

Natur > wissenschaftliche Berichte > Artikel > Artikel

PDF herunterladen

Artikel | [Offener Zugang](#) | Veröffentlicht: 27. März 2018

Struktur und Verteilung eines bisher unerkannten Interstitiums in menschlichen Geweben

[Petros C. Benias](#) , [Rebecca G. Wells](#) , [Bridget Sackey-Aboagye](#) , [Heather Klavan](#) , [Jason Reidy](#) , [Darren Buonocore](#) , [Markus Miranda](#) , [Susan Kornacki](#) , [Michael Wayne](#) , [David L. Carr-Locke](#) & [Neil D. Theise](#) 

[Wissenschaftliche Berichte](#) **8** , Artikelnummer: 4947 (2018)

325.000 Zugriffe | **322** Zitate | **3539** Altmetric | [Kennzahlen](#)

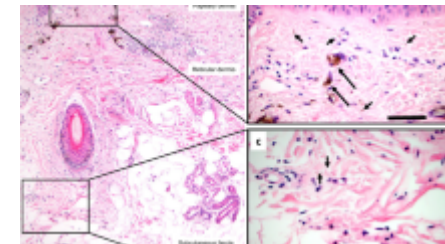
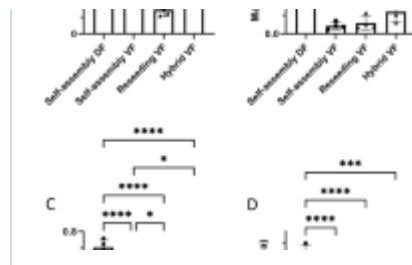
 Eine [Korrektur des Autors](#) zu diesem Artikel wurde am 10. Mai 2018 veröffentlicht.

 Dieser Artikel wurde [aktualisiert](#)

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

innerhalb der mit Fluorescein gefüllten Sinus, für das es keine bekannte anatomische Entsprechung gab. Durch Einfrieren des Biopsiegewebes vor der Fixierung konnte die Anatomie dieser Struktur erhalten werden. Dies belegt, dass sie Teil der Submukosa und eines bisher unbekannten, flüssigkeitsgefüllten Interstitiums ist, das in Lymphknoten drainiert und von einem komplexen Netzwerk dicker Kollagenfaserbündel gestützt wird. Diese Bündel sind einseitig abschnittsweise von fibroblastenähnlichen Zellen ausgekleidet, die mit Endothelmarkern und Vimentin anfärbbar sind. Allerdings existiert eine ungewöhnliche und ausgedehnte, nicht ausgekleidete Grenzfläche zwischen den Matrixproteinen der Bündel und der umgebenden Flüssigkeit. Wir beobachteten ähnliche Strukturen in zahlreichen Geweben, die intermittierender oder rhythmischer Kompression unterliegen, darunter die Submukosa des gesamten Gastrointestinaltrakts und der Harnblase, die Dermis, das peribronchiale und periarterielle Weichgewebe sowie die Faszien. Diese anatomischen Strukturen könnten für die Metastasierung von Krebs, Ödeme, Fibrose und die mechanische Funktion vieler oder aller Gewebe und Organe von Bedeutung sein. Zusammenfassend beschreiben wir die Anatomie und Histologie eines bisher unbekannten, aber weit verbreiteten, makroskopischen, flüssigkeitsgefüllten Raums innerhalb und zwischen Geweben – eine neuartige Erweiterung und Spezifizierung des Konzepts des menschlichen Interstitiums.

Ähnliche Inhalte werden von anderen Nutzern angesehen



Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

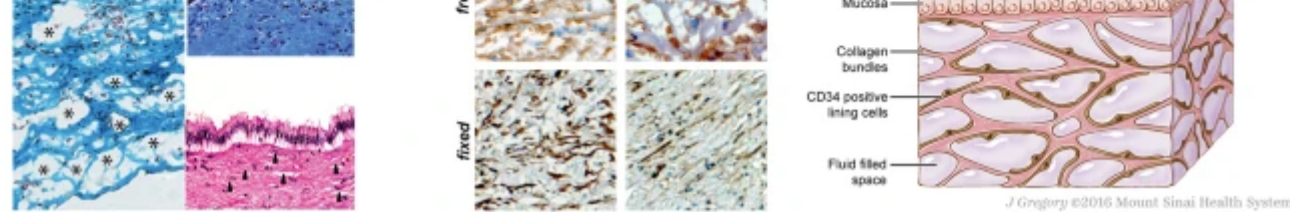
Einführung

Der Interzellularraum ist die Hauptquelle der Lymphe und ein bedeutendes Flüssigkeitskompartiment im Körper. Während die Anatomie und Zusammensetzung des Interzellularraums zwischen den Zellen zunehmend verstanden werden, sind Existenz, Lage und Struktur größerer inter- und intrazellulärer Räume in der Literatur nur ungenau beschrieben. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die sogenannte „Third Spacing“-Phänomene (Ansammlung von Interstitialflüssigkeit) sowie auf den gesamten Interstitialflüssigkeitsfluss und das -volumen relevant, die bisher wenig erforscht wurden¹.

Fortschritte in der *In-vivo*-Mikroskopie eröffnen das Potenzial, neue, funktionell relevante anatomische Strukturen im menschlichen Körper zu identifizieren. So wurden beispielsweise kürzlich erstmals Lymphgefäße im Gehirn mittels *In-vivo*- Multiphotonenmikroskopie durch ein verdünntes Schädelpräparat dargestellt². Die sondenbasierte konfokale Laserendomikroskopie (pCLE) ist eine *In-vivo*-Bildgebungstechnologie, die eine histologische Echtzeit-Beurteilung von Gewebestrukturen während der Endoskopie ermöglicht, in der Regel nach intravenöser Injektion von Fluorescein. Wir und andere haben beobachtet, dass pCLE bei einer festen Brennweite von 60–70 µm in den extrahepatischen Gallengängen und Pankreasgängen ein submuköses „retikuläres Muster“ (Abb. 1A,B) zeigt, das aus 20 µm breiten, dunklen, verzweigten Bändern besteht, die große, mit Fluorescein gefüllte polygonale Bereiche umgeben³. Diese Strukturen weisen keine offensichtliche Entsprechung zu bekannten Strukturen auf. Obwohl Endoskopiker vermutet haben, dass dieses Netzwerk Kapillaren oder Lymphangiolen darstellt³, kann keine dieser Strukturen das netzartige Muster aus dunklen Bändern und hellen, flüssigkeitsgefüllten Räumen erklären.

Abbildung 1

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)



Identifizierung des retikulären Musters im Gallengang und Darstellung des submukösen Raums. (**A** , **B**) Die pCLE-Untersuchung des Gallengangs nach Fluorescein-Injektion zeigt ein retikuläres Muster in einer Tiefe von 60–70 μm . Maßstabsbalken: 20 μm . (**C–E**) Gallengangsgewebe, das während einer Whipple-Operation entnommen wurde, wurde eingefroren und *ex vivo* mittels pCLE untersucht. Dabei zeigte sich das Fortbestehen des retikulären Musters. Maßstabsbalken: 20 μm . (**F**) Ungefärbtes, gefrorenes Submukosagewebe eines Gallengangs, fluoreszenzmikroskopisch dargestellt, zeigt das retikuläre Muster in dieser Schicht der Gallengangswand. Die „hellen“ Bereiche sind nun dunkel (fluoreszierende Flüssigkeit wurde während der Aufbereitung abgeleitet, und die Gewebestrukturen blieben mit Restfluorescein angefärbt). (**G**) Die Masson-Trichrom-Färbung eines frisch gefrorenen Gallengangs zeigt, dass die dunklen Bänder Kollagenbündel (blau) sind (links). Die Abbildung oben rechts zeigt eine Masson-Trichrom-Färbung eines normal präparierten/fixierten Gallengangs desselben Patienten. Es sind Kollapsräume und eine deutliche Verklebung der Kollagenbündel zu erkennen. Unten rechts ist das fixierte Präparat in H&E-Färbung dargestellt; die schmalen Zwischenräume zwischen den Kollagenschichten (Pfeile) entsprechen normalerweise flüssigkeitsgefüllten Räumen, die fast vollständig kollabiert sind. (**H**) Gefrorene (oben) und fixierte (unten) Gallengänge, immungefärbt mit Antikörpern gegen CD34 (links, braun) und D2-40 (rechts, braun), zeigen Zellen, die die Kollagenbündel auskleiden. Man beachte, dass die Bündel oft nur auf einer Seite Zellen aufweisen (20 $\times$, DAB, Hämatoxylin). (**I**) Schematische Darstellung des flüssigkeitsgefüllten Raums, der von einem Netzwerk aus Kollagenbündeln gestützt wird, die einseitig mit Zellen ausgekleidet sind. *Illustration von Jill Gregory . Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Mount Sinai Health System , lizenziert unter CC-BY-ND . (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/legalcode>)*.

Wir vermuteten, dass dieses Muster eine Erweiterung des interzellulären Interstitiums widerspiegelt. Um die mikroanatomischen

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

Bronchialbaum der Lunge sowie die Faszien des Bewegungsapparates und des Fettgewebes ausdehnten. Daraus leiten wir eine umfassende Revision der Makro- und Mikroanatomie des menschlichen Interstitiums ab.

Ergebnisse

Proben wurden aus chirurgischen Präparaten von Gallengängen gewonnen, die im Rahmen von zwölf pankreatikobiliären Operationen reseziert wurden. Wenige Minuten vor der Gefäßligatur und der Resektion des Präparats wurde den Patienten Fluorescein intravaskulär infundiert, wobei das retikuläre Muster mittels pCLE direkt *in situ visualisiert wurde* (Abb. [1A,B](#)). Das Resektionsgebiet wurde anschließend sofort *ex vivo* erneut mit pCLE gescannt, um zu bestätigen, dass das retikuläre Muster und das Fluorescein nach der Resektion intakt waren (Daten nicht gezeigt). Die Präparate wurden dann in Gefrierschnittmedium eingebettet, mittels eines Aerosol-basierten Gefriersprays schockgefroren und erneut abgebildet (Abb. [1C,D,E](#)). Serielle Gefrierschnitte wurden senkrecht zum Betrachtungswinkel des pCLE exakt *en face* der Lumenoberfläche angefertigt, wobei die Schnitte alle 5 µm bis zu einer Tiefe von 60–70 µm markiert wurden. Zusätzlich wurden serielle Gewebeschnitte in der Querschnittsebene angefertigt. Diese Schnitte wurden mittels routinemäßiger Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (Abb. [1F](#)). Dabei zeigte sich, dass das retikuläre Muster mit dicken, fluoreszenzgefärbten Bündeln korrelierte (in pCLE als schwarze Bänder sichtbar). Das Fehlen von Fluoreszenz zwischen diesen Bündeln in den fertigen Präparaten ist auf die Herstellung der Gefrierschnitte (Lufttrocknung, Fixierung und Waschen) zurückzuführen, wodurch die Flüssigkeit aus dem Präparat abfloss.

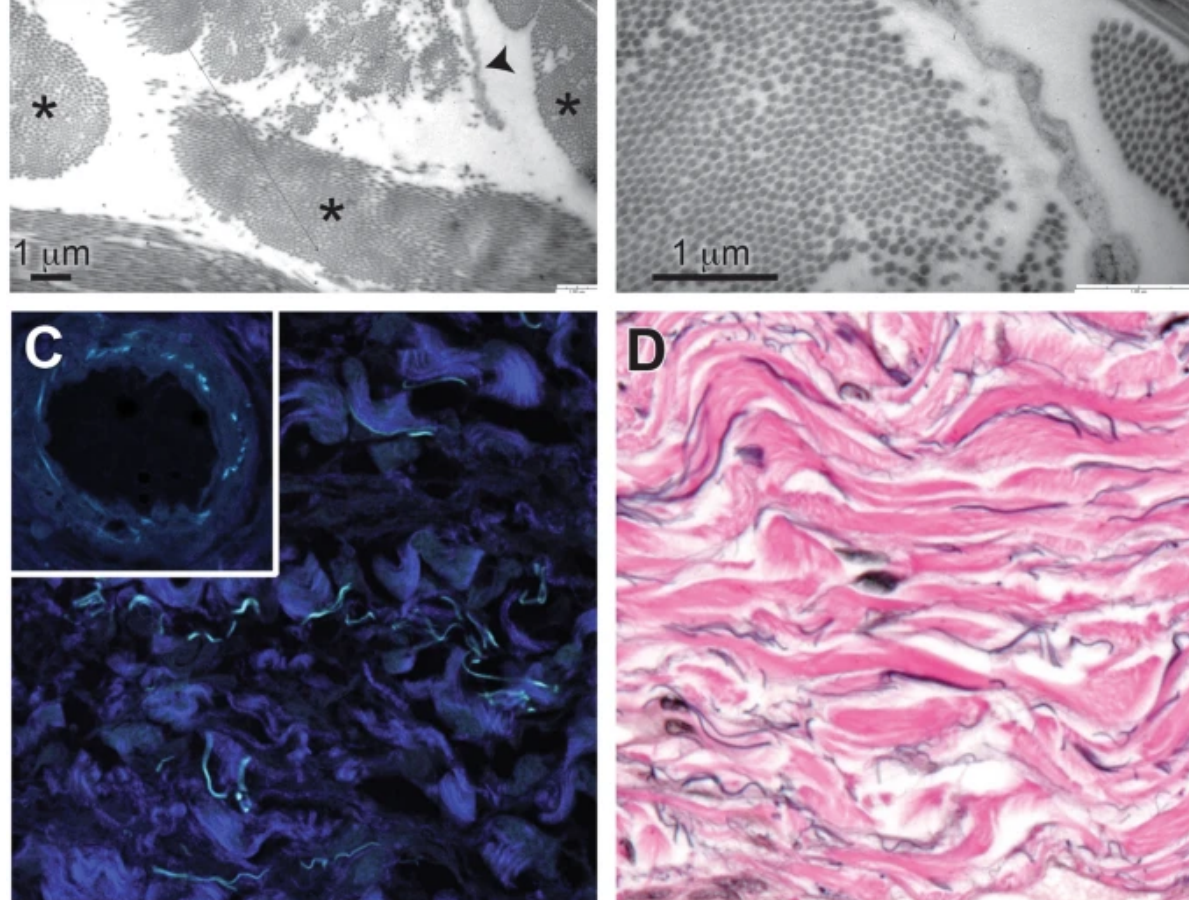
Parallel angefertigte Gefrierschnitte wurden mit Masson-Trichrom-Färbung angefärbt, wodurch das Vorhandensein kollagener Bänder bestätigt wurde, die offene, ehemals flüssigkeitsgefüllte Räume voneinander trennten (Abb. [1G](#), links). Diese Strukturen kolokalisierten

werden, jedoch später als Gefäßstrukturen⁴. Dies legt nahe, dass es sich um eine Form des Interstitiums handelt, in dem sich interstitielle Flüssigkeit oder „Prälymphe“ ansammelt oder bildet. Die Immunfärbung der gefrorenen und fixierten Gallengangssubmukosa zeigte eine positive CD34- und D2-40-Färbung auf einer Seite jedes Kollagenbündels (Abb. 1H). Die Immunfärbung für andere lymphovaskuläre Endothelmarker (CD31, ERG, LYVE-1) war negativ, jedoch einheitlich positiv für den mesenchymalen Marker Vimentin (Daten nicht gezeigt). Färbungen für den myoepithelialen Marker glatte Muskelaktin, den Stammzellmarker CD117 und nukleäres β -Catenin waren negativ (Daten nicht gezeigt). Abbildung 1I ist eine schematische Zusammenfassung der histologischen Befunde.

Ultrastrukturelle Untersuchungen (Abb. 2A,B) zeigen, dass die Kollagenbündel einseitig asymmetrisch von dünnen, flachen Zellen (spindelförmig im Querschnitt) mit spärlichem Zytoplasma und einem länglichen Zellkern ausgekleidet sind. Diese Zellen ähneln Fibroblasten und weisen keine zelltypspezifischen Strukturen auf; insbesondere fehlen ihnen ultrastrukturelle Merkmale, die auf eine endotheliale Differenzierung hindeuten, wie z. B. Pinozytosevesikel und Weibel-Palade-Körper⁵. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen zudem, dass diese Zellen keine Basalmembran besitzen – was darauf schließen lässt, dass sie direkt an den darunterliegenden Kollagenbündeln anhaften – und dass, während eine Seite eines Kollagenbündels von diesen Zellen ausgekleidet ist, die gegenüberliegende Seite in der Regel unbekleidet und direkt der Flüssigkeit im Raum ausgesetzt ist. Die Bündel lassen sich mittels Frequenzverdopplung (Abb. 2C) gut darstellen, was bestätigt, dass es sich um fibrilläres Kollagen handelt⁶. Es wurden auch autofluoreszierende elastische Fasern beobachtet, was durch das ähnliche Erscheinungsbild der elastischen Lamina in Arterien im gleichen Gewebe (Abb. 2C Ausschnitt) und durch eine elastische Van-Gieson-histochemische Färbung (Abb. 2D) bestätigt wurde.

Abbildung 2

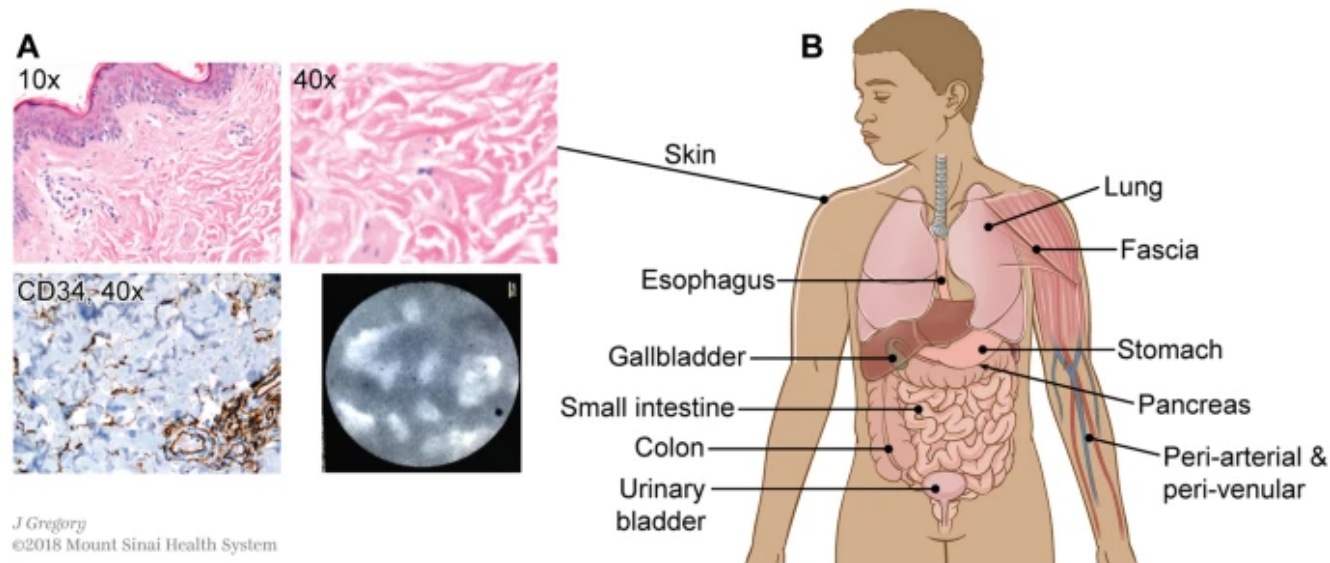
Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)



Strukturelle Beurteilung des Interstitiums. (**A**) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Kollagenbündel (Sternchen), die aus gut organisierten Kollagenfibrillen bestehen. Einige Kollagenbündel weisen an einer Seite eine einzelne flache Zelle auf (Pfeilspitzen). Maßstab: 1 μm . (**B**) Höhere Vergrößerung zeigt, dass die Zellen (Pfeilspitze) keine Merkmale von Endothelzellen oder anderen Zelltypen aufweisen und keine Basalmembran besitzen. Maßstab: 1 μm . (**C**) Die SHG-Bildgebung (Second Harmonic Generation) zeigt, dass es sich bei den Bündeln um fibrilläres Kollagen (dunkelblau) handelt. Die cyanfarbenen Fasern stammen von der Autofluoreszenz und sind wahrscheinlich Elastin, wie die ähnliche Autofluoreszenz in der elastischen Lamina einer nahegelegenen Arterie zeigt (Einsatz) (40 $\times$). (**D**) Die Elastin-van-Gieson-Färbung zeigt

asymmetrisch von flachen Zellen ausgekleidete Kollagenbündel) sind auch in anderen Geweben gut sichtbar. Die Struktur wurde in klinischen Resektionspräparaten der Haut konsistent in der Dermis nachgewiesen (Abb. [3A](#)). Die pCLE-Untersuchung dünner Hautareale *in vivo* nach Fluorescein-Injektion zeigte dasselbe retikuläre Muster in der Dermis wie im Gallengang. Flüssigkeitsgefüllte Räume und von CD34-positiven Zellen ausgekleidete Kollagenbündel finden sich histologisch in verschiedenen Organen und Geweben, darunter in der Submukosa des gesamten Verdauungstrakts, der Harnblase, dem peribronchialen Gewebe, der Faszie sowie im Stroma von Arterien und Venen aller Größen (Abb. [3B](#) und Abb. [S1](#)).

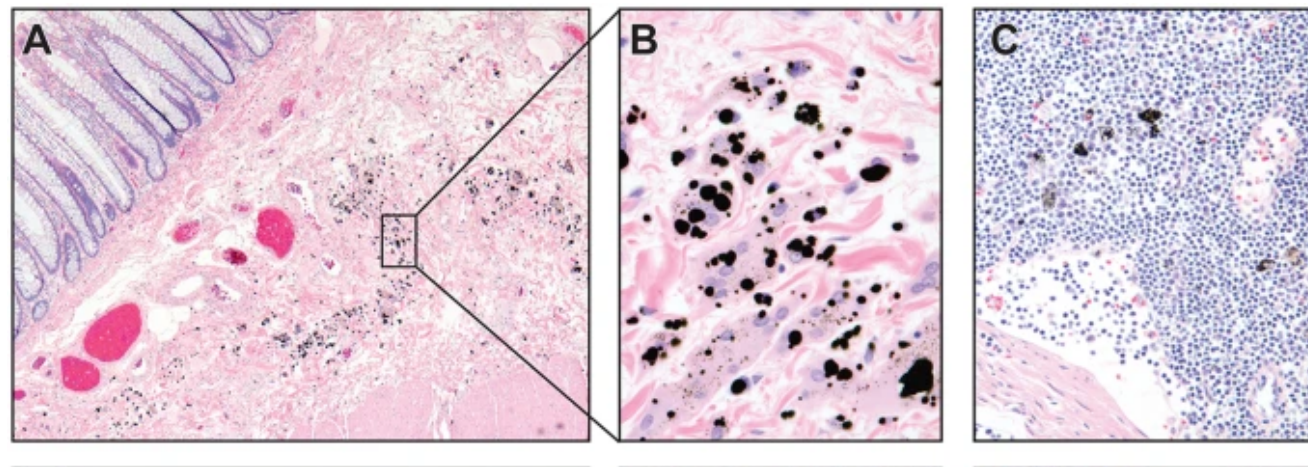
Abbildung 3

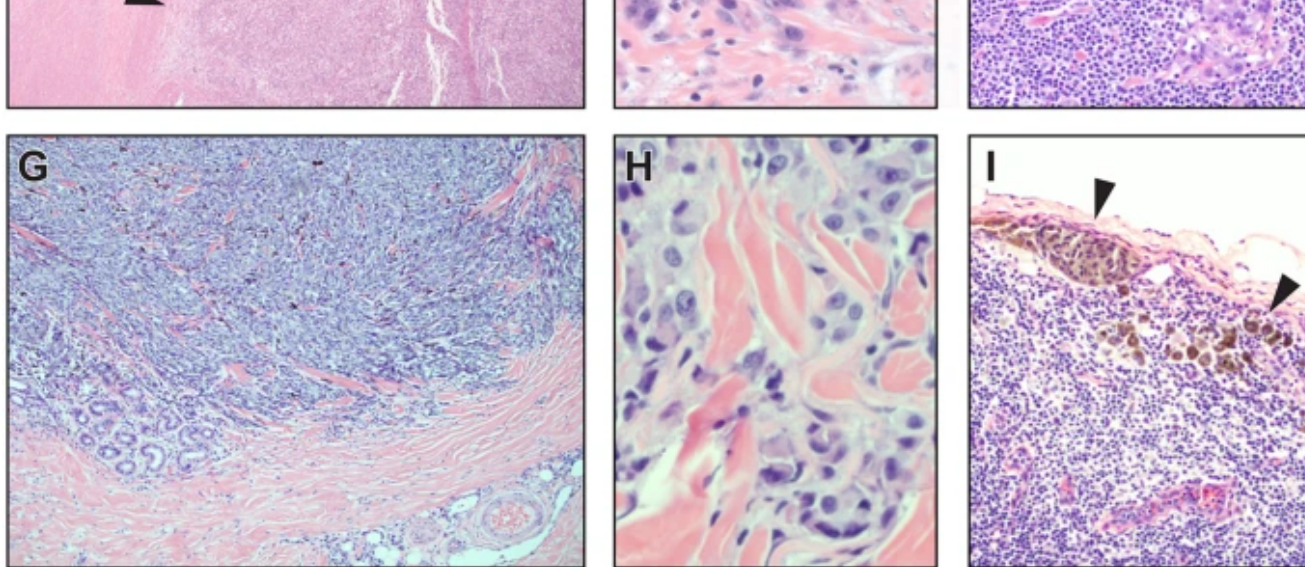


Interstitium findet sich in der Dermis, der Submukosa und anderen fibrokonnektiven Geweben im gesamten Körper. (**A**) Mit H&E gefärbte Haut (oben links 10x, oben rechts 40x) zeigt dieselben Strukturen wie im extrahepatischen Gallengang. Die Immunfärbung für CD34 (unten links,

Diese Strukturen scheinen prälymphatische Räume zu sein, wie die Untersuchung von Resektionspräparaten kolorektaler Karzinome mit submukösen Tätowierungen (Abb. [4A](#)) nahelegt. Hierbei findet sich schwarzes Pigment in Makrophagen des Interstitiums (Abb. [4B](#)) sowie in Makrophagen der zugehörigen, drainierenden mesenterialen Lymphknoten (Abb. [4C](#)). Diese Makrophagen sind in den Interstitialräumen normaler Gewebe nicht zu beobachten und wandern vermutlich als Reaktion auf Fremdmaterial ins Interstitium ein. Die Untersuchung von Dünndarmresektionspräparaten bei inkarzerierten Hernien mit proximaler Darmobstruktion zeigt zudem eine Submukosa mit diffuser Aufspaltung der Kollagenfaserbündel durch proteinhaltige (rosa) Flüssigkeit (Ergänzende Abb. [2](#)), die histologisch Lymphgewebe ähnelt.

Abbildung 4





Kontinuität zwischen Interstitium und drainierenden Lymphgefäßen. (**A–C**) Kolongewebe mit submuköser Tätowierung. (**A**) Schwarzes Pigment wurde endoskopisch vor Resektion eines Kolonkarzinoms in die Submukosa der Kolonwand injiziert (H&E, 10×). (**B**) Schwarzes Pigment findet sich in Makrophagen in den Zwischenräumen der Kollagenbündel (H&E, 40×). (**C**) Pigmenthaltige Makrophagen sind in den mesenterialen Lymphknoten nachweisbar, die das tätowierte Kolon drainieren. Dies zeigt, dass der Interstitialraum funktionell mit der Lymphdrainage des Kolons in Verbindung steht (H&E, 20×). Typische Bilder aus vier unabhängigen Proben. (**D–F**) Magenkarzinom im Stadium T2, schlecht differenziert. (**D**) Das an der Mukosaoberfläche vorhandene Magenkarzinom (Pfeile) infiltriert die Submukosa (Pfeilspitzen); eine tiefere Invasion und lymphovaskuläre Invasion wurden nicht beobachtet (H&E, 4×). (**E**) Schlecht differenzierte Tumorzellen infiltrieren einzeln und in sehr kleinen Gruppen den Interzellularraum der Magensubmukosa und isolieren präexistente Kollagenbündel (H&E, 40×). (**F**) Metastasiertes Karzinom in den drainierenden mesenterialen Lymphknoten des Magenresektionspräparats; klinisch und histologisch wurden keine weiteren Metastasen nachgewiesen (H&E, 20×). (**G–I**) Malignes Melanom im Stadium T2 der Haut des linken Arms. (**G**) Malignes Melanom (dunkelblau) mit Invasion in die Dermis; lymphovaskuläre Invasion nicht nachweisbar (H&E, 4×). (**H**) Maligne Melanomzellen infiltrieren einzeln und in sehr kleinen Gruppen den Interzellularraum der Dermis und isolieren präexistente Kollagenbündel (H&E, 40×). (**I**) Metastasiertes malignes Melanom in drainierenden

and skin (Fig. [4G-I](#), n=2). Stage T2 invasion of the stomach is defined as invasion into the submucosa, but no deeper. T2 invasion into the skin, likewise, indicates invasion directly into the dermis, but no deeper. Invasion by poorly differentiated invasive gastric carcinoma (Fig. [4D](#)) shows spread through the interstitial space, surrounding still intact collagen bundles (Fig. [4E](#)); despite no demonstrable lymphovascular invasion in this specimen, there is metastasis to a draining mesenteric lymph node (Fig. [4F](#)). In a malignant melanoma arising on the upper arm and invading directly into dermis (Fig. [4G](#)), there is similar spread through the interstitial space with isolation of collagen bundles (Fig. [4H](#)); again, despite absence of demonstrable lymphovascular invasion, there is metastasis to a draining axillary lymph node (Fig. [4I](#)). In both cases, there were no other lesions or routes of spread identified even after complete clinical and histologic examination of the patients.

Discussion

We propose here a revision of the anatomical concepts of the submucosa, dermis, fascia, and vascular adventitia, suggesting that, rather than being densely-packed barrier-like walls of collagen, they are fluid-filled interstitial spaces. The presence of fluid has important implications for tissue function and pathology. Our data comparing rapidly-biopsied and frozen tissue with tissue fixed in a standard fashion suggest that the spaces we describe, supported and organized by a collagen lattice, are compressible and distensible and may thus serve as shock absorbers. All of the organs in which we have detected this structure are subject to cycles of compression and distension, whether relatively constant (lungs, aorta) or intermittent (digestive tract after a meal, urinary bladder during micturition, skin under mechanical compression, fascial planes during action of the musculoskeletal system). The dermal interstitium and the fascial interstitium may be mechanistically important in explaining edema (as with the pre-obstructed bowel in Supplemental Fig. [2](#)). "Third spacing" in post-operative lymphedema (as when draining nodes are excised) and anasarca due to liver,

Endoscopic ultrasound of the bile duct shows that it consists of three layers, the middle one of which comprises 90% of the wall thickness and is fluid filled⁷; it corresponds to the submucosal interstitium. Submucosal spaces of other viscera, the dermis, and fascia appear heterogeneous by ultrasound, typically indicative of fluid or adipose tissue, while truly dense collagenized stroma, such as in tendons and ligaments, appears dark by ultrasound^{8,9,10,11}. Additional support for our observations is found in published ultrastructural studies of skin, vermiform appendix, and peri-aortic adventitia, which also appear to have included these structures, although they were not well characterized^{12,13,14}. In the liver, the previously identified “space of Mall” in the portal region may represent this interstitium¹⁵. Indeed, Mall’s original drawings, derived from injection studies, appear to represent the same structures we identify here¹⁶.

The nature of the lining cells is unclear. While cells of the extrahepatic bile duct stained for both CD34 and D2-40, D2-40 staining was absent in all other tissues examined. Vascular endothelial cells also co-express CD34 and vimentin, but the lack of endothelial features on electron microscopy excludes this classification for the interstitial lining cells we observe, suggesting instead that they are a novel, CD34-positive form of fibroblast or even mesenchymal stem cell¹⁷. Whether they are the cells that deposit the collagen bundles is unknown; if so, they would be important in scar formation in wound healing. Notably, keloid scars show collagen bundles and large spaces that appear to be an exaggeration of these structures in the underlying dermis¹⁸. Recent data showing that keloid scars appear in regions of skin under high tension raise questions about the impact of mechanical forces and fluid flow on the structures and cells of this space¹⁹.

It is likely that the submucosal interstitium we describe corresponds to the interstitial spaces described in studies of metastasizing cell clusters²⁰. The presence of a network of submucosal channels in the digestive and urinary tracts could explain the greatly increased likelihood of metastasis by luminal invasive tumors once they reach the submucosa. As illustrated by the spaces we show of invasive

pressure on skin) could further promote spread through these spaces. If the interstitial lining cells are the precursors of fibrogenic myofibroblasts, they might also function as first responders in peri-tumoral sclerosis of the pancreatico-biliary tree, tubular digestive tract, bronchial tree, urinary bladder and skin. Indeed, a unique population of CD34/vimentin co-expressing peritumoral fibroblasts has been reported²¹. These cells could also serve important roles in non-malignant sclerotic conditions including biliary atresia and primary sclerosing cholangitis in the biliary tree, scleroderma in the dermis and esophagus, and inflammatory bowel disease in the digestive tract. Ongoing studies are focused on characterizing these cells and their functions.

The flow of interstitial fluid through the submucosal space of the luminal GI tract is likely guided by peristalsis, in parallel with luminal contents. If there is communication between the gut lumen and the submucosal space, this raises the possibility that cell signaling (including hormonal or immunologic signals) could be regulated in a proximal-to-distal manner determined by the speed of peristalsis. Immunologic interactions in this interstitial space could also be important in inflammatory conditions such as primary sclerosing cholangitis, chronic pancreatitis, inflammatory bowel disease and scleroderma. Interestingly, while macrophages were not seen in these spaces in the normal tissues examined, they clearly traffic into the space to take up the tattoo pigment after submucosal injection (Fig. [4A–C](#)).

The collagen bundles in the interstitial space are lined on only one side by cells, implying that the collagen matrix on the opposite side is in direct contact with interstitial fluid. There are few examples known in the human body other than the interstitial space between cells, the renal glomerulus and the space of Disse, where fluid is in direct contact with matrix proteins without an intervening cell barrier. Collagen fibers, which are charged molecules, may form an important physiologically active surface. Whether cells of the immune system or other cells passing through the space interact with the collagen bundles is a highly physiologically relevant question that requires further investigation.

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

setting of disease, including fibrosis and metastasis. A submucosa subjected to directional, peristaltic flow is not the previously envisaged wall of dense connective tissue, but a potential conduit for movement of injurious agents, pro-fibrogenic signaling molecules, and tumor cells. This raises the possibility that direct sampling of the interstitial fluid could be a diagnostic tool. Finally, our study demonstrates the power of *in vivo* microscopy to generate fresh insights into the anatomy and physiology of normal and diseased tissues.

Methods

Patients and tissue specimens

Thirteen patients undergoing surgical resection of the biliary tree at Mount Sinai Beth Israel were recruited to participate in this study between July 2012 and Dec 2013. The study was conducted with the approval of and in accordance with the relevant guidelines and regulations of the Icahn School of Medicine at Mount Sinai (Mount Sinai Beth Israel Medical Center) Institutional Review Board (IRB). Written informed consent was obtained from all patients for participation in the study (including intraoperative injection with fluorescein and pCLE) and examination of the resected specimen under microscopy to assess surgical margins with probe based confocal laser endomicroscopy (pCLE). Inclusion criteria included the ability to give informed consent and age above 18 years old. Additional tissues for study from other organs were obtained from fixed archival materials, exempt from IRB review.

... ..

Samples were obtained from patients who were injected with fluorescein (common bile duct=10, pancreatic duct=3, duodenum=3, lymph node=1) and from uninjected control patients (common bile duct=3, pancreatic duct=1, duodenum=1, lymph node=1). Some surgical samples were large enough to enable us to study several different tissues.

Sample Processing and Evaluation

Specimens were scanned with pCLE (Mauna Kea Technologies, Cellvizio® Cholangioflex miniprobe) *ex vivo* immediately after removal, confirming that the reticular pattern and the fluorescein were intact. Specimens were then embedded in glycerin-based OCT freezing medium and rapidly frozen using an aerosol-based freezing spray (Thomas® Cyto-Freeze) to ensure fluorescein retention and minimal water crystal formation. The specimens were either embedded with the luminal side up or in cross section. Some specimens were large enough to be bisected and evaluated in both planes. All specimens were stored at –20 °C. Beginning at the luminal surface of the *en face* bile ducts and pancreatic ducts, frozen sections were cut consecutively at 5 µm thickness to a depth of 60–70 µm. We also performed serial sections of tissue in a cross-sectional plane to the bile duct.

Specimens were mounted on glass slides without fixative and air-dried, after which they were treated using a xylene-based frozen section protocol, coverslipped and evaluated and photographed using a fluorescent microscope with a FITC excitation filter (475–490 nanometers).

with PBS, 4 µm sections were subjected to biotinylated secondary antibody and thereafter to avidin-biotinylated enzyme reagent (avidin-biotinylated horse radish peroxidase). After incubation with 1–3 drops peroxidase substrate (DAB-3,30-diaminobenzidin; 0.6 mg/ml H₂O₂, 0.3% in 0.01M Tris-HCl buffer pH 7.6) and subsequent washing in deionized H₂O, sections were counterstained with Gill's hematoxylin and mounted under xylene-based crystal mount.

Electron Microscopy

Specimens for Electron Microscopy were fixed in Karnovsky fixative, postfixed in 1% phosphate-buffered osmium tetroxide, and embedded in standard fashion. ~80 nm epoxy sections were cut on an AO/Reichert Ultracut, stained with uranyl and lead salts, and examined in a Zeiss EM 900 electron microscope @80 kV.

Second Harmonic Generation Analysis

Collagen second harmonic generation (SHG) microscopy was performed on unstained slides using a Leica TCS-SP5 Confocal/Multiphoton Microscope with a Coherent Chameleon Ultra II laser tuned to a wavelength of 900 nm. Images were acquired with non-descanned detectors.

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

Change history

10 May 2018 A correction to this article has been published and is linked from the HTML and PDF versions of this paper. The error has not been fixed in the paper.

References

1. Aukland, K. Distribution of body fluids: local mechanisms guarding interstitial fluid volume. *J. Physiol. (Paris)* **79**, 395–400 (1984).
2. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. **523**, 337–341 (2015).
3. Loeser, C. S., Robert, M. E., Mennone, A., Nathanson, M. H. & Jamidar, P. Confocal endomicroscopic examination of malignant biliary strictures and histologic correlation with lymphatics. *J. Clin. Gastroenterol.* **45**, 246–252 (2011).
4. Benias, P. C. *et al.* Needle-based confocal Endomicroscopy for evaluation of malignant lymph nodes - a feasibility study. *Endoscopy* **48**, 923–928 (2016).
5. Tse, D. & Stan, R. V. Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 236–245 (2010).

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

7. Takaqi, T., Irisawa, A. & Shibukawa, G. Intraductal ultrasonographic anatomy of biliary varices in patients with portal hypertension. *Endoscopic Ultrasound*. **4**, 44–51 (2015).

8. Chung, I. K. & Hawes, R. H. Advantages and limitations of endoscopic ultrasonography in the evaluation and management of patients with gastrointestinal submucosal tumors: a review. *Rev. Gastroenterol. Disord*. **7**, 179–192 (2007).

9. Patil, P. & Dasgupta, B. Role of diagnostic ultrasound in the assessment of musculoskeletal diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis*. **4**, 341–355 (2012).

10. Sharma, M., Rai, P., Rameshbabu, C. S. & Senadhipan, B. Imaging of peritoneal ligaments by endoscopic ultrasound (with videos). *Endosc. Ultrasound*. **4**, 15–27 (2015).

11. Wortsman, X. & Wortsman, J. Clinical usefulness of variable-frequency ultrasound in localized lesions of the skin. *J Am Acad Dermatol* **62**, 247–256 (2010).

12. Smith, L. T. & Holbrook, K. A. Development of dermal connective tissue in human embryonic and fetal skin. *Scan. Electron. Microsc.* **4**, 1745–1751 (1982).

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

14. Keech, M. K. Electron microscope study of the normal rat aorta. *J, Biophys, Biochem, Cytol.* **7**, 533–538 (1960).

15. Niiro, G. K. & O'Morchoe, C. C. Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat. *Anat. Rec.* **215**, 351–360 (1986).

16. Mall, F. P. A study of the structural unit of the liver. *Amer. J. Anatomy* **5**, 1–82 (1906).

17. Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S. & Hopkinson, A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* **32**, 1380–1389 (2014).

18. Berman, B., Maderal, A. & Raphael, B. Keloids and hypertrophic acars: pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol. Surg.* **43**(Suppl 1), S3–S18 (2017).

19. Huang, C. *et al.* Keloid progression: a stiffness gap hypothesis. *Int Wound J.* **14**, 764–771 (2017).

20. Alexander, S., Weigelin, B., Winkler, F. & Friedl, P. Preclinical intravital microscopy of the tumour-stroma interface: invasion, metastasis, and therapy response. *Curr Opin Cell Biol.* **25**, 659–671 (2013).

22. Benias, P. C., Gopal, K., Bodenheimer, H. Jr. & Theise, N. D. Hepatic expression of toll-like receptors 3, 4, and 9 in primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis C. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **36**, 448–454 (2012).

Acknowledgements

We are grateful to Gordon Ruthel and the University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine Microscopy facility, to Jill Gregory (Mt. Sinai Health System) for illustrations, and to Drs Stella Gordin, Syed Hoda, and Hui Tsou (Department of Pathology, New York University School of Medicine) for assistance in identifying clinical tissue specimens. This work was funded in part by a grant from the National Institutes of Health (DK081523) to R.G.W. This work was also supported by the Center for engineering MechanoBiology (CEMB), an NSF Science and Technology Center, under grant agreement CMMI: 15-48571.

Author information

Petros C. Benias and Rebecca G. Wells contributed equally to this work

David L. Carr-Locke and Neil D. Theise jointly supervised this work.

Authors and Affiliations

Department of Medicine, Division of Digestive Diseases, Mount Sinai Beth Israel Medical Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, 10003, USA

Department of Bioengineering and Center for Engineering MechanoBiology, School of Engineering and Applied Sciences, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, 19104, USA

Rebecca G. Wells

Department of Pathology, Mount Sinai Beth Israel Medical Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, 10003, USA

Jason Reidy, Darren Buonocore & Neil D. Theise

Department of Pathology, New York University School of Medicine, New York, New York, 10016, USA

Susan Kornacki & Neil D. Theise

Department of Surgery, Mount Sinai Beth Israel Medical Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, 10003, USA

Michael Wayne

The Center for Advanced Digestive Care, Weill Cornell Medicine, New York Presbyterian Hospital, 1305 York Avenue, 4th Floor, New York, New York, 10021, USA

David L. Carr-Locke

Contributions

P.C.B., D.L.C-L., N.D.T., R.G.W. conceived the project and developed study design. P.C.B., M.W. obtained intraoperative samples of biliary tree. N.D.T. oversaw and/or performed histologic and ultrastructural analyses of all tissues. S.K. assisted with tissue selection and preparation, image analysis and capture. M.M. performed histologic image acquisition and analysis of gastrointestinal specimens. P.C.B., H.K., D.B. performed frozen section analyses. R.G.W., B.S.-A. performed all second harmonic generation studies. J.R. performed electron microscopy. N.D.T., R.G.W., P.C.B. co-wrote the manuscript text. D.L.C-L. edited and revised the manuscript. All authors had final approval of the submitted manuscript.

Corresponding author

Correspondence to [Neil D. Theise](#).

Diese Website verwendet ausschließlich Cookies, die für ihren Betrieb notwendig sind. Sie ermöglichen grundlegende Funktionen wie Sicherheit, Netzwerkverwaltung und Barrierefreiheit. Diese Cookies können in unseren Systemen nicht deaktiviert werden. Sie können sie zwar in Ihren Browsereinstellungen deaktivieren, dies kann jedoch die Funktionalität der Website beeinträchtigen. Weitere Informationen zur Verarbeitung Ihrer Daten finden Sie in unserer Datenschutzerklärung. [Zurückweisen](#)

Dr. Theise has received travel sponsorship for attendance at a Mauna Kea Technology sponsored scientific conference. Dr. Benias has received sponsorship for attendance at a Mauna Kea Technology sponsored scientific conference. Dr Carr-Locke has received royalties from US Endoscopy and Telemed Systems, has been a consultant for Boston Scientific Endoscopy, Cook Medical, EndoChoice, Mauna Kea Technologies, and Olympus Corporation, and holds a patent with ValenTx.

Additional information

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

Electronic supplementary material

[Supplementary Figures and Legends 1 and 2](#)

Rights and permissions

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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material.

© 2021 The Author(s). All rights reserved. This article is published with open access at [link.springer.com](#)

Cite this article

Benias, P.C., Wells, R.G., Sackey-Aboagye, B. *et al.* Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci Rep* **8**, 4947 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23062-6>

Received	Accepted	Published
18 May 2017	06 March 2018	27 March 2018

Version of record

27 March 2018

DOI
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23062-6>

Share this article

Anyone you share the following link with will be able to read this content:

Get shareable link

Provided by the Springer Nature SharedIt content-sharing initiative

Subjects [Bile ducts](#) • [Bladder](#) • [Confocal microscopy](#) • [Gastrointestinal system](#) • [Haemic and immune systems](#)

Where does the fluid go?

Robert G. Hahn

Annals of Intensive Care (2025)

Length and time scales bridge poroelasticity and tissue architecture

Yogesh Saravanan , Claire Valotteau ... Ramray Bhat

Journal of Biosciences (2025)

Structural characterization of SLYM—a 4th meningeal membrane

Virginia Plá , Styliani Bitsika ... Kjeld Møllgård

Fluids and Barriers of the CNS (2023)

Hypovolemia with peripheral edema: What is wrong?

Randal O. Dull & Robert G. Hahn

Critical Care (2023)
