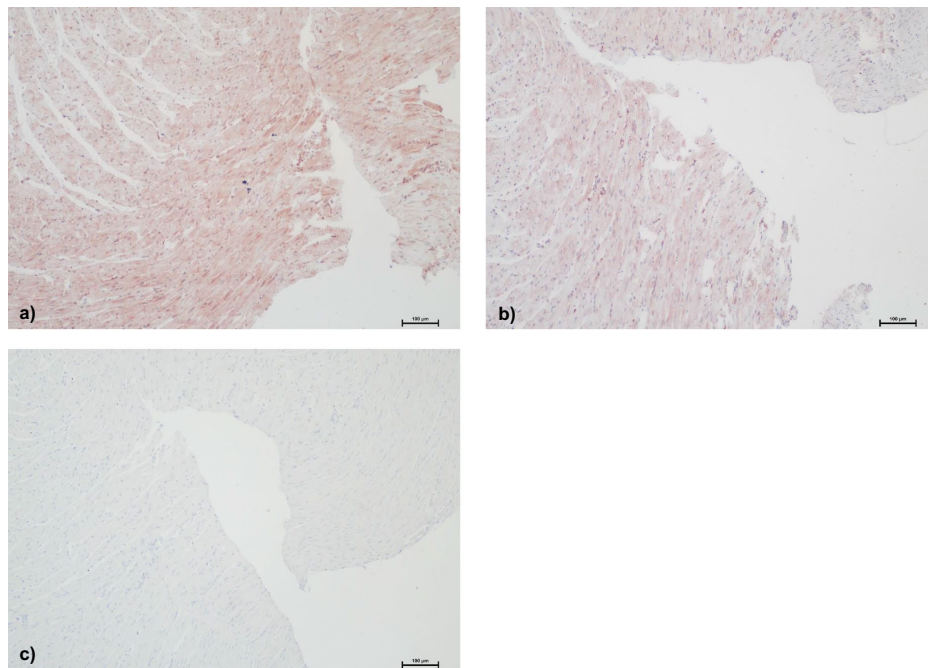


Fig. 4 Example of staining results of rats' hearts with postmortem-inflicted injuries (100-fold magnification). **a** MMP-2. **b** MMP-9. **c** TIMP-1. The depicted heart (CH2) was injured 3 h after excision and

fixed in formalin after another 3 h. MMP-2 and MMP-9 each present intense staining, whereas TIMP-1 shows no positive staining at all

wound age and reliably postmortem-inflicted wounds thanks to the Langendorff system. Thus, we not only took advantage of controlled experimental conditions in the rat model but also examined the applicability of the results gained on human tissue samples.

Despite this broad approach, the presented results are very inhomogeneous and show great "scattering". We found positive staining for all the tested markers in a considerable number of human samples regardless of their origin and the wound age. However, the same accounts for negative staining results (see Fig. 2 for examples of human skeletal muscle). If any, there was a slight tendency of more intense staining results towards cases with a "younger" wound age: Apparently, the number of samples showing no positive staining or less intense staining increased with higher wound age, implying that the markers we evaluated occur shortly after the infliction of a wound and disappear rather fast. Similar findings have also been published by Wang et al. [22]: In skin wounds of mice, high levels of MMP-9/MMP-2 seem to suggest

an earlier stage of wound healing. The authors came to the conclusion that an increased expression and activation of MMP-2 might be important for the inflammation phase following an injury rather than being crucial for the process of wound healing.

Regarding the results of human samples with wound age group A (very short survival time, few min max.), the share of those with staining intensities grade III was slightly higher in heart muscle samples than in skeletal muscle samples. This might lead to the assumption that wound healing and the emergence of the evaluated markers kick in faster in myocardium. However, a closer look on the myocardium samples revealed that the high staining intensities are mainly found in infarction-derived injuries. Though the differences were rather discreet, it is still obvious that staining of MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 in younger wound age groups was more intense in cases with an underlying infarction compared to those with injuries of other origins. Therefore, we assume that in infarctions, the already

existing inflammation might have caused an earlier expression and/or activation of the markers, which goes along with other research findings [23]. Since particularly inner organs, but also skin in certain cases, might present acute or chronic illnesses, statements on wound age based on the detection of an inflammation-related marker have to be made cautiously. Referring to the review by Li et al. [2], it appears that “[...] wound age estimation is an intricate and multifactorial problem [...]” which means that numerous intrinsic and extrinsic factors must be taken into account when trying to determine the age and vitality of a wound.

Compared to human samples, rat hearts with vital wounds presented rather few positive staining results especially for markers MMP-9 and TIMP-1. In addition, positive staining was found earliest in cases with a wound age of 15 min. In many of the human cases, a shorter survival time has to be assumed. At least in part this alleged contradiction might be connected to the fact that tissues/cells can “survive” the death of the individual for some time. In case of the rats’ hearts, “wound age” refers to the time between infliction of wounds and fixation of the hearts in formalin. Under such circumstances, the death of all cells occurs almost simultaneously and at the same point of time as the death of the individual, i.e. the heart. Since such a sudden stop of all intracellular activities does not apply for the human cases, wound age processes that have been triggered at or shortly before the time of death might still have proceeded and caused the emergence of the investigated markers some time later—simulating a faster occurrence in human tissue. In addition, the lack of blood in the Langendorff system might result in a delayed activation and/or expression of MMPs and TIMPs since relevant mediators might be missing.

Dunjic et al. [5] already stated that after the individual death of a person, some cells are still active. Referring to this review, the time span during which the cells are active also seems to depend upon the type of tissue. According to Tsujimoto et al. [24], the time of cell death is also influenced by ATP levels. Fibroblasts in human skin samples could be analyzed several days postmortem [5]. In this context, supravital reactions even several hours after the individual death can be explained. White blood cells seem to remain active for up to 12 h postmortem, which questions the presence of an inflammation as a vital reaction after injury. Additionally, Alaeddini et al. [4] and Jennings et al. [25] also described different intervals of survival due to different tissue mechanisms and stated that necrosis starts in defined regions of every organ, such as the subendocardial regions in the human heart. Compared to other organs, skeletal muscle tissue seems to show postmortem ultrastructural changes quite late [26]. In a study on lamb muscle, Sylvestre et al. [27]

were able to provide evidence of postmortem activity of MMP-2. High levels of pro-MMP-2 and of active MMP-2, but also of active MMP-2, were detected not only on the day of slaughter, but also 21 days later in samples that had been stored at 4 °C. The high levels of MMP-2 led to the assumption that MMP-2 is involved in the degradation of the tissue. The problem of distinguishing between vital wounds and postmortem-inflicted wounds was also described in a review by Cecchi et al. in 2010 [28] who pointing out that a variability in their detection makes many markers unreliable when it comes to this question. Furthermore, the methods used for detecting a marker, e.g. polymerase chain reaction or IHC, seem to have an impact upon the results.

Against this background, the behavior of the markers tested in our study is not surprising. The occurrence of MMP-2 and MMP-9 in vital and postmortem-inflicted wounds does not show obvious differences. Merely for TIMP-1, some interesting results were obtained: Although there were many positive staining results in human samples, rats’ hearts with vital wounds presented positive staining for TIMP-1 only in one case with a wound age of 1 h. Furthermore, there were no positive staining results for TIMP-1 in rats’ hearts with postmortem-inflicted wounds. The overall picture of these findings suggests that TIMP-1 is not as sensitive as MMP-2 and MMP-9, implying a possible use as a vitality marker. To verify this hypothesis, TIMP-1 needs to be tested on human muscle samples with reliably postmortem-inflicted wounds. Unfortunately, such samples are difficult to obtain and were therefore not comprised in the study at hand.

Limitations

Our study is subjected to some limitations: Our collected samples of human tissue only include wounds with a wound age up to 12 h. The maximum post-infliction time span of rats’ hearts accounted for 240 min. We therefore have no information about the behavior of the markers when used on wounds that are days or even weeks old. In addition, the available data for the tissue samples drawn during autopsies underlie some uncertainties, especially with a view to the exact time of the infliction of the wounds. Uninjured control samples were already included in the preceding study [6], whereas samples of human skeletal muscle with postmortem-inflicted wounds and a reasonable postmortem interval are difficult to obtain and therefore could not be examined. Furthermore, the number of rat tissue samples examined in this study might seem comparably low. We resigned from increasing the number due to ethical aspects.

Conclusion

Our study again demonstrates the challenges that go along with forensic wound age estimation and the establishment of new markers. Despite our complex approach of examining MMP-9, MMP-2, and TIMP-1 on both human and rat muscle tissue, as well as on vital and postmortem-inflicted wounds, we were faced with disappointing results. Though unexpected findings in a preceding study on rat hearts were quite promising, the results of the far more comprehensive sample collection show a very inhomogeneous picture leading to the conclusion that the markers do not meet the complex requirements of forensic wound age and wound vitality estimation. Only TIMP-1 might be of use when trying to differentiate between vital and postmortem-inflicted wounds but it needs to be tested on postmortem-inflicted wounds of human muscle samples.

Overall, it became clear again that a profound understanding of the usefulness of potential markers can only be achieved by examining a variety of samples. The sample collection needs to include vital wounds and postmortem-inflicted wounds. When working with an animal model, human control samples are indispensable; otherwise, the transferability of results remains questionable. The same accounts for different types of tissues. Finally, potential influences of acute or chronic illnesses have to be kept in mind when interpreting analytical results.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data availability Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval Animal experiments were performed in accordance with the German legislation on protection of animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). The protocol for the Langendorff system was approved by the local Animal Ethics Committee (project no. O 27/11). The examination of human tissue samples was approved by the ethical committee of the Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (project no. 5833).

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source,

provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Broughton G II, Janis JE, Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7S):p12S–34S
- Li N, Du Q, Bai R, Sun J (2020) Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects. *Forensic Sci Res* 5(1):15–24
- Casse J-M, Martrille L, Vignaud J-M, Gauchotte G (2016) Skin wounds vitality markers in forensic pathology: an updated review. *Med Sci Law* 56(2):128–137
- Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Sci Int-Gen* 4:148–157
- Dunjić DJ, Dunjić-Kostić B (2015) 12. Muscles: implications from forensic practice. *Skeletal muscle: from Pharmacology to clinical practice: 171–183*
- Mayer F, Falk M, Huhn R, Behmenburg F, Ritz-Timme S (2018) Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions? *Forensic Sci Int* 288:181–188
- Spinale FG (2007) Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on the cardiac form and function. *Physiol Rev* 87:1285–1342
- Conlon GA, Murray GI (2019) Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 247:629–640
- Gillard J, Reed MWR, Buttle D, Cross SS, Brown NJ (2004) Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. *Wound Repair Regen* 12:295–304
- Malemud CJ (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11:1696–1701
- Brauer PR (2006) MMPs—role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 11:447–478
- Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK (1996) Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinases levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 107:743
- Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F (1993) Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101:64
- Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Gene Dev* 14(2):163–176
- Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Tarabozzi G, Giavazzi R (2003) Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 63(17):5224–5229
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58:1048–1051

17. Quang Van Ta (2015) Matrix metalloproteinase: an overview. Tan Tao University. <http://review.ttu.edu.vn/index.php/review/article/view/98>. Accessed 01 October 2020
18. Lippert S (2006) Zelluläre Funktion und Beeinflussung der Genexpression von Matrix Metalloproteinasen in humanen Hepatomzellen. RWTH Aachen. http://publications.rwth-aachen.de/record/52670/files/Lippert_Sabine.pdf. Accessed 01 October 2020.
19. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS (2002) Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 10:26–37
20. Martin P (1997) Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75–81
21. Cummings PM, Trelka DP, Springer KM (2011) Atlas of forensic histopathology. Cambridge University Press
22. Wang Y, Yamamoto Y, Kuninaka Y, Kondo T, Furukawa F (2015) Forensic potential of MMPs and CC chemokines for wound age determination. *J Forensic Sci* 60:6
23. Manicone AM, McGuire JK (2008) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 19(1):34–41
24. Tsujimoto Y (1997) Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* 4:429–434
25. Jennings R, Ganote CE, Reimer KA (1975) Ischemic tissue injury. *Am J Pathol* 81(1):179–198
26. Tomita Y, Nihira M, Ohno Y, Sato S (2004) Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. *Leg Med* 6(1):25–31
27. Sylvestre MN, Balcerzak D, Feidt C, Baracos VE, BrunBellut J (2002) Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: possible relationship with activity of matrix metalloproteinases. *J Anim Sci* 80(7):1871–1878
28. Cecchi R (2010) Estimating wound age: looking into the future. *Int J Legal Med* 124:523–536

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

3 Diskussion

3.1 Die Problematik der forensischen Wundaltersschätzung

Wie Li et al. (21) bereits beschrieben, ist die forensische Wundaltersschätzung ein multifaktorielles und komplexes Problem, weshalb sowohl intrinsische als auch extrinsische Einflussfaktoren bei der Einschätzung des Wundalters und der Wundvitalität berücksichtigt werden müssen. Auch Casse et al. (20) beschrieben die forensische Wundaltersschätzung in einem Review von 2016 als eine der anspruchsvollsten Thematiken der rechtsmedizinischen Forschung. Die Autoren betonten die Relevanz von weiteren und umfassenderen Studien zu potentiellen Markern (20). Weiterhin sei es enorm wichtig, potentielle Marker nicht nur an vitalen Wunden, sondern auch hinsichtlich ihres Verhaltens in postmortalen Wunden zu untersuchen (20). Hierbei betonten die Autoren die Bedeutsamkeit von humanen Autopsieproben, welche auch von Grellner et al. (19) hervorgehoben wurden, da sie die Realität am besten wiedergeben (20, 19).

3.2 MMPs und TIMPs als mögliche Marker für die forensische Wundaltersschätzung

Die jeweiligen Ergebnisse für MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 der humanen Proben in unserer Studie zeigten sich sehr inhomogen (51): In allen Wundalterskategorien konnten für alle drei Marker positive Färberesultate verzeichnet werden. Gleichzeitig zeigten sich bei allen Markern eine nennenswerte Anzahl negativer Färberesultate, sodass insgesamt ein „buntes“ Verteilungsmuster von negativen und positiven Färbeerergebnissen in den jeweiligen Wundalterskategorien entstand (51). Es zeigten sich jedoch tendenziell intensivere Färbeerergebnisse bei Proben von humanem Muskelgewebe mit einem Wundalter unter vier Stunden. Mit zunehmendem Wundalter stieg auch die Anzahl der negativen Färbeerergebnisse, bzw. der Anteil von nur leicht positiven Befunden. Schlussfolgernd schei-

nen MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 kurz nach Verletzung des Muskelgewebes exprimiert und/ oder aktiviert zu werden, um dann mit zunehmendem Wundalter in ihrem Expressions- und/ oder Aktivitätsniveaus zunächst zu sinken (51).

Zu einem ähnlichen Ergebnis ist auch die Arbeitsgruppe um Wang et al. (52) gekommen, welche unter anderem MMP-2 und MMP-9 hinsichtlich ihres Potentials bei der forensischen Wundaltersschätzung an Hautwunden untersuchte. In einem Tierexperiment an Mäusen zeigte sich ein verändertes Verhältnis von MMP-9 zu MMP-2 zugunsten MMP-2 vor allem in frühen Stadien der Wundheilung. Die Autoren vermuteten daher, dass eine Erhöhung der Expression und der Aktivierung von MMP-2 vor allem während der Inflammationsphase der Wundheilung eine wichtige Funktion übernimmt, während MMP-9 insbesondere in angiogenetischen Prozessen eine wichtige Rolle innehat (52).

Auch die Arbeitsgruppe um Ishida et al. (53) untersuchte MMP-2 und MMP-9 hinsichtlich ihres Verhaltens in Hautwunden: Der Arbeitsgruppe gelang der Nachweis von MMP-2 positiven Makrophagen in allen Wundaltersgruppen und auch in unverletzter Haut, wobei die Anzahl der MMP-2 positiven Makrophagen mit zunehmendem Wundalter stieg. MMP-9 positive Makrophagen konnten hierbei nicht in unverletzter Haut oder Wunden mit einem Wundalter von unter einem Tag nachgewiesen werden (53). Ishida et al. (53) schlussfolgerten daher, dass MMP-9 in der Phase der Reepithelialisierung und eher in früheren Wundheilungsstadien wichtig zu sein scheint, während MMP-2 vor allem beim *Remodeling* eine Rolle zu spielen scheint. Auch Choi et al. (28) kamen in einem Experiment mit Sehnenverletzungen bei Kaninchen zu dem Ergebnis, dass MMP-2 wichtig für die Phase des *Remodeling* zu sein scheint.

Wie bereits zuvor beschrieben, spielt die Balance zwischen MMPs und TIMPs eine enorme Rolle für die Wundheilung: Vaalamo et al. (41) konnten in einer Studie zur Wundheilung unter anderem an normal heilenden Wunden und chronisch venösen Ulzera eine unkontrollierte Aktivität von MMP-2 in chronischen Ulzera nachweisen. Die Autoren gelangen zu dem Schluss, dass eine Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs zu einer gestörten oder zumindest verzögerten Wundheilung führt (41). Kherif et al. (54) zufolge, wird MMP-2 im Gegensatz zu MMP-9 kontinuierlich in normaler Muskulatur exprimiert. Liu et al. (43) zufolge ist eine verzögerte Wundheilung mit einer Hochregulation der MMPs bei gleichzeitig erniedrigtem Nachweis von TIMPs assoziiert. Insgesamt lassen diese Ergebnisse

auf eine Veränderung der Aktivität und/ oder Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 im Rahmen von Gewebsverletzungen und Prozessen der Wundheilung schließen, sodass eine Untersuchung der Marker im Kontext der forensischen Wundaltersschätzung plausibel erschien.

Verglichen mit anderen potentiellen Markern für die forensische Wundaltersschätzung zeigten die Ergebnisse unserer Studie jedoch ein sehr inhomogenes Bild. In einem Review von 2010 berichtete Cecchi (6) von einer höheren Nachweisbarkeit von IL-1 beta, IL-6 und TNF in letalen Wunden im Vergleich zu chirurgisch entstandenen Wunden. Allerdings schienen sowohl die Art der Verletzung als auch die Untersuchungsmethode Einfluss auf die Ergebnisse zu haben (6). In einer Studie von 2002 kam Grellner (55) zu dem Ergebnis, dass IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha vor allem für Wunden mit einem Wundalter von dreißig bis neunzig Minuten erhöht nachweisbar sind. In unverletzter Haut zeigten die Marker lediglich eine geringfügige Expression (55). 2005 untersuchten Grellner und Madea (56) die Wachstumsfaktoren TGF-alpha und TGF-beta1 an Hautverletzungen nach scharfer Gewalteinwirkung. Hierbei zeigte sich TGF-alpha nur schwach exprimiert in unverletzter Haut, wohingegen ein deutlicher Anstieg bereits zehn Minuten nach Wundbeifügung mit einem Peak zwischen dreißig bis sechzig Minuten vermerkt wurde (56). Eindeutige Peaks können anhand unserer Ergebnisse für MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 nicht gleichermaßen nachvollzogen werden. Tendenziell scheinen die Marker jedoch eine höhere Aktivität und/ oder Expression kurz nach Gewebsverletzung zu zeigen (51).

3.2.1 Vergleich der Ergebnisse nach Gewebeart

Eine weitere Kernfrage, mit der sich diese Arbeit befasste, war, ob sich Unterschiede zwischen den Befunden der untersuchten Marker im Skelettmuskel und im Herzmuskel zeigten (51). Betrachtet man vor allem die Ergebnisse der humanen Proben in der Wundaltersgruppe A (sehr kurze Überlebenszeit, wenige Minuten maximal), so zeigten sich tendenziell mehr positive Färbeergebnisse der Intensität III in den Herzmuskelproben (51). Dies führte zu der Überlegung, dass

die Prozesse der Wundheilung in Myokardzellen schneller einsetzen könnten als in Skelettmuskelzellen. Allerdings zeigte sich bei der weiterführenden Untersuchung, dass die intensiveren Färbeergebnisse im Myokard vor allem in infarktasoziierten Verletzungen zu finden waren. Schlussfolgernd zeigen sich intensivere Färbeergebnisse bei Herzmuskelverletzungen mit vorbestehender Entzündung im Rahmen eines Gewebsinfarktes (51).

Auch Ducharme et al. (57) gelang es in einem Mausexperiment eine Überexpression von MMP-9 nach Herzinfarkten nachzuweisen. MMP-9 Knockout Mäuse im selben Experiment hingegen zeigten weniger Akkumulation von Kollagen in der Infarktregion. Den Autoren zufolge scheint MMP-9 daher eine zentrale Rolle beim *Remodeling* der EZM nach Herzinfarkten zu spielen (57). Es ist daher davon auszugehen, dass die inflammatorischen Prozesse in Infarktarealen zu einer früheren Expression und/ oder Aktivierung von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 führen (51). Dies beschrieben bereits Manicone et al. (58) 2008: erhöhte Level von Matrixmetalloproteinasen während inflammatorischen Prozessen finden sich den Autoren zufolge in nahezu allen humanen Gewebsarten, was diese Enzymfamilie auch für therapeutische Zwecke interessant machen könnte.

Auch Soo et al. (59) wiesen in einem Experiment an Rattenhautwunden mit definierten Wundaltern unter anderem einen Anstieg der Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in den Wundheilungsprozessen der Inflammation und auch der Granulation nach. Westby et al. (60) zufolge ist die Expression von Matrixmetalloproteinasen in gesundem Gewebe limitiert. Diese kann jedoch beispielsweise nach Gewebsverletzung durch verschiedenste Mediatoren schnell induziert werden (60).

Schlussfolgernd scheint es zu einer Überlappung von Entzündungsprozessen und der Wundheilung nach mechanischen Verletzungen hinsichtlich der Expression und / oder Aktivität der Matrixmetalloproteinasen zu kommen. Dementsprechend sollten Krankheiten bei der Evaluation von Markern mitbedacht werden.

3.2.2 Vergleich zwischen tierexperimentell gewonnenen und humanen Probenmaterial

Neben dem humanen Probenmaterial wurden in dieser Arbeit ebenfalls tierexperimentelle Proben mithilfe der Langendorff-Anlage gewonnen. Verglichen mit den humanen Proben zeigten sich in der vorliegenden Studie an den Rattenherzen mit den vital zugefügten Wunden weniger positive Färbefunde (51). Dies war vor allem bei den beiden Markern MMP-9 und TIMP-1 der Fall (51). Darüber hinaus zeigte sich das erste positive Färbeergebnis bei den Rattenherzen ab einem Wundalter von fünfzehn Minuten für den Marker MMP-2. Bei vielen der humanen Proben muss allerdings von einer kürzeren Überlebenszeit ausgegangen werden (51). Dies liegt möglicherweise daran, dass es einen Unterschied zwischen dem Zeitpunkt des Todes der Zellen, bzw. des Gewebes und dem Zeitpunkt des Todes des Individuums (Individualtod) gibt. Der Individualtod beschreibt hierbei den Funktionsausfall größerer Systeme, wie etwa des Herz-Kreislauf-Systems (13), wohingegen der biologische Tod den Zeitpunkt vermerkt, an dem die letzte Zelle im Körper abstirbt und somit jegliche Stoffwechselprozesse enden (61). Der Zeitpunkt des Zelltods kann demnach nach dem Todeseintritt des Individuums liegen (51).

Im Falle der Rattenherzen bezieht sich das Wundalter auf das Zeitintervall zwischen Wundsetzung und Fixierung in Formalin. Unter Einwirkung des Formalins kommt es zu einem plötzlichen Einsetzen des Todes aller Zellen, sodass der Zeitpunkt des Zelltodes und des Individualtodes, bzw. in diesem Fall des Organtodes (Rattenherz), miteinander korrelieren (51). Solch ein plötzlicher Abbruch aller Zellaktivitäten, wie im Falle der Formalinfixierung, kann jedoch nicht auf reale Fälle übertragen werden: Es muss davon ausgegangen werden, dass die Prozesse der Wundheilung, die kurz vor oder zum Todeseintritt selbst einsetzen, auch über den Zeitpunkt des Individualtodes hinaus aktiv bleiben und so die Aktivierung/ Expression von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 induzieren. Folglich können diese Marker „früher“ in humanen Proben nachgewiesen werden.

Ein weiterer Aspekt, der eine verzögerte Aktivierung und/ oder Expression der MMPs und TIMPs in den Rattenherzen erklären könnte, stellt der Krebs-Henseleit-Puffer in der Langendorff Anlage dar: Der Krebs-Henseleit-Puffer hat, wie zuvor beschrieben, eine ähnliche ionische Zusammensetzung wie das Blut (49). Während demnach die Ionenkonzentration in der Pufferlösung ungefähr die Situation im Blut widerspiegelt, fehlt es dem Krebs-Henseleit-Puffer an den weiteren

Bestandteilen des Blutes (51). Blutzellen, die selbst Mediatoren freisetzen können und/ oder deren Freisetzung bewirken können, sind kein Bestandteil des Puffers. Dies könnte zu der verzögerten Aktivierung und/ oder Expression der untersuchten Marker beitragen (51).

3.3 Die Ergebnisse im Kontext der Frage der Wundvitalität

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass das Auftreten von MMP-2 und MMP-9 in vitalen Wunden ähnlich zum Auftreten beider Marker in postmortalen Verletzungen zu sein scheint (51). Einzig bei TIMP-1 konnten interessante Unterschiede vermerkt werden. In den humanen Proben fanden sich einige positive Färbeergebnisse zu TIMP-1, wohingegen nur ein Rattenherz mit einer vitalen Verletzung und einem Wundalter von einer Stunde ein positives Färbeergebnis lieferte. Die restlichen Rattenherzen mit vitalen Verletzungen zeigten keine immunhistochemischen Anfärbungen für TIMP-1 (51). Interessanterweise zeigten sich keinerlei positive Färbeergebnisse für TIMP-1 in den Rattenherzen mit postmortalen Verletzungen (51). In der Zusammenschau muss daher davon ausgegangen werden, dass TIMP-1 weniger sensitiv als MMP-2 und MMP-9 ist und möglicherweise als Marker für die Wundvitalität infrage kommt (51). Dies sollte jedoch durch weiterführende Studien anhand von postmortalen Verletzungen in humanem Gewebe überprüft werden, da dieses Probenkollektiv nicht durch unsere Studie abgedeckt werden konnte (51).

Bereits Dunjic et al. (62) kamen 2015 zu dem Ergebnis, dass der Individualtod nicht zwingend mit dem Zelltod einhergeht, sondern dass einzelne Zellen darüber hinaus aktiv bleiben können. Dies ist laut Dunjic et al. (62) jedoch auch abhängig von der Art des Gewebes: so sei es laut der Arbeitsgruppe möglich, aktive Fibroblasten in humanen Hautproben noch mehrere Tage postmortem zu analysieren. Weiße Blutzellen scheinen bis zu zwölf Stunden postmortem aktiv zu bleiben (62). Dies wiederum stellt die Inflammation als vitale Reaktion nach Gewebsverletzung infrage.

In diesem Kontext lassen sich auch supravitale Reaktionen erklären: supravitale Reaktionen sind Reaktionen, die noch einige Stunden nach dem Tod nachweisbar sind (62). Madea (13) definierte supravitale Reaktionen als „[...] über den Individualtod hinaus auslösbare ‚Lebensäußerungen‘ von Geweben auf Reize“, denen postmortale Metabolisierungsprozesse zugrunde liegen.

Bezogen auf einen Review von Tsujimoto et al. (63) scheint der Zeitpunkt des Zelltodes zudem durch ATP reguliert zu sein. Den Autoren zufolge sei eine ATP-Abhängigkeit jedoch nur in Apoptose, nicht aber in Nekroseprozessen nachweisbar (63).

Bezogen auf Alaeddini et al. (64) und Jennings et al. (65) lassen sich verschiedene Überlebenszeitintervalle bei unterschiedlichen Gewebearten abgrenzen. Dies sei Folge verschiedener Gewebemechanismen nach Verletzung. Außerdem scheint die Nekrose laut Jennings et al. (65) in definierten Organregionen anzufangen, beispielsweise in Subendokardregionen des Herzmuskels.

Laut Tomita et al. (66) scheint Skelettmuskelgewebe im Vergleich zu anderen Gewebearten erst spät postmortalen ultrastrukturellen Veränderungen zu unterliegen. Die Arbeitsgruppe untersuchte postmortale, ultrastrukturelle Veränderungen in Nieren-, Pankreas-, Leber-, Herz- und Skelettmuskelgewebe von männlichen Whistar Ratten (66). Hierbei zeigte das Skelettmuskelgewebe erst zehn Stunden postmortem ultrastrukturelle Veränderungen, wohingegen Veränderungen im Herzen bereits nach drei Stunden registrierbar war (66). Im Jahre 2002 untersuchten Sylvestre et al. (67) in einer umfassenden Studie an Muskelgewebe von Lämmern unter anderem die postmortale Aktivität von MMP-2 und MMP-9. Es gelang der Nachweis postmortaler Aktivität von MMP-2: Die erhöhte Nachweisbarkeit von pro-MMP-2 und aktivem MMP-2 gelang sowohl einen Tag nach Schlachtung des Tieres als auch einundzwanzig Tage danach in gekühlten Muskelproben (Kühlung bei Temperaturen von 4°C) (67). Interessanterweise konnten keine signifikanten Veränderungen bei der Nachweisbarkeit von aktivem MMP-2 nach den einundzwanzig Tagen vermerkt werden, wohingegen ein Rückgang von nachweisbarem pro-MMP-2 vermerkt werden konnte. Zudem gelang kein Nachweis von MMP-9 oder pro-MMP-9 (67). Sylvestre et al. (67) kamen folglich zu dem Schluss, dass MMP-2 möglicherweise einen Einfluss auf die Gewebszersetzung haben könnte und dass Matrixmetalloproteinasen auch lange Zeit nach dem Tod des Organismus‘ aktiv bleiben.

Nennenswerte Unterschiede fanden sich in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu Sylvestre et al. (67) nicht. Einzig die Ergebnisse für TIMP-1 lassen vermuten, dass TIMP-1 möglicherweise für die Beurteilung der Wundvitalität von Nutzen sein könnte (51).

Untersuchungen an anderen potentiellen Markern für die Wundvitalität sind jedoch vielversprechend: 2018 gelang der Arbeitsgruppe um Ishida et al. (68) eine erhöhte Nachweisbarkeit von Aquaporin 3 in Proben von humaner Haut nach Halskompression. In unverletzten Hautproben aus Autopsiefällen konnte Aquaporin 3 nur schwach positiv nachgewiesen werden, sodass Aquaporin 3 als potentieller Marker für die Wundvitalität infrage kommt (68).

3.4 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie an MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 unterliegt einigen Limitationen: Trotz eines umfassenden Probenkollektivs der humanen Fälle, war es nicht möglich, Verletzungen mit einem histologisch eingeschätzten Wundalter von über zwölf Stunden einzuschließen. Im Falle der Rattenherzen lag das maximale Zeitintervall nach Wundsetzung bei zweihundertvierzig Minuten. Es ist daher anhand unserer Studie nicht möglich, Aussagen zu dem Verhalten der Marker bei Wunden mit einem Wundalter von Tagen bis Wochen zu treffen (51).

Zusätzlich muss bedacht werden, dass die Informationen, die im Falle der humanen Proben aus Obduktionen gesammelt werden konnten, oftmals lückenhaft sind. Besonders die Aussagen zum Zeitpunkt der Wundentstehung fehlen häufig, sodass eine exakte Bestimmung dieses Zeitpunktes in der Mehrzahl der Fälle nicht möglich ist (51).

Bezogen auf den tierexperimentellen Teil der Arbeit verzichteten wir aus ethischen Gründen auf unverletzte Kontrollproben. Diese wurden in der vorherigen Studie zum Verhalten von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 in Infarktarealen bereits gesammelt (46). Dasselbe galt für Kontrollproben von unverletztem humanem Myokard (46). Auf Proben von humanem Skelettmuskelgewebe mit postmortal

zugefügten Verletzungen und einem angemessenen, postmortalen Zeitintervall musste aufgrund von fehlender Verfügbarkeit verzichtet werden.

Zusätzlich wurde aus ethischen Gründen darauf verzichtet, die Anzahl der verwendeten Rattenherzen (und dem Muskelgewebe der hierfür bereits getöteten Ratten) zu erhöhen, obwohl die Anzahl im Vergleich zu den humanen Proben niedrig erscheinen mag (51).

Zuletzt unterliegt die Langendorff-Anlage auch der Limitation, dass durch den verwendeten Krebs-Henseleit-Puffer zwar die Ionenkonzentrationen des Blutes nachgeahmt werden kann. Allerdings enthält die Pufferlösung nicht die im Blut vorkommenden Zellen, wie etwa rote und weiße Blutkörperchen, sodass eine exakte Nachahmung der Situation im Blut nicht möglich ist.

3.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Studie zeigten insgesamt ein sehr inhomogenes, „buntes“ Bild, sodass schlussfolgernd die Marker MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 nicht als geeignete Marker für die forensische Wundaltersschätzung und die Wundvitalität in Frage kommen. Einzig die Ergebnisse von TIMP-1 lassen vermuten, dass TIMP-1 möglicherweise zwischen vitalen und postmortal entstandenen Verletzungen unterscheiden könnte (51). Hierfür wären weiterführende, zukünftige Studien interessant.

Grundsätzlich stützen sich die Erkenntnisse der Studie jedoch auf einen sehr breiten Versuchsansatz und erfüllen daher die Anforderungen für die Evaluation neuer Marker. Potentielle Marker für die forensische Wundaltersschätzung sollten tiefgreifend erforscht werden und sowohl an unterschiedlichen Gewebearten als auch an tierexperimentell gewonnenen und humanen Proben untersucht werden, um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Gleichzeitig müssen potentielle Marker auch an vitalen und an postmortalen Wunden untersucht werden, um zwischen einem Nachweis im Rahmen einer vitalen Reaktion differenzieren zu können.

Zuletzt ist auch auf die Multifaktorialität der forensischen Wundaltersproblematik zu verweisen. Einflussfaktoren, wie bspw. akute oder chronische Erkrankungen sollten daher bei der Interpretation der Ergebnisse mitbedacht werden (51).

4 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1: Oshima, T. (2000), Forensic wound examination, *Forensic Science International* (Vol. 113, Issue 1 – 3), S. 153 – 164.
- 2: Betz, P. (1993), The immunohistochemical localization of alpha-1-antichymotrypsin and fibronectin and its meaning for the determination of the vitality of human skin wounds, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 105), S. 223 – 227.
- 3: Hernández-Cueto, C., Girela E., Sweet D. (2000), Advances in the Diagnosis of Wound Vitality: A Review, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* (Vol. 21, Issue 1), S. 21 – 31.
- 4: Raekallio, J. (1973), Estimation of the Age of Injuries by Histochemical and Biochemical Methods, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 73), S. 83 – 102.
- 5: Giel, S. E., Park, W. C. (2008), Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (Vol. 40, Issue 6 – 7), S. 1334 – 1347.
- 6: Cecchi, R. (2010), Estimating wound age: looking into the future, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 124), S. 523 – 536.
- 7: Gailit, J., Clark, R. A. F. (1994), Wound Repair in the context of extracellular matrix, *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 6, Issue 5), S. 717 – 725.
- 8: Riede, U., Werner, M. (2017), Allgemeine und Spezielle Pathologie, *Springer Verlag* (2. Auflage).

- 9: Wild, T., Auböck, J. (2007) Manual der Wundheilung – Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung, *SpringerWienNewYork Verlag*.
- 10: Gosain, A., DiPietro, L. A. (2004), Aging and Wound Healing, *World Journal of Surgery* (Vol. 28), S. 321 – 326.
- 11: Silbernagel, S., Lang, F. (2013), Taschenatlas Pathophysiologie, *Thieme Verlag* (4. Auflage, Kap. 3), S. 64 – 67.
- 12: Effron, J. E., Frankel, H. L., Lazarou, S. A., Wasserkrug, H. L., Barbul A. (1990), Wound Healing and T-Lymphocytes, *Journal of Surgical Research* (Vol. 48, Issue 5), 460 – 463.
- 13: Madea, B. (2015), Rechtsmedizin – Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung, *Springer Verlag* (3. Auflage).
- 14: Betz, P., Penning, R., Eisenmenger, W. (1991), Lipophagen der Haut als zusätzlicher Parameter für die histologische Wundalterschätzung, *Rechtsmedizin* (Band 1, Heft 4), S. 139 – 144.
- 15: Betz, P. (1994), Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 107), S. 60 – 68.
- 16: Musumeci, G. (2014), Past, present and future: overview on histology and histopathology, *Journal of Histology & Histopathology*, <http://dx.doi.org/10.7243/2055-091X-1-5>.
- 17: Coleman, R. (2000), The impact of histochemistry – a historical perspective, *Acta histochemica* (Vol. 102, Issue 1), S. 5 – 14.

- 18: Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry, *Journal of Pharmacy & BioAllied Science* (Suppl. 2), S. 307 – 309.
- 19: Grellner, W., Madea, B. (2007), Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation, *Forensic Science International* (Vol. 165, *Issue 2 – 3*), S. 150 – 154.
- 20: Casse, J. M., Martrille, L., Vignaud, J. M., Gauchotte, G. (2016), Skin wounds vitality markers in forensic pathology: An updated review, *Medicine, Science and the Law* (Vol. 56, *Issue 2*), S. 128 – 137.
- 21: Li, N., Du, Q., Bai, R., Sun, J. (2020), Vitality and wound – age estimation in forensic pathology: review and future prospects, *Forensic Sciences Research* (Vol. 5, No. 1), S. 15 – 24.
- 22: Walcher, K. (1930), Über vitale Reaktionen, *Deutsche Zeitschrift für gesamte gerichtliche Medizin* (Vol. 15) S.16 – 57.
- 23: Madea, B., Doberentz, E., Jackowski, C. (2019), Vital reactions – An updated overview, *Forensic Science International* (Vol.305), 110029.
- 24: Oehmichen, M. (2004), Vitality and time course of wounds, *Forensic Science International* (Vol. 144, *Issue 2 – 3*), S. 221 – 231.
- 25: Raekallio, J. (1965), Histochemical demonstration of enzymatic response to injury in experimental skin wounds, *Experimental and Molecular Pathology* (Vol. 4, *Issue 3*). S. 303 – 310.
- 26: Brinkmann, B., Madea, B. (2003), *Handbuch der gerichtlichen Medizin 1*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, New York
- 27: Bonnema, D. D., Webb, C. S., Pennington, W. R., Stroud, R. E., Leonardi, A. E., Clark, L. L., McClure, C. D., Finklea, L., Spinale, F. G., Zile, M. R. (2007),

Effects of Age on Plasma Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs), *Journal of Cardiac Failure* (Vol. 13, Issue 7), S. 530 – 540.

28: Choi, H. R., Kondo, S., Hirose, K., Ishiguro, N., Hasegawa, Y., Iwata, H. (2002), Expression and enzymatic activity of MMP-2 during healing process of the acute supraspinatus tendon tear in rabbits, *Journal of Orthopaedic Research* (Vol. 20, Issue 5), S. 927 – 933.

29: Armstrong, D., Jude, E. (2002), The Role of Matrix Metalloproteinases in Wound Healing, *Journal of American Podiatric Medical Association* (Vol. 92, Issue 1), S. 12 – 18.

30: Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., Lehnert, H. (2002), Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients, *Diabetologia* (Vol. 45), S. 1011 – 1016.

31: Lindsey, M. L., Zamilpa, R. (2012), Temporal and Spatial Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Following Myocardial Infarction, *Cardiovascular Therapeutics* (Vol. 30, Issue 1), S. 31 – 41.

32: Ladwig, G. P., Robson, M. C., Liu, R., Kuhn, M. A., Muir, D. F., Schultz, G. S. (2002), Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers, *Wound Repair and Regeneration – The International Journal of tissue Repair and Regeneration* (Vol. 10, Issue 1), S. 26 – 37.

33: Li, Y., Ma, J., Guo, Q., Duan, F., Tang, F., Zheng, P., Zhao, Z., Lu, G. (2009), Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma, *Diseases of Esophagus* (Vol. 22), S. 664-667.

34: Ågren, M. S. (1994), Gelatinase activity during wound healing, *British Journal of Dermatology* (Vol. 131, Issue 5), S. 634 – 640.

- 35: Zheng, H., Takahashi H., Murai, Y., Cui, Z., Nomoto, K., Niwa, H., Tsuneyama, K., Takano, Y. (2006), Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are Closely Linked to Growth, Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Gastric Carcinoma, *Anticancer Research* (Vol. 26), S. 3579-3584.
- 36: Ye, H. Q., Azar, D. T. (1998), Expression of Gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during Corneal Wound Healing, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (Vol. 39), S. 913 – 921.
- 37: Brauer, P. R. (2006), MMPs – Role in Cardiovascular Development and Disease, *Frontiers in Bioscience* (Vol. 11), S. 447 – 478.
- 38: Muller, M., Trocme, C., Lardy, B., Morel, F., Halimi, S., Benhamou, P. Y. (2008), Original Article: Complications Matrix Metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing, *Diabetic Medicine* (Vol. 25, Issue 4), S. 419 – 426.
- 39: Ries, C. (2014), Cytokine functions of TIMP-1, *Cellular and Molecular Life Science* (Vol. 71), S. 659 – 672.
- 40: Ikenaka, Y., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Yanase, K., Namisaki, T., Imazu, H., Masaki, T., Fukui, H. (2003), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model, *International Journal of Cancer* (Vol. 105, Issue 3), S. 340 – 346.
- 41: Vaalamo, M., Leivo, T., Saarialho-Kere, U. (1999), Differential Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP-1,-2,-3,-4) in Normal and Aberrant Wound Healing, *Human Pathology* (Vol. 30, Issue 7), S. 795 – 802.
- 42: Agren, M.S., Jorgensen, L.N., Andersen, M., Viljanto, J., Gottrup, F. (1998), Matrix metalloproteinase 9 level predicts optimal collagen deposition during early wound repair in humans, *British Journal of Surgery* (Vol. 85, No. 1), S. 68 – 71.

43: Liu, Y., Min, D., Bolton, T., Nubé, V., Twigg, S. M., Yue, D. K., McLennan, S. V. (2009), Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers, *Diabetes Care* (Vol. 32), S. 117-119.

44: Ayuk, S. M., Abrahamse, H., Houreld, N. N. (2016), The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation, *Journal of Diabetes Research* (Volume 2016), <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2897656>

45: Hadler-Olsen, E., Fadnes, B., Sylte, I., Uhlin-Hansen, L., Winberg, J. O. (2011), Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease, *The FEBS Journal* (Vol. 278, Issue 1), S. 28 – 45.

46: Mayer, F., Falk, M., Huhn, R., Behmenburg, F., Ritz-Timme, St. (2018), Matrixmetalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Immunohistochemical markers in the diagnosis of lethal myocardial infarctions?, *Forensic Science International* (Vol. 288), S. 181 – 188.

47: Herr, D. J., Aune, S. E., Menick, D. R. (2015), Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts, *Journal of Visualized Experiments* (Vol. 101), 52908.

48: Bell, R., Mocanu, M. M., Yella, D. M., (2011), Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 50, Issue 6), S. 940 – 950.

49: Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., Schulz, R. (2007), Isolated heart perfusion according to Langendorff – Still viable in the new millennium, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (Vol. 55, Issue 2), S. 113 – 126.

50: Broadley, K. J. (1979), The Langendorff Heart Preparation – Reappraisal of its Role as a Research and Teaching Model for Coronary Vasoactive Drugs, *Journal of Pharmacological Methods* (Vol. 2, Issue 2), S. 143 – 156.

51: Niedecker, A., Huhn, R., Ritz-Timme, St., Mayer, F. (2021), Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples, *International Journal of Legal Medicine*.

52: Wang, Y., Yamamoto, Y., Kuninaka, Y., Kondo, T., Furukawa, F. (2015) Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for wound age determination, *Journal of Forensic Science* (Vol. 60, No. 6).

53: Ishida, Y., Kuninaka, Y., Nosaka, M., Kimura, A., Kawaguchi, T., Hama, M., Sakamoto, S., Kouhei, S., Eisenmenger, W., Kondo, T. (2015), Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 129), S. 1043 – 1048.

54: Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J. G., Verdière-Sahuqué, M., Fardeau, M., Alameddine, H. S. (1999), Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Regenerating Skeletal Muscle: A Study in Experimentally Injured and mdxMuscles, *Developmental Biology* (Vol. 205, Issue 1), S. 158 – 170.

55: Grellner, W. (2002), Time-dependent immunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds, *Forensic Science International* (Vol. 130, Issue 2 – 3), S. 90 – 96.

56: Grellner, W., Vieler, S., Madea, B. (2005), Transforming growth factors (TGF-a and TGF-b1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds, *Forensic Science International* (Vol. 153, Issue 2 – 3), S. 174 – 180.

57: Ducharme, A., Frantz, St., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L. E., Schoen, F. J., Kelly, R. A., Werb, Z., Libby, P., Lee, R. T. (2000), Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction, *The Journal of Clinical Investigation* (Vol. 106, Issue 1), S. 55 – 62.

58: Manicone, A. M., McGuire, J. K. (2008), Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation, *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 19, Issue 1), S. 34 – 41.

59: Soo, C., Shaw, W. W., Zhang, X., Longaker, M. T., Howard, E. W., Ting, K. (2000), Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Derived Inhibitors in Cutaneous Wound Repair, *Plastic and Reconstructive Surgery – Journal of the American Society of Plastic Surgeons* (Vol. 105, Issue 2), S. 638 – 647.

60: Westby, M. J., Norman, G., Watson, R. E. B., Cullum, N. A., Dumville, J.C. (2020), Protease activity as a prognostic factor for wound healing in complex wounds, *Wound Repair and Regeneration – The International Journal of Tissue Repair and Regeneration* (Vol. 28, Issue 5), S. 631 – 644.

61: [Anon.]. (2011), "Rechtsmedizin". *Kompaktleitfaden Medizin 2011/2012*, Berlin, New York: De Gruyter, S. 1335 – 1358, <https://doi.org/10.1515/9783110265583.1335>.

62: Dunjić, D. J., Dunjić-Kostić, B. (2015), 12. Muscles: Implications from forensic practice, *Skeletal Muscle: From Pharmacology to Clinical Practice*, S. 171 – 183 (ISBN: 978-81-308-0556-6)

63: Tsujimoto, Y. (1997), Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes, *Cell Death & Differentiation* (Vol. 4), S. 429 – 434.

- 64: Alaeddini, R., Walsh, S. J., Abbas, A. (2010), Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – A review, *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 4, Issue 3), S. 148 – 157.
- 65: Jennings, R. B., Ganote, C. E., Reimer, K. A. (1975), Ischemic Tissue Injury, *The American Journal of Pathology* (Vol. 81, Issue 1), S. 179 – 198.
- 66: Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y., Sato, S. (2004), Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats, *Legal Medicine* (Vol. 6, Issue 1), S. 25 – 31.
- 67: Sylvestre, M. N., Balcerzak, D., Feidt, C., Baracos, V. E., Brun Bellut, J. (2002) Elevated rate of collagen solubilization and postmortem degradation in muscles of lambs with high growth rates: Possible relationship with activity of matrix metalloproteinases, *Journal of Animal Science* (Vol. 80, Issue 7) S. 1871 – 1878.
- 68: Ishida, Y., Kuninaka, Y., Nosaka, M., Shimada, E., Hata, S., Yamamoto, H., Hashizume, Y., Kimura, A., Furukawa, F., Kondo, T. (2018), Forensic application of epidermal AQP3 expression to determination of wound vitality in human compressed neck skin, *International Journal of Legal Medicine* (Vol. 132), S. 1375 – 1380.

5 Anhang

Tabelle 1: Auflistung der humanen Skelett- und Herzmuskelproben mit jeweiliger Auswertung für die einzelnen Marker

	Geschlecht	Alter (J)	Verletzung	Asservat	Kategorie Wundalter	MMP -9	TIMP -1	MMP -2
SK 1	W	32	Quetschung nach Erdrosselung, Einblutung	M. sternocleidomastoideus	B	II	0	II
SK 2	W	32	s. SK1	Halsmuskel 1	B	I	I	II
SK 3	W	32	s. SK1	Halsmuskel 2	B	II	III	II
HZ 1	M	78	Einblutung nach Polytrauma	Myokard	B	II	I	III
HZ 2	W	64	Herzbeutelampnaden nach Myokardruptur und ausgedehntem Vorderwandinfarkt	Myokard	A	III	III	III
SK 4	M	51	Wadenbeinbruch	Unterschenkelmuskeln	D	I	0	III
SK 5	W	81	stumpfe Gewalt	M. trizeps b. re	B	II	II	III
SK 6	W	81	s. SK5	M. biceps li	B	0	III	III
SK 7	W	56	Einblutung nach stumpfer Gewalteinwirkung	re Schläfenmuskel	B	II	0	II
SK 8	M	18	stumpfe Gewalt	M. subscapularis li	B	I	0	II
SK 9	M	18	s. SK8	M. subscapularis re	B	II	II	II

SK 10	M	18	s. SK8	Nackemus- kulatur	B	0	0	I
SK 11	M	18	s. SK8	Halsmusku- latur	B	I	II	II
SK 12	M	79	Einblutung	M. iliopsoas	D	0	0	III
SK 13	M	36	Einblutung (VE: Drogenabusus)	Skelettmus- kel 1	B	II	I	II
SK 14	M	36	s. SK13	Skelettmus- kel 2	B	II	0	II
HZ 3	M	76	Herzventrikelperforation im Rahmen der Bypass-OP	Myokard	A	II	I	III
SK 15	W	93	stumpfe Gewalt	Halsmuskel	A	0	III	II
SK 16	W	93	s. SK15	Oberarm- muskel	A	0	0	II
SK 17	W	93	s. SK15	Rückenmus- kel	A	II	I	I
HZ 4	M	20 Monate	Unterblutung Herz- innenschicht	Myokard	B	0	0	II
SK 18	W	85	Sturzbedingte stumpfe Gewalt	M. longis- simus	D	III	0	II
SK 19	W	85	s. SK18	M. rhomboi- deus re	B	I	I	III
SK 20	W	85	s. SK18	M. rhomboi- deus li	B	III	III	III
SK 21	W	54	Schädelhirntrauma	re Schläfen- muskel	B	0	0	0
SK 22	W	51	Einblutung, Ver- brennungen	Bauchwand li	D	0	0	0
SK 23	W	51	s. SK22	Rippenmus- kel	B	I	II	III

SK 24	W	85	Schädelhirntrauma	Halsmuskel li	B	0	I	II
SK 25	W	85	s. SK24	Zungenbeinmuskel	B	0	II	I
SK 26	M	60	Einblutung	M. sternohyoideus re	D	III	III	III
SK 27	W	84	Einblutung Beine, operative Faszien-spaltung	Skelettmuskel 1	C	II	0	II
SK 28	W	84	s. SK27	Skelettmuskel 2	C	II	I	III
SK 29	W	84	s. SK27	Skelettmuskel 3	C	I	I	III
SK 30	M	72	Einblutung li Unterschenkel nach Unfall 2 Wochen vor Tod	Unterschenkelmuskel li	C	II	II	I
SK 31	W	85	Einblutungen	Nackenmuskel	B	III	II	III
SK 32	W	85	s. SK31	Skelettmuskel 1	B	II	II	III
SK 33	W	85	s. SK31	Skelettmuskel 2	B	I	II	II
SK 34	W	85	s. SK31	Skelettmuskel 3	B	I	III	I
SK 35	W	81	Einblutung Schläfere	M. temporalis re	B	III	III	II
SK 36	M	58	Einblutung li Oberschenkel nach Bypass-Implantation	OP-Gebiet Oberschenkelmuskel li 1	B	II	II	II
SK 37	M	58	s. SK36	OP-Gebiet Oberschenkelmuskel li 2	B	III	II	III
SK 38	W	89	Einblutung nach Beckenbruch	re Hüftbeugemuskel	B	0	II	III

HZ 5	M	74	Herzbeutelampnade bei 3fachem Einriss der re Kammer, Infarktverdacht	Myokard	A	0	III	III
HZ 6	W	74	Herzbeutelampnade, rupturierter Vorderwandinfarkt	Myokard	A	III	III	III
HZ 7	M	88	Einriss, Vorderwandinfarkt, Herzbeutelampnade (Z.n. Herz OP)	Myokard	A	III	III	III
HZ 8	W	89	Einriss Herz bei Polytrauma	Myokard 1	A	0	II	II
HZ 9	W	89	s. HZ8	Myokard 2	A	0	0	II
HZ 10	M	37	Herzbeutelampnade bei Herzwanneinriss nach Infarkt	Myokard	A	II	III	III
HZ 11	W	83	Gewebsuntergang Herzmuskel, wahrscheinlich infarktbedingt	Myokard	A	II	III	III
HZ 12	M	63	Einriss Vorhof li	Myokard	A	II	II	II
SK 39	W	77	Strangulation	Halsmuskel	A	II	0	III
SK 40	W	77	s. SK39	M. pectoralis major	A	II	II	II
HZ 13	W	81	Infarkt Vorderwand/Spitze (transmural), Einriss li Kammer, Herzbeutelampnade	Myokard 1	A	III	II	II
HZ 14	W	81	s. HZ13	Myokard 2	A	III	I	II
SK 41	W	70	Einblutung M. serratus anterior li	M. serratus anterior li	B	III	II	III
SK 42	M	19	Einblutungen	Rippenmuskel li	C	III	0	III
SK 43	M	19	s. SK42	Muskulatur prävertebral	C	III	0	III

HZ 15	W	57	eingeblytetes Areal Herzkammertrennwand	Myokard 1 (li Kammer)	A	III	II	II
HZ 16	W	57	s. HZ15	Myokard 2 (li Kammer)	A	0	III	II
HZ 17	W	47	ZerreiBung Herzbeutel und Herzvorderwand	Myokard	A	0	I	II
SK 44	W	94	Einblutung Psoasmuskel re	M. psoas re	D	I	0	II
SK 45	W	23	Einblutungen Kopf, Rlicken, re Oberarm, li Ellenbogen, Handgelenk, offener Schienbein-Wadenbruch re	M. deltoideus	B	II	0	I
SK 46	W	23	s. SK45	Unterschenkelmuskel re	B	0	II	III
SK 47	W	23	s. SK45	Halsmuskel	B	III	II	I
SK 48	W	85	Einblutung Hals	Halsmuskel li	B	I	I	III
HZ 18	M	77	Perforation Herz in Patch-Region (Z.n. frischer operativer Eingriff Herz)	Myokard	A	II	II	I
SK 49	M	38	Halsweichteilverletzung, Einblutung, Frakturen Halswirbelk6rper 5/Kehlkopf/Schildknorpel	Hals (vordere Muskulatur)	B	II	II	II
SK 50	M	38	s. SK49	Muskulatur Zungenbein	B	II	II	III
HZ 19	W	67	Herzbeutelampnade, Zn Herzwandruptur, Aussackung re Herzwand	Myokard	A	0	III	II

HZ 20	M	74	Einblutung hinterer Stellmuskel li	Myokard	B	II	III	III
HZ 21	M	81	Einblutung Herzmuskulatur li (Z.n. Brandgeschehen)	Myokard	B	0	0	III
SK 51	W	89	Einblutung Hals, Herzbeutelampnade	M. sternocleidomastoideus	B	I	II	III
SK 52	W	89	s. SK51	M. temporalis	B	I	II	III
SK 53	W	16 Monate	komprimierender Gewalt gegen den Hals	M. sternocleidomastoideus re	A	III	II	II
SK 54	M	51	Einblutung Oberschenkel re, V.a. bakterielle Infektion	Muskulatur Oberschenkel re	B	II	II	III
HZ 22	M	36	Polytrauma mit Quetschung Herz und Einriss re Kammer	Myokard	A	I	III	II
HZ 23	M	73	Myokardruptur li Kammerhinterwand, Einblutung Herzbeutel	Myokard	A	III	0	I
HZ 24	M	48	Polytrauma mit Eröffnung Brustkorb und Einriss Herz	Myokard	A	0	0	I
HZ 25	M	59	Stich re Herzkammer, Herzbeutelampnade	Myokard	A	I	II	II
HZ 26	W	64	Herzbeutelampnade bei Wandeinriss und mehrere Tage altem Infarkt	Myokard	B	III	III	III
HZ 27	M	54	Ruptur eines Herzinfarkts mit Herzbeutelampnade (Hinterwand)	Myokard 1	A	II	I	I

HZ 28	M	54	s. HZ27	Myokard 2	A	0	III	I
SK 55	W	86	Strangulation, stumpfe Gewalt: Weichteile beider Arme + Beine	M. subscapularis li	B	II	II	III
SK 56	W	86	s.SK55	Beinmuskulatur li	B	I	III	II
SK 57	W	86	s.SK55	M. infraspinatus	B	II	II	III
SK 58	M	71	unklare Einblutung	Quadrizepsmuskulatur	B	I	III	III
SK 59	M	71	unklare Einblutung	Zwerchfell	B	III	I	III
HZ 29	W	80	Herzbeuteleroöffnung mit Riss der Herzspitze, Gewebsdefekt Vorderwand Herz, Einblutung Innenhaut re Vorhof	Myokard (Einriss Spitze)	B	0	III	II
SK 60	M	49	Erhängen	M. sternocleidomastoideus	A	0	0	I
SK 61	M	49	s. SK60	Kehlkopfmuskel	A	II	II	II
SK 62	M	71	Einblutung	Zunge	B	I	III	III
SK 63	M	68	komprimierende Gewalt Hals	Halsmuskel 1	B	I	I	III
SK 64	M	68	s. SK63	Halsmuskel 2	B	III	III	III
SK 65	M	52	Einblutung Schläfe li, CO-Intoxikation	M. temporalis li	B	I	III	I
SK 66	M	21	Sturz mit Rumpfrauma	Muskulatur Achselhöhle re	B	0	II	II
HZ 30	M	62	2 Einrisse Vorderwand Herz, Herzwanddurchriss Herzspitze	Myokard	A	0	III	III

SK 67	M	70	Einblutung	M. temporalis re	B	II	II	I
SK 68	M	18	Erhängen	Halsmuskulatur	A	0	III	II
HZ 31	M	73	Herzbeutelampnade bei rupturiertem Herzinfarkt der Vorderwand	Myokard	A	II	III	I
HZ 32	W	77	Herzinfarkt, Herzbeutelampnade bei Perforation Herzspitze (Z.n. Stentimplantation)	Myokard	B	0	III	III
HZ 33	M	62	rissartiger Defekt Herzwand, Einblutung Herzbeutel	Myokard	A	0	III	I
SK 69	W	64	Einblutungen	M. infraspinatus	D	I	III	I
SK 70	W	64	s. SK69	M. deltoideus re	B	III	III	III
SK 71	W	64	s. SK69	M. deltoideus li	C	III	III	II
SK 72	W	64	s. SK69	M. teres li	D	0	III	III
SK 73	W	64	s. SK69	M. teres re	C	II	III	I
SK 74	W	61	Einblutung Hals li, Herzbeutelampnade bei Einriss li Kammervorderwand bei Herzinfarkt	M. sternocleidomastoideus li	B	0	II	I
HZ 34	W	61	s. SK74	Herzmuskeleinriss Vorderwand li nach Infarkt	A	I	III	III
SK 75	M	n.b.	Einblutung	M. sternocleidomastoideus li	B	0	II	II

SK 76	M	87	Einblutungen	Bizepsmuskel li	B	0	II	III
SK 77	M	87	s. SK76	Schulterblattmuskel li	B	I	I	III
SK 78	M	87	s. SK76	M. deltoideus li	B	0	II	II
SK 79	M	64	Erhängen	Rückenmuskel	A	0	I	III
SK 80	M	64	s. SK79	Kehlkopfmuskel	A	0	II	II
HZ 35	M	84	Herzbeutelampnade bei Ruptur eines Infarkts im Übergang Vorder-/Hinterwand	Myokard 1	B	II	II	I
HZ 36	M	84	s. HZ35	Myokard 2	B	II	II	I
SK 81	M	79	Einblutungen	Schultermuskel	B	I	II	II
SK 82	M	79	s. SK81	Rippenmuskulatur 1	B	I	I	II
SK 83	M	79	s. SK81	Rippenmuskulatur 2	B	II	I	III
HZ 37	M	61	Verletzung Herzmuskel im Rahmen Wundrevision (Z.n. Bypass OP, Z.n. Versorgung Herzwanddefekt)	Myokard	D	0	II	I
SK 84	M	n.b.	Einblutung nach Verkehrsunfall	Unterschenkelmuskel li	B	0	I	III
HZ 38	W	62	Einblutung	Myokard	B	0	III	0
HZ 39	M	69	Herzbeutelampnade nach rupturiertem Infarkt der Kammerhinterwand	Myokard	A	0	III	II

SK 85	M	66	Einblutung	M. sternocleidomastoideus li	B	0	I	II
HZ 40	M	79	Durchtrennung Herzmuskel im Rahmen Herzkatheter-Ablation	Myokard	A	III	I	II
SK 86	M	80	Querbruch Wirbelkörper mit Einblutung in die Halsweichteile	Weichgewebe Wirbelkörperbruch	D	0	II	III
SK 87	W	47	Einblutung	Halsmuskel	B	0	II	II
SK 88	W	47	Einblutung	M. sternohyoideus	B	0	II	I
SK 89	W	47	Einblutung	M. sternocleidomastoideus	B	0	III	II
SK 90	W	32	Einblutung	Beckenmuskulatur	B	0	0	0
HZ 41	W		Polytrauma mit Dekapitation, Abriss Herz, Einriss Herzvorderwand	Myokard (Einriss Vorderwand)	A	0	III	II
SK 91	M	48	Erhängen	Zungenbeinmuskulatur	B	I	III	III
HZ 42	M	48	Herzbeutelampnade bei Einriss li Kammer nach Infarkt	Myokard	B	I	III	III
HZ 43	M	65	Herzbeutelampnade bei Muskelriss li Kammervorderwand + Hinterwand, fraglich frischer Herzinfarkt	Myokard	B	0	III	I
SK 92	M	79	Erhängen	Zungenbeinmuskel	B	I	III	III
SK 93	M	79	s. SK92	Muskeln Carotiden	B	0	0	0
SK 94	W	82	Einblutung im OP-Gebiet nach Hüft-OP li (Z.n. Infektion Wundgebiet)	Weichgebiet OP-Bereich	B	0	0	II

HZ 44	M	22	Herzdurchschuss	Myokard	A	O	III	O
SK 95	M	92	Erdrosseln	Muskulatur Außenseite re Brustkorb	A	I	III	II
SK 96	W	50	Stichverletzungen, Zeichen für Erstick- cken	M. sterno- cleidomasto- ideus	A	III	0	II
SK 97	W	50	s. SK96	Kehlkopf- muskel	A	III	II	III
SK 98	W	65	Strangulation	Skelettmus- kel 1	A	0	I	II
SK 99	W	65	s. SK99	Skelettmus- kel 2	A	II	0	II
SK 100	W	31	Erdrosseln	Halsmuskel 1	A	II	II	II
SK 101	W	31	s. SK100	Halsmuskel 2	A	I	II	II
SK 102	M	53	Strangulation	M. sterno- cleidomasto- ideus li	A	III	0	II
SK 103	M	53	s. SK102	M. sterno- cleidomasto- ideus re	A	0	III	II
SK 104	M	53	s. SK102	M. omohyoideu s	A	III	III	II
HZ 45	M	66	Stichwunde re Herzkammer	Myokard	A	0	0	0
HZ 46	M	41	Stichverletzung	Myokard	A	III	0	I
HZ 47	M	34	stumpfe Gewalt mit Einriss li Herz- kammer	Myokard	A	0	II	I
HZ 48	W	25	Durchschuss re Herzkammer	Myokard	A	III	0	I
HZ 49	W	37	Stich in re Herz- kammer	Myokard	A	0	I	I

HZ 50	M	17	Durchtrennung Herz, Herzbeutelamponade	Myokard 1 (re Kammer)	A	II	0	II
HZ 51	M	17	s. HZ51	Myokard 2 (re Kammer)	A	II	0	II
HZ 52	M	49	Stichverletzung	Myokard	A	I	0	III
HZ 53	W	34	Stichverletzung	Myokard (re Kammer)	A	III	II	III
HZ 54	W	45	Herzbeutelamponade nach Stich in li Herzkammer	Myokard	A	II	0	0
HZ 55	M	18	Durchstich Herz	Myokard	A	0	0	III
HZ 56	M	40	Stichverletzung Herz	Myokard (re Vorhof)	A	I	I	I
HZ 57	W	49	Stichverletzung Herz	Myokard	A	0	0	I
SK 105	M	24	Schnittverletzung Hals/ Schulter	Schultermuskel	A	II	II	II
SK 106	W	75	Schnittverletzung	Halsmuskel	A	III	II	III
HZ 58	W	33	Streifschuss Herzvorderwand	Herzmuskel (Vorderwand)	A	0	0	III
HZ 59	M	56	Stichverletzung Herz	Herzmuskel	A	II	0	II
HZ 60	W	39	Stichverletzung Herz	Myokard (li Kammer)	A	I	0	III
HZ 61	M	53	Durchtrennung Herz	Myokard	A	0	0	II
HZ 62	W	38	Stichverletzung li Herzkammer	Myokard (Stich li Kammer)	A	0	0	III
SK 107	M	50	Stichverletzungen	Rippenmuskulatur	A	III	II	I
SK 108	W	41	Stichverletzungen	Halsmuskel	A	III	II	I
SK 109	W	41	s. SK108	Kehlkopfmuskel	A	II	III	I

HZ 63	W	64	scharfe Gewalt mit Eröffnung beider Herzkammern	Myokard	A	0	0	II
SK 110	W	64	s. HZ63	M. sternocleidomastoideus	A	0	II	I
HZ 64	W	41	Stichverletzung	Myokard	A	0	III	III
HZ 65	M	47	Stichverletzungen	Myokard (li Herzkammer)	A	0	II	III
SK 111	M	81	komprimierende Gewalt, Einblutungen nach stumpfer Gewalt	Skelettmuskel	B	0	0	I
SK 112	W	47	Einblutungen	Brustmuskel	B	II	0	0
SK 113	W	47	s. SK112	Rückenmuskel	B	III	I	I
SK 114	W	44	stumpfe Gewalt	Halsmuskel	B	I	0	I
SK 115	W	44	s. SK114	Brustmuskel	B	II	0	I
SK 116	W	60	Einblutungen	Halsmuskel 1	B	III	III	II
SK 117	W	60	s. SK116	Kopfmuskel	B	II	III	II
SK 118	W	67	Einblutungen	Halsmuskel 1	B	II	0	II
SK 119	W	67	s. SK118	Rückenmuskel	B	I	II	I
SK 120	W	37	stumpfe Gewalt	Skelettmuskel 1	B	III	I	II
SK 121	W	37	s. SK120	Skelettmuskel 2	B	III	I	II
SK 122	M	44	Einblutung in die Zunge	Zungenmuskel	B	III	I	II
SK 123	W	73	Einblutungen, Stichwunde Rücken	Skelettmuskel	B	III	I	I
SK 124	W	88	Einblutungen	Skelettmuskel	B	III	0	II
SK 125	W	88	s. SK124	Halsmuskel	B	II	0	II

SK 126	M	60	Einblutungen	Zungenmuskel	B	III	III	III
SK 127	M	60	s. SK126	M. sternocleidomastoideus	B	II	III	II
SK 128	M	60	s. SK126	M. temporalis	B	II	III	III
SK 129	M	81	n.b.	Skelettmuskel	B	0	0	I
SK 130	M	81	s. SK129	Oberarm	B	0	0	I
SK 131	M	81	s. SK129	Skelettmuskel	B	0	0	II
SK 132	M	81	s. SK129	Bizeps	B	II	II	II
SK 133	M	17	Einblutungen	Rippenmuskulatur	B	III	II	I
SK 134	M	49	Stichverletzungen	Rippenmuskulatur	B	II	II	II
SK 135	M	18	Einblutungen Brust	Skelettmuskel Rippe/Brust	B	I	I	II
HZ 66	M	34	Stichverletzungen	Unterblutung Innenhaut Herz	B	II	0	II
HZ 67	M	24	Einblutung Papillarmuskel	Papillarmuskel	B	III	III	II
HZ 68	M	44	frische Gewebsuntergänge nach Schlägerei kurz vor dem Tod	Myokard	B	0	0	I
SK 136	M	81	Einblutung	Halsmuskel	C	I	II	I
SK 137	W	73	Einblutung	Zungenmuskel	C	0	I	0
SK 138	M	60	Einblutungen	Halsmuskel	C	II	III	II
SK 139	W	24	komprimierende Gewalt gegen den Hals	M. sternocleidomastoideus re	D	II	I	II
SK 140	W	28	Einblutung	Halsmuskel	D	0	I	II

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

HZ X	Herzmuskelprobe X
J	Jahre
li	links
M	Männlich
M.	Muskel/ Musculus
n.b.	nicht bekannt
OP	Operation
re	rechts
s.	siehe
SK X	Skelettmuskelprobe X
V.a.	Verdacht auf
W	weiblich
Z.n.	Zustand nach

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ritz-Timme, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Huhn-Wientgen und Herrn Dr. Mayer für die großartige Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Bosilj für die Unterstützung bei den histologischen Färbungen, sowie bei dem Team der Arbeitsgruppe „Kardioprotektion“ der Anästhesiologie für die Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung in jeglicher Form während der Anfertigung dieser Doktorarbeit.