

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

99 058

# ÖZOFAGUS ATREZİSİ SIÇAN MODELİNDE İNTRİNSİK SİNİR SİSTEMİ İLE MATRİKS PROTEİNLERİNİN İLİŞKİSİ

İSTANBUL KÜLTÜR VE TURİZM BAKANLIĞI  
KÜLTÜR VARLIKLARINI KORUMA VE  
YERLEŞTİRME MÜDÜRLÜĞÜ

DR. HALİL TUĞTEPE  
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL  
2000

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kısaltmalar	1
Giriş	2
Genel Bilgiler	5
Özofagus Anatomisi ve Fizyolojisi	5
Embriyolojik Gelişim	11
Özofagusun Normal Embriyolojik Gelişimi	13
Özofagus Atrezisi	15
Özofagus Atrezisi Embriyolojik Gelişim Teorileri	17
Özofagus Atrezisi Hayvan Modelleri	22
Enterik Sinir Sistemi	22
Eksrasellüler Matriks Proteinleri	23
Gereç ve Yöntem	28
Histopatolojik İnceleme	30
İstatistik Çalışması	33
Bulgular	34
Tartışma	44
Gereç ve Yöntem İrdelenmesi	44
Bulguların İrdelenmesi	46
Sonuç	55
Özet	56
Kaynaklar	57

## KISALTMALAR

ÖA	Özofagus atrezisi
GER	Gastro-özofageal reflü
ESM	Ekstrasellüler matriks
GAG	Glikoaminoglikan
ÜÖS	Üst özofagus sfinkteri
AÖS	Alt özofagus sfinkteri
VIP	Vazoaktif intestinal peptid
TÖS	Trakeo-özofageal septum
TÖF	Trakeo-özofageal fistül
GP	Glikoprotein
PG	Proteoglikan
HH	Hirschsprung hastalığı

## GİRİŞ

Özofagus motilite bozukluğu, özofagus atrezisi (ÖA) ameliyatı geçirmiş hastalarda, sık karşılaşılan sorunlardan biridir ve geç dönemde yutma zorluğu, kusma, gastroözofageal reflü (GER) ve sık akciğer enfeksiyonları gibi yakınmalara neden olur<sup>(1,2)</sup>. Bu yüzden, mortalite ve morbiditeyi etkileyen önemli komplikasyonlardan biri olarak kabul edilir.

Bu temel problemin sebebinin primer (doğumsal nöromüsküler anomali) veya sekonder (ameliyat sırasında özofagus ekstrinsik sinir sistemine zarar verilmesi gibi) nedenlere bağlı olabileceği biliniyorsa da, etiyojisi tam olarak ortaya konamamıştır.

ÖA'lı yenidoğanların ameliyat öncesi proksimal ve distal poşlarda yapılan manometrik incelemelerinde; 1987 yılında Romeo ve ark., 1998 yılında da Montgomery ve ark. özofagus motilitesinde bozukluk olduğunu saptamışlardır<sup>(2,3)</sup>. Shono ve ark. ise 1993 yılında da benzer bir çalışmada motiliteyi normal olarak bulmuştur<sup>(4)</sup>. Davies 1996 yılında ÖA'lı bir kadavrada yaptığı primer onarımda diseksiyon sırasında ekstrinsik sinir sistemine zarar verildiğini göstermiştir<sup>(5)</sup>. ÖA ameliyatları sonrasında yapılan tüm manometri incelemelerinde ise motilite bozukluğu saptanmıştır.

Tovar ve ark. tarafından 1995 yılında, tipleri ve eşlik eden anomalileri yönünden insanlarda görülen ÖA'ya yakınlık gösteren bir hayvan modeli oluşturulmasıyla, ÖA'da merak edilen konuların irdelenmesine olanak sağlanmıştır<sup>(6)</sup>. Adriamisin verilerek oluşturulan bu sıçan modeli oldukça kabul görmüş ve ÖA'da cevaplanamamış sorular hızla araştırılmaya başlanmıştır.

ÖA'lı sıçan modelinde yapılan ilk çalışmalarda, sıçanlarda ÖA'nın embriyolojik dönemdeki oluş zamanı, oluş mekanizması, apoptozis, trakeomalazi ve eşlik eden anomaliler hakkında bilgi edinmeye çalışılmıştır (6,7,8,9,10). Ancak, ÖA'da motilite sorununa ışık tutabilecek az sayıda çalışma yapılmıştır. Qi ve ark. 1997 yılında yaptığı çalışmada ÖA sıçan modelinde, özofagusu innerve eden vagus ve reküren larengeal sinirlerin, kontrol grubuna göre daha farklı yapıda olduğunu saptamıştır (11). Cheng ve arkadaşları 1999 yılında, aynı model ÖA'daki özofagus enterik sinir morfolojisinin, Qi ve ark. da özofagus intrinsik sinir sisteminin bozuk olduğunu göstermiştir (12,13).

Tüm bu çalışmalar ÖA'da motilite bozukluğunun, özofagusu innerve eden ekstrinsik ve/veya intrinsik sinir sisteminin doğumsal bozukluğuna da bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşın, ÖA'nın intrinsik sinir sistemindeki bozukluğunun nedenini araştırarak çalışma yapılmamıştır.

Nöral krest hücrelerinin göç yolları araştırıldığında ekstrasellüler matriks (ESM) tarafından oluşturulan fibrilli ve granüllü bir ağ sayesinde, göçün sağlandığı saptanmıştır. Bu amaçla ESM'nin yapısal ve moleküler özellikleri incelendiğinde ise yalnızca göçü kolaylaştırmakla kalmayıp, intrinsik sinir sisteminin olgunlaşmasında da yardımcı olduğu bulunmuştur(14).

Yapılan çalışmalarda hyaluronik asit, fibronektin ve lamininin intrinsik sinir sisteminin hücresiz göç yolunda, göçten önce yüksek konsantrasyonda, göç tamamlandıktan sonra da azalmış konsantrasyonlarda olduğu saptanmıştır. Sülfatlanmış glikoaminoglikanların(GAG) ise önce göç sırasında göreceli olarak arttığı daha sonra ise azaldığı görülmüştür. Bu nedenle GAG'ın

sadece göçü kolaylaştırmakla kalmayıp göçün sonlanması ve ganglion formasyonunda tetiği çeken mekanizma rolünü üstlendiği, fibronektinin ise nöral krest hücreleri için kemokinetik ve kemotaktik bir göreve sahip olduğu bulunmuştur<sup>(14)</sup>.

Bu tez çalışmasında da, ÖA sıçan modelinde, gestasyonel dönemde intrinsik sinir sisteminin göçünde ve olgunlaşmasında rol oynayan ESM proteinlerinin, etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### ÖZOFAGUS ANATOMİSİ ve FİZYOLOJİSİ

#### Özofagus Anatomisi :

Özofagus, 6. servikal vertebra ile 11. torasik vertebra arasında yer alan müsküler bir tüptür. Uzunluğu, kişinin boyu ve yaşına bağlı olarak 13 – 25 cm arasında değişir. Üst tarafta, krikoid kıkırdak seviyesinden farenksin devamı olarak başlar ve altta abdomende mide ile birleştiği yere kadar uzanır. Anatomik olarak üç kısıma ayrılır:

1. Servikal zofagus : Orta hattın hemen solunda, trakea ve larenksin arkasında, servikal fasyanın hemen önünde yer alır.
2. Torasik zofagus : Bu bölümün üst kısmı, sağ tarafa doğru kıvrılarak trakeal bifürkasyon ve sol ana bronşun arkasından geçer. Alt kısmı, perikardium ve sol atriumun arkasından sol tarafa yönelerek özofageal hiatustan abdomene girer.
3. Abdominal zofagus : Yaklaşık 2-4 cm uzunluğundadır ve mide ile birleşerek sonlanır.

Anatomik olarak üç yerde normal daralma gösterir. Birincisi; krikoid kıkırdağın bulunduğu kısım, ikincisi; sol ana bronşun ve aortik arkın geçtiği yer, üçüncüsü; diyafragmatik hiatusun çevrelediği kısım. Bunun yanında, işlevsel olarak da iki yerde darlık mevcuttur; üst özofagus sfinkterleri (S) ve alt özofagus sfinkteri (AS) <sup>(15)</sup>.

### **Özofagus Duvar Yapısı :**

Özofagus duvarı içten dışa doğru; mukoza, submukoza, kas ve eksternal fibröz tabakalardan meydana gelir.

Özofagus mukozası, skuamoz epiteldir. Özofago-gastrik bileşkede, kardiyanın kolumnar epiteli ile keskin bir sınır oluştururlar ve bu alana “Z” hattı adı verilir. Elastik ve fibröz dokulardan oluşan submukoza, özofagusun en kuvvetli tabakasını meydana getirir. Ayrıca kan damarları, lenfatik ağ, sinirler ve mukus bezleri de yer alır.

Kas tabakası, içte sirküler, dışta longitüdüinal kas tabakasından oluşur. İki kas tabakası birbirinden ince bir bağ dokusu ile ayrılırlar. Özofagus kas tabakasının 1/3 üst kısmını çizgili kas, 2/3 alt kısmını da düz kas oluşturur.

ÜÖS; krikofarengial kasla özofagus kas tabakasının birleşimi ile meydana gelir. AÖS, her ne kadar bazı araştırmacılar tarafından, alt özofagusda manometrik yüksek basınç alanında sirküler kasların kalınlaşması olarak tarif edilse de, ayrı bir anatomik alan değildir. Ameliyatlarda da bu sfinkter kısmını ayrı bir alan olarak gösterecek kanıt yoktur.

Gastrointestinal sistemin bir çok kısmından farklı olarak özofagusun seroza tabakası yoktur. Eksternal fibröz tabaka, gevşek bağ dokusundan oluşur ve özofagusu bir zar gibi sararak çevre dokulara tutunmasını sağlar. Eksternal fibröz tabaka ile kas tabakası arasında kan damarları, lenfatik kanallar ve sinir lifleri seyredir<sup>(15,16)</sup>.

### **Kan Damarları :**

Özofagusu besleyen kan damarları dört ana kaynaktan gelir. İnfirior tiroid damardan gelen dallar servikal özofagusu, bronşial arter sistemi torasik özofagusun üst kısmını, torasik aorttan doğrudan gelen damarlar ise torasik özofagusun orta kısmını beslerler. Torasik özofagusun alt kısmına ve abdominal özofagusu gelen damarlar ise sol gastrik ve inferior frenik arterlerden çıkarlar. Sol gastrik arterden çıkan dallar (2 – 6 adet), alt özofagusun anterior ve sağ yüzüne ulaşırlar. Tüm ana damarlar özofagus duvarına girdikten sonra küçük dallara ayrılarak tüm katları beslerler ve özofagus boyunca uzanarak birbirleri ile anastomoz yaparlar.

Özofagus venleri anlam kolaylığı için iki gruba ayrılır ; intrinsik ve ekstrinsik. İntinsik venler yoğun submukozal venöz pleksusu oluştururlar ve özofagus etrafında boylamasına yer alan ekstrinsik periözofageal venlerle birleşirler. Boyun bölgesinde bu venler inferior tiroid venlere, toraks bölgesinde ise hemiazigos ve azigos venlerine boşalırlar. Alt kısımdaki venöz sistem sol gastrik vene boşaldığı için, kaval ve portal sistem submukozal venlerle ilişki içindedir. Portal hipertansiyon varlığında bu kısımdaki submukozal venler büyük varislere dönerler<sup>(15,16)</sup>.

### **Özofagus Sinir İnnervasyonu :**

Özofagusun innervasyonu, otonom sinir sisteminin viseral (splanknik) kısmı ile olmaktadır. Bu sistem, özofagus viseral kısmının, kan damarlarının, salgı bezlerinin ve düz kasların innervasyonundan sorumludur. Birbirlerinin karşı yönünde çalışan iki bölümden oluşur; sempatik ve parasempatik sistem. Eferent sempatik sistem, vasokonstriksiyon, sfinkterik kontraksiyon ve

duvar kaslarının relaksasyonundan sorumlu iken parasempatik afarent sistem de gastrointestinal sistemin peristaltizminden ve salgı bezlerinin işlevinden sorumludur.

Sempatetik innervasyon, boyunda superior ve inferior servikal ganglionlardan, toraksta splanknik, abdomende çöliak ganglionlardan gelen dallarla sağlanır. Bir kısım sinir lifleri de vagus siniri tarafından taşınarak özofagusa ulaşır. Myenterik pleksusta, sempatik sinir sistemi de bulunur. Motor işlevi olmamasına karşın kısmen diğer sinirlerin işlevlerinde yardımcı olurlar.

Parasempatik sinir desteği, dorsal vagal çekirdekten köken alan, 10. kranial sinir olan vagus tarafından sağlanmaktadır. Hem afarent hem de eferent lifler taşımaktadır. Vagus sinirleri, boyundan başlayarak özofagusun her iki tarafından aşağı doğru seyrederek ve torasik özofagusa gelince, akciğer hilusunun arkasında, pulmoner ve özofageal olmak üzere iki grupta geniş pleksuslar oluştururlar. En önemli dalı olan reküren larengeal sinir, sağ tarafta subklavian arterin , sol tarafta ise aortik arkın altından dönerek, trakeo-özofageal oluktan yukarı doğru seyrederek. Diyafragma seviyesinde sol vagus siniri anteriora, sağ vagus siniri posteriora geçer ve buralarda dallar verirler.

Üst özofagus ve farenksin çizgili kaslarının innervasyonu beyin sapından (nukleus ambiguus) köken almaktadır. Distal özofagus ve AÖS'yi innerve eden sinirler ise, vagusun dorsal motor çekirdeğinden çıkıp, myenterik pleksusun ganglionlarında sonlanır.

Myenterik pleksuslar sirküler ve longitudinal kas tabakaları arasında ve submukozada bulunup, beyin sapından eferent, özofagustan da afarent uyarıları almaktadırlar. Özofagus myenterik pleksuslarda iki çeşit nöron mevcuttur :

1. Uyarıcı nöronlar : Kolinerjik reseptörler ile özofagus kas tabakasının kasılmasını sağlarlar.
2. İnhibe eden nöronlar : Kas tabakasını vazoaaktif intestinal peptid (VIP), nonadrenerjik-nonkolinerjik peptidler yolu ile etkilerler<sup>(4,11,15,16)</sup>

## ÖZOFAGUSUN İŞLEVLERİ

Özofagusun işlevleri üç kısımda incelenebilir:

1. Üst özofagus sfinkteri
2. Gövde
3. Alt özofagus sfinkteri

ÜÖS; dil, farenks ve üst özofagus ile beraber motor innervasyonunu beyin sapından (nucleus ambiguus) almaktadır. Dinlenme halinde tonik kontraksiyonda ve 100 mmHg basıncında durmaktadır. Bu sayede solunum sırasında havanın farenksten özofagusa, reflü olduğu takdirde de mide içeriğinin özofagustan farenkse geçmesini engeller. Yutkunma sırasında besin, dil hareketi ile farenkse getirildiğinde istemsiz olarak farenks kasları kasılırken, ÜÖS gevşer. Besin özofagus gövdesine geçtiğinde sfinkter tekrar eski haline döner.

Sfinkterlerin aksine, özofagus gövdesinde dinlenme halinde motor aktivite yoktur. Besin buraya geldiğinde kontraksiyonlar başlar ve üst özofagustan

distale doğru peristaltik hareketlenmeler olur. Bu dalgalanmalar, 3 – 4 cm/saniye hız ile mesafe alır. Alt özofagusa geldiğinde en fazla basınç 60 – 140 mmHg'dir. Üç çeşit dalgalanma gösterilmiştir. Yutma ile beraber başlayan harekete, birincil dalgalanma adı verilmiştir. İkincil dalgalanmalar ise, birincil dalgalanmaların sonucunda özofagus gövdesinden temizlenemeyen besin parçacıklarının veya GER'in duyu sinir uçlarını uarması ile oluşur. Bu hareketler gövdenin uyarıldığı yerden başlar ve distale doğru devam eder. Üçüncül dalgalanmalar, itici gücü olmayan, özofagus gövdesinin herhangi bir noktasından başlayabilen, daha çok yaşlı insanlarda ve motilite sorunu olan olgularda görülen dalgalanmalardır<sup>(17,18)</sup>.

AÖS, iki kısımdan oluşur; özofagus düz kaslarının oluşturduğu internal ( 2-3 cm uzunluğunda) ve diyafragmatik sağ krusun oluşturduğu kabul edilen eksternal kısımlar. Normal dinlenme halinde, mide basıncının üzerinde bir basınç oluşturarak (15 – 25 mmHg) mide içeriğinin özofagusa kaçışını önlemeye çalışır. Besin dalgalanma hareketi yardımıyla bu bölgeye geldiğinde, 5 –10 saniye gevşeyerek mideye geçişe izin verir ve tekrar eski haline geri döner. Gevşeme olasılıkla nonadrenerjik-nonkolinerjik nörotransmitter olan VIP ile olmaktadır. Ayrıca, yutmadan bağımsız, dinlenme dönemlerinde görülen “geçici özofageal sfinkter gevşemesinin” nedeni ve oluş mekanizması tam açıklık kazanmamıştır. Yemek sonrası mide distansiyonun etken olabileceği söylene de gevşeme dönemlerinin sıklığı ve süreleri arttıkça GER'in oluştuğu kanıtlanmıştır<sup>(17,18,19)</sup>.

## EMBRYOLOJİK GELİŞİM

İnsanda embriyolojik dönem 3'e ayrılır<sup>(20)</sup>:

1. Büyüme
2. Embriyonik dönem veya morfogenez
3. Diferansiyasyon

Birinci dönem büyüme ile karakterizedir. Hücrelerin bölünmesi ve hücre ürünlerinin salınımıyla beraber görülür. Embriyo, bilaminer embriyonik diskten üç germ tabakasından oluşan trilaminer embriyonik diske dönüşür. Bu dönem içinde; notokord , nöral tüp, nöral krest, somit, kan ve kan damarları, koryonik villus oluşumları da gözlemlenir.

İkinci dönem; “embriyonik period” ya da “morfogenez”, hücre kitlelerinin hareketiyle gerçekleşmektedir. Morfogenez, bir formun oluşumu demektir<sup>(21)</sup>. Hücreler karmaşık etkileşimleri düzenli bir şekilde yapmaktadır. Bu dönemde, organ ve sistemlerin temel şekli olduğu için, herhangi bir teratojenle karşılaşması major doğumsal malformasyonların oluşumuna neden olur. Oluşan bu organ ve sistemler, üç germ tabakasından meydana gelir. Embriyo 4. haftanın başında medyan ve horizontal planlarda kıvrılarak, düz ve trilaminer olan formunu, “ C ” şeklinde silindirik bir biçime dönüştürür. Baş, kuyruk ve lateral kıvrımların oluşumu embriyo ve yolk kesesinin sıkışmasına yol açar. Kıvrılma esnasında yolk kesesinin arka kısmı embriyo ile birleşerek “ primitif barsağı ” oluşturur<sup>(20,21)</sup>.

Ön barsak: Baş bölgesinin ventrale kıvrılmasıyla yolk kesesinin bir kısmının birleşmesi sonucu,

Orta barsak: Horizontal planda kıvrılan embriyonun yolk kesesi ile birleşmesi sonucu,

Son barsak: Embriyonun kuyruk bölgesinin kıvrılması ve yolk kesesi ile birleşmesi sonucunda oluşur.

Üç germ yaprağı çeşitli doku ve organlara değişim göstererek embriyonel dönemin sonunda tüm ana organ sistemlerinin başlangıcını oluşturmaktadır. Belli başlı iç ve dış yapılar, geliştiği süreç olan 3 – 8 haftanın sonunda, işlevsel olarak yetersizdirler<sup>(14)</sup>.

Primitif barsak kendi içerisinde; ön barsak, orta barsak ve son barsak olarak üç kısma ayrılır :

Ön barsak : Primitif farenks ve deriveleri

Alt solunum sistemi

Safra kanal açılımının proksimalindeki duodenum

Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları

Pankreas

Orta barsak: İnce barsak

Çekum ve appendiks

Çıkan kolon

Transvers kolonun 2/3 proksimal kısmı

Son barsak : Transvers kolonun 1/3 distal kısmı

İnen kolon

Rektum

Anal kanalın superior kısmı

Mesane ve üretranın epiteli

## **Özofagusun Normal Embriyolojik Gelişimi**

Fertilizasyondan sonra yaklaşık olarak 22 – 23. günlerde özofagus ve trakea'nın kranial kısımları, ön barsağın median ventral divertikülizasyonu ile belirmeye başlar. Bu esnada embriyo 3 mm boyundadır ve 10 adet somit görülebilmektedir<sup>(23)</sup>.

Carnegie, insan embriyolarını gelişim süreçlerine göre sınıflandırdığında, 12. devrenin erken dönemlerinde embriyo 3.7 mm iken, akciğerin oluşacağı ön barsağın endoderm üzerinde ventral tarafa doğru bir şişlik tarzında belirmeye başladığını belirtmiştir<sup>(24)</sup>. Bu kısımdaki epitel dorsale göre 3 kat daha kalındır. Mezenkim, ön barsak ve bu kısımdaki diğer gelişmekte olan yapıları çevrelemektedir. Primitif respiratuvar sistem 5. somit çift hizasındadır. Akciğer tomurcuğunun hemen önünde kalp bulunmaktadır. Primitif respiratuvar sistem, ön barsağın alt yarısından çıkmaktadır ve tomurcuğun çıktığı yerin alt kısmı oldukça dardır.

Embriyo 4 mm olduğunda, 12. devrenin geç dönemlerinde daha belirgin bir trakeo-özofageal ayırım oluşmaya başlar. Bu bölgedeki endodermal hücreler ortada birleşerek trakeo-özofageal septumu (TÖS) oluştururlar. Primitif trakeal tomurcuğun ucunda öne ve aşağı doğru akciğer tomurcukları oluşmaya başlar. TÖS üst kısmı bu esnada 5. ve 6. somitler düzeyindedir. Ön barsak ve nöral tüp arasındaki mezenkim de artmıştır.

Embriyo 4.5 mm iken, 13. evrede özofagus ve trakea tamamen belirginleşmiştir. Septal ayrılma baş kısmına doğru devam ederken, özofagus ve trakeanın aynı zamanda uzaması bu yapılanmanın 32. günden önce

tamamlanmasını engeller. Özofagus, mide ve trakea arasındaki bu dar bölgeden oluşmaktadır<sup>(23,25)</sup>. Ön barsağın diğer kısımlarının endodermi tek tabaka hücre ile döşeli iken, bu bölgede iki ya da üç tabaka hücre bulunmaktadır. Bu dönemde trakeal primordiyumun distalinde akciğer tomurcukları büyümeye devam eder. Yine bu dönemden başlayarak özofagus ve trakeanın submukozal ve müküler tabakaları görülebilir.

Trakeal ayırım noktasında özofagusun genişliği diğer dönemlere oranla daha azdır. Hatta özofagus atrezisinin bu dönemde gelişebileceği düşünülmüştür. Özofagusun uzaması mideyi diyafragmanın altına doğru taşır.

Özofagus normal boyutuna 7. haftada ulaşır ve bu dönemde abdominal parçası erişkine oranla daha uzundur. Özofagusun sirküler kas tabakası embriyo 9 mm iken, 6. haftanın başında görülür. Nervus Vagus'un aynı dönemde hemen kas tabakasının dışında olduğu saptanmıştır. Yedinci haftada kan damarları submukozaya aortadan girerler. Dokuzuncu haftada, embriyo 30 mm iken longitudinal kas tabakası görülmeye başlasa da gelişimini tamamlaması 12. haftaya kadar sürer.

Özofagusun lümeni başlangıçta yuvarlak iken 5. haftada yukarıda dorsoventral, aşağıda ise lateral yönde düzleşir. Yedinci ve 8. haftalarda özofagus epiteli, lümen hemen hemen tamamen hücre ile dolu oluncaya kadar proliferer olur. Onuncu haftadan itibaren vakuoller kaybolarak tek lümen oluşur. Epitel bazı yerlerde özellikle silyalıdır. Bu hücreler 5. aya kadar artmaya devam eder. Dördüncü ayda özofagus ortasından başlayarak silyalı epitel, stratifiye skuamoz epitel adacıkları ile yer değiştirir. Onikinci hafta içinde lümeni normal şekline yaklaşmıştır. Özofagusun her iki uç

noktasındaki küçük bölgelerdeki kolumnar hücreler stratifiye skuamoz epitelle yer değiştirmez ve bunlardan yüzeyel özofagus bezleri gelişir<sup>(23,24)</sup>.

## ÖZOFAGUS ATREZİSİ

ÖA; özofagusun embriyolojik dönemde devamlılığının bozulması ve sıklıkla atretik poşlardan biri veya ikisinin birden trakea ile birleşmesi ya da atretik poşların izole halde bulunması sonucunda oluşan anomaliye verilen addır. Özofagusta atrezi olmadan trakeo-özofageal fistül (TÖF) bulunması da bu anomali grubuna sokulmaktadır.

En sık görülen formları :

1. ÖA, Distal TÖF	%85.8
2. İzole ÖA	%7.8
3. H Tip TÖF	%4,2
4. ÖA, Distal ve Proksimal TÖF	%1.4
5. ÖA, Proksimal TÖF	%0.8

İlk defa 1697 yılında, en sık formu olan; proksimal ÖA, distal TÖF, Thomas Gibson tarafından tanımlanmıştır. Cameron Haight'de 1941 yılında ÖA'da ilk başarılı primer onarım operasyonunu gerçekleştirmiştir.

Bu anomalinin görülme sıklığı 1/3750 – 4500 canlı doğumdur. ÖA'lı olguların yarısında prematüritenin yanısıra kardiyovasküler (%35), genitoüriner (%20), gastrointestinal (%24), nörolojik (%10), iskelet sistemine ait (%13) değişik major veya minör anomaliler eşlik eder. VACTERL sinonimi görülme sıklığı %25'dir. Eşlik eden bu anomaliler,

prematürite ve ÖA tipi ile beraber prognozu ve tedavi planını etkilemektedir.

ÖA olan bebeklerin büyük bir kısmı hayatlarının ilk bir-kaç saatinde belirti verirler. En erken belirtileri, ağızlarından oldukça fazla tükürük çıkarmalarıdır. Anneyi emdiklerinde, sütü yutamayıp ağızdan ve burundan getirirler. Bu esnada öksürük ve siyanoz da gözlenir. Hem üst poşda biriken materyalin hem de mideden fistül yoluyla akciğere gelen asitin aspirasyonu, pnömoniye neden olur.

Tanı, ağız yolu ile ilerletilen 10 F orogastrik tüpün ağız kenarından yaklaşık 11 – 12 cm uzaklıkta takılıp mideye ulaşamaması ile konur. Fistül yerlerinin saptanması için bronkoskopi ve özofagoskopi incelemelerinin yapılmasında yarar vardır. Sinefloroskopi de H tip TÖF'ün tanısında yardımcı olmaktadır.

Ameliyatta sağ torakotomi insizyonu ile 4.-5. interkostal aralıktan ekstraplevral yol ile arka mediastene ulaşılır. Amaç fistülü trakeadan ayırıp poşları uç uca anastomoz etmektir. İzole tipinde ise ilk amaç gastrotomi açıp beslenmeyi sağlamak, daha sonra ya primer anastomoz yapmak ya da kolon, ileum veya mideyi toraksa çekip özofagusun devamlılığını sağlamaktır. H tip TÖF'lerde de boyundan yaklaşımla fistülü bağlamak yeterlidir.

Özofageal darlık, anastomoz kaçağı ve GER ameliyat sonrası erken dönemde, trakeomalazi, yutma zorluğu ve özofagus motilite bozukluğu ise ameliyat sonrası geç dönemde mortalite ve morbiditeyi etkileyen nedenlerdir<sup>(26)</sup>.

## **ÖA'nın Embriyolojik Gelişim Teorileri**

Primitif ön barsağın ön duvarından trakeopulmoner oluşum fertilizasyonun 21. gününde görülmektedir. Embriyo 8 mm boyunda iken gestasyonun 32. gününde TÖS oluşur ve trakea ile özofagus ayrı yapılar haline gelir. Bu da anomalinin ya da atrezinin, gestasyonun 32. gününden önce meydana geldiğini göstermektedir.

ÖA'da, TÖF'ün distalinde çizgili kas bulunmaması bu olayın erken dönemde gerçekleştiğini düşündürür<sup>(27)</sup>. Dördüncü haftanın sonunda respiratuvar sistemin büyük bölümü oluştuğu için sadece ÖA ve TÖF gelişebileceği kabul edilmiştir<sup>(28)</sup>.

Bugüne kadar yapılan insan embriyo çalışmaları ile özofagus ve respiratuvar sistemin normal gelişimlerinin açıklanabilmiş olmasına karşın, atrezi ve fistül oluşumu ve diğer ek anomalilerin gelişimi henüz açıklık kazanmamıştır. Özofagus atrezisinin birçok değişik anatomik tipleri vardır<sup>(29,30)</sup>. Tüm bu anomaliler ortak bir gelişimsel bozukluğun spektrumları şeklinde veya gelişim esnasında oluşan yerel bölgesel etkilenmelerin sonucunda olabilir<sup>(31)</sup>. Spektrumun bir ucunda ÖA ve TÖF'ün değişik tipleri, diğer ucunda ise larengeo-trakeo-özofageal kleft, trakeal agenezi ve izole ÖA bulunmaktadır. Günümüze değin ortaya atılan ÖA gelişim teorileri dört ana grupta incelenebilir:

1. İntraembriyonik basınç teorisi
2. Epitelyal tıkanıklık teorisi
3. Büyümede değişiklik teorisi
4. Vasküler teori

## 1. İnteraembriyonik basınç teorisi:

- a. Genişlemiş embriyonik kalbin basısı: Embriyonik kalbin genişlemesi ile servikal bölgenin dorsal eğiminin özofagus ve trakeayı basınç altında bırakarak ÖA'ya yol açtığı düşünülür. Bu teori vertebranın gelişmemiş olması ve kalbin jöle kıvamındaki fetusu basınç altında bırakamayacağı nedenleri ile taraftar bulmamıştır. Ayrıca kalbin gelişmediği veya küçük olduğu zamanlarda da atrezi olduğu gözlenmiştir<sup>(31)</sup>.
- b. Anormal damarların basısı: ÖA ile birlikte sağ retroözofageal subklavian arterin bulunması, sağ dorsal aortanın kaudal kısmının gelişen özofagus üzerine bası yaptığı görüşüne yol açmıştır. Ancak bu hipotez ÖA'lı embriyolarda yapılan diseksiyonlarda doğrulanmamıştır<sup>(32)</sup>.
- c. Pnömoenterik resesin yaptığı basınç: Bu bölgede aşırı miktarda sıvı birikiminin önbarsakda basıya neden olduğu düşüncesinden yola çıkmaktadır. Ancak bu bölgenin daha sonra geliştiği bulunmuştur. Ayrıca bu dönemde embriyonun jöle kıvamında olması basınç olsa da embriyonun bundan etkilenmeyeceğini düşündürmektedir<sup>(33)</sup>.
- d. Embriyonik hiperfleksiyon: Bu teoride, anormal gelişim gösteren dorsal yapılar nedeniyle embriyonun hiperfleksiyonunun ÖA geliştirdiği kabul edilmektedir<sup>(34)</sup>. Tavuk embriyosunda yapılan çalışmada, kalpte basınç oluşturmayacak kadar hiperfleksiyona getirilen 42 embriyonun sadece bir tanesinde TÖF gelişmiştir. Özofagusta atreziye yol açacak kadar ciddi boyutta bir basıncın oluşması rijit olmayan embriyo için olanaklı görülmemektedir<sup>(35)</sup>.

## 2. Epitelyal Oklüzyon

Özofagus lümeninin oklüzyonu sonrasında rekanalizasyonu olmaması sonucu atrezi olduğu görüşüdür<sup>(36)</sup>. Özofagusun embriyolojik gelişiminde takeo-özofageal sulkusun hemen altında özofagus lümeni çok daralsa da atrezi gelişiminin bu dönemden önce olduğu savunulmaktadır. Ayrıca hiç bir ÖA'da lümenin tamamen tıkanıdığı görülmemiştir. Bu teori trakeoözofageal fistül oluşumunu açıklamaktan da uzak kalmaktadır.

## 3. Büyümede Değişiklik Teorileri

Yamasaki 1933 yılında ilk defa, ÖA'nın aktif hücresel proliferasyonun bir disfonksiyonu olarak gelişebileceğini ileri sürmüştür. Bu teorisini, primitif ön barsağın dorsal kısmında ince, ventralde ise daha kalın bir tabaka halinde epitel bulunması gözlemi üzerine kurmuştur. Pulmoner kısımlar ve trakeanın sahip olduğu hızlı büyüme potansiyeli neticesinde, primitif ön barsağın dorsal kesimlerinde özofagus oluşumunu tamamlayacak kadar yeterli hücresel materyalin olmamasının atreziye yol açtığı düşünülmüştür.

Gruenwald da, trakeanın hızlı uzaması neticesinde özofagusu aşağıya doğru taşıdığını ve bu nedenle özofagusun yeterli değişime uğrayamadığı, ayrı bir yapı olarak gelişemediği hipotezini öne sürmüştür<sup>(28)</sup>. Trakeal büyüme tamamlandıktan sonra özofagusun kraniyal segmenti gelişmeye devam eder fakat aşağı kısmı gelişemez. Trakeanın arka kısmında özofagus dokusu olması veya özofagus ile trakea arasında müsküler bandlar olması bu teoriyi desteklemektedir. Başka bir açıklama ise ön barsağı internal olarak bölen epitelyal yarıkların yanlış birleşmesi şeklindedir<sup>(37)</sup>. Trakeanın özofagustan ayrılması sırasında trakeanın dorsal kısmı aşırı büyürse ayrılma yönünde

bozulma oluşur ve atreziye yol açabilir. Lateral özofagusun internal kısmının aşırı gelişmesine bağlı olarak ÖA ve TÖF gelişebildiği diğer bir görüştür<sup>(38)</sup>.

Ön barsak epitelinin organizasyon defekti trakea ve özofagusun ayrılmamasında önemli yere sahiptir. Hala trakeoözofageal boşluğu dolduran hücrelerin normal gelişim biçimindeki bozukluğun atreziye yol açtığı kabul edilse de olayların morfolojik gelişimi hakkında görüş birliği yoktur. Bu konuda oluşturulan hipotezler şu şekilde sıralanabilir:

- a. TÖS'ün yanlış gelişmesi: TÖS'ün yukarı doğru büyümesi ve lateral özofageal bileşkenin ilerlemesi ile özofagus trakeadan ayrılır<sup>(23,37)</sup>. Eğer bu büyüme yanlış yönlendirir ya da eksik kalırsa ayrılma anormal gelişir ve atrezi çeşitli şekillerde karşımıza çıkar. TÖS bazı araştırmacılar tarafından, meydana gelen atreziyi açıklamakda esas olarak kabul edilirken bazı yazarlar TÖS'ün normalde gelişmediğini bile savunmaktadır<sup>(39,40,41)</sup>.
- b. Lateral özofageal kısımların aşırı büyümesi: Lateral internal özofageal kısmın kaudal ve posterior yönde aşırı büyümesi, özofagus ve TÖS'ün kapanmasına yol açabilir. Eğer bu aşırı büyüme oblik doğrultuda gelişirse trakea ile özofagusun alt kısmı arasında bağlantı bulunmaz ve distal TÖF meydana gelir.
- c. Ön barsağın dorsal kıvrımının ventrale yer değiştirmesi: Bu model tavuk embriyosunda elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmaya dayandırılmıştır<sup>(40)</sup>. Trakea ile özofagus arasındaki boşlukta azalma görülmüş fakat TÖS'ün kauda-kranial yönde geliştiği gözlenmemiştir. Lateral trakeo-özofageal duvarın kalınlaşmasının TÖS'ün kranial sınırı olmasından çok, trakea ile özofagus

arasındaki lateral kıvrımın aşağıda trakeo-özofageal kıvrım, yukarıda ise kranial kıvrım, primordial larinks, posteriorda ise özofagusun dorsal kıvrımı olduğu saptanmıştır. Bu gözlemlere dayanarak ön barsağın dorsal kıvrımının önde çok fazla eğilmesi halinde larinksin inişinin engelleneceği düşünülmüştür<sup>(39)</sup>. Böylece trakea ile özofagus arasındaki boşluk bölünmemiş olur, ventral pozisyonda kalır ve sonuçta trakeaya diferansiye olmasına neden olur.

- d. Diferansiyasyonun mezenkimal kontrolü: Bu teori longitüdünel olarak büyüme ve septum biçimlenmesinin olmaması savına dayanır. Mezenkimal faktör önde trakeal mukozayı ve arkada özofagusu kontrol eder. Dengenin bozulması genellikle trakea yönünde olur. Ön barsağın endodermal epiteli önde trakeaya integre olur ve özofagusta çok az kalır. İzole ÖA ise septumun çok az bir kısmı etkilenirse görülür. mezenkimal diferansiyasyonun kontrol bozukluğu, ÖA'nın bölgesel defektleri için geçerlidir<sup>(42)</sup>.

#### 4. Kan Akımının Bozulması:

Bu model barsak atrezilerinin gestasyonel dönemde mikrosirkülasyonunun bozulması neticesinde olduğu düşüncesi ile aynı temele dayanmaktadır. Arteriyel dolaşımın bozulması köpek fetuslarında intestinal atrezi oluşturmaktadır<sup>(43)</sup>. Bu bilgiler ışığında ÖA'nın da mikrosirkülasyonun bozulmasına bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Barsak atrezileri gelişimin geç dönemlerinde olur. Oysaki ÖA vasküler yapılar oluşmadan önce gerçekleşir ve bu nedenle bu teori de geçerliliğini kaybetmektedir.

Sonuç olarak, bugüne kadar geliştirilen bu teorilerin ÖA oluşumunu açıklamada yetersiz kaldığı görülmektedir. Ön barsağın özofagus ve respiratuvar sistemi oluştururken hızla gelişen ve çoğalan endodermal veya mezenkimal hücrelerdeki uyarı bozuklukları ya da yön hatasının ÖA ve TÖF'e neden olması olasılığı nispeten daha yüksek gözükmemektedir.

## **ÖZOFAGUS ATREZİSİ HAYVAN MODELLERİ**

Bugüne kadar ÖA geliştirilmesi için tarif edilmiş hayvan modellerini şu şekilde sıralayabiliriz :

1. Kalter ve arkadaşları, gebe sıçanlara riboflavinden yoksun diet uygulaması ile bazı fetuslarda izole ÖA oluşturabilmişlerdir<sup>(44)</sup>.
2. Warkany ve arkadaşları vitamin A'dan yoksun diyet ile besledikleri sıçanlarda birçok malformasyona ek olarak, sadece tek bir sıçanda TÖF elde edebilmişlerdir<sup>(45)</sup>.
3. Kleckner ise, tavuk embriyosunda gelişimin erken dönemlerinde boyun bölgesinde hiperfleksiyon yaparak H tip TÖF oluşturmuştur<sup>(35)</sup>.
4. Tovar ve arkadaşları sıçanlara gebeliğin 6 – 9. günlerinde adriamisin verilerek insanlardakine benzer ÖA ve VATER tipi ek anomalileri saptamışlardır<sup>(5,7)</sup>.

## **ENTERİK SINIR SİSTEMİ**

Enterik sinir sisteminde intrinsik ganglionları oluşturan nöral ve gliyal hücreler başlıca iki grup nöral krest hücresinden köken alırlar: vagal ve sakral. Vagal enterik nöral krest hücreleri nöral tüpün 1-7. somitlerinden yola çıkarak ve kranio-kaudal yönde ilerleyerek tüm barsak duvarı boyunca

mezenkimde kolonize olurlar. Sakral enterik nöral krest hücreleri ise 28. somitten dorsoventral ve dorsal yönde göç ederler. Kemiricilerde nöral krest hücrelerinin barsak mezenkiminde yerleşmeleri embriyonel dönemin 9,5. gününde iken, enterik ganglionların morfolojik olarak tanımlanması ön barsakta 12. günde, son barsakta ise 14,5. gündedir. Ganglionik diferansiyasyonun tamamlanması ve işlevsel olması ise mezenkimdeki düz kas diferansiyasyonun da tamamlandığı 17. günden sonra gerçekleşir ve peristaltik hareketler başlar<sup>(46,47)</sup>.

Nöral krest hücrelerinin göç yolları hücresiz bir alan olup sadece ESM tarafından oluşturulan fibriller ve granüler bir ağ bulunur ve hücreler bu ağ bileşenleri ile etkileşime girerler. Dolayısıyla ESM'nin yapısal ve moleküler özelliklerinin bu göçü yönlendirmede ve olgunlaşmasında önemli rolü vardır<sup>(14)</sup>.

## **EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİNLERİ**

İnsan vücudu 4 temel dokudan oluşur:

1. Epitel
2. Bağ dokusu
3. Kas
4. Sinir dokusu

Bütün dokularda, hücreler ve hücreler arasında bulunan, canlı olmayan makromoleküllerden oluşan ESM vardır. Çok hücreli organizmalarda ovumun fertilizasyonu ile beraber, ESM proteinlerinin (kollajen, laminin ve

fibronektin) üretimi de başlar. ESM, hidrate jel kıvamında granüllü bir ağ ve fibrillerden oluşur. Bulunduğu dokuda yalnızca hücrelere destek sağlamazlar, hücre sel göçü, bağlanmayı, farklılaşmayı, olgunlaşmayı da organize ederler. Hücreler, etraflarındaki ESM'ye ve makromoleküllere, özelleşmiş tutunma bölgeleriyle bağlanırlar. Bazı dokular hücrelerden zengin, ESM'den fakir iken (epitel gibi), bazıları da hücrelerden fakir, ESM'den zengindirler (bağ dokusu gibi)<sup>(48,49)</sup>.

ESM, beş önemli yapıdan oluşmaktadır:

1. Kollajenler
2. Elastik fibriller
3. Bazal Membran
4. Yapısal glikoproteinler (GP)
5. Proteoglikanlar (PG)

### **Kollajenler:**

Proteinlerle aynı özellikleri taşıyan yapılardır. Ribozomlar tarafından yapılarak ortama salınırlar. ESM'de morfolojilerine ve histolojik boyanmalarına göre 3 fibril çeşidi tariflenmiştir; kollajenler, retikülin ve elastin. Bu fibriller yüzey gerilimi ve dokunun esnekliğinden sorumludurlar.

Kollajenler üçlü aminoasit dizilimlerinin tekrarından oluşurlar. Hidroksiprolin ve hidroksilizin isimli iki adet hidroksi aminoasitten zengindirler. Üçlü polipeptid zincirleri vardır. Herbir polipeptid zinciri ayrı bir gen tarafından kodlanır ve bunlar Yunan alfabesindeki  $\alpha$  ile tanımlanır. Yapısal olarak insan vücudunda 10 çeşit kollajen tariflenmiştir. Ancak bunlar arasında en fazla bulunanlar aşağıda açıklanan tiplerdir:

Tip I Kollajen: En çok kemikte, deride, tendonlarda ve olgunlaşmış yaralarda bulunurlar.

Tip II Kollajen: Kıkırdak dokusunun kollajenidir ve daha önce vitröz humorda da tarif edilmişti.

Tip III Kollajen: Daha çok embriyonik dokuda, kan damarlarında, uterusu ve gastrointestinal sistemde bulunur. Yara iyileşmesinde ilk depolanan kollajendir.

Tip IV Kollajen: Bazal membranın bir parçasıdır. Tek fibril halinde bulunmaz. Genelde laminin ve diğer matriks elemanları ile beraberdir.

Tip V Kollajen: Vücuttaki bir çok dokuda, ancak az miktarlarda bulunur.

Tip VI Kollajen: Bağ dokusunun önemli elemanlarındanıdır.

Kollajenler, vücutta değişmeden uzun süre dururlar. Değişim hızları oldukça yavaştır. Kollajenaz enzimleri ile yapıları bozular. Bu enzimler vücutta, fibroblast, makrofaj ve endotel hücreleri tarafından salınırlar<sup>(14,48,50)</sup>.

### **Elastik Fibriller:**

Uterus, kan damarları, deri ve akciğer gibi dokular, fonksiyonları için gerilme direncinin yanında elastik özellik de göstermek zorundadırlar. Gerilme direncinden dokudaki kollajenler sorumlu iken geçici gerilme sonrası dokunun eski haline dönmesinden elastik fibriller sorumludur. Elastin, fibrillerin tam ortasında bulunur ve kollajenler gibi glisin, proline içerir, ancak hidroksi aminoasit içermez. Özellikle bazal laminada yerleşerek, bir ağ oluştururlar. Periferde elastik fibrillerle beraber bulunan mikrofibrillerin görevi tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak iyice bilinen

tek mikrofibril olan fibrilinin yapısal bozukluğunda “Marfan Sendromu”nun geliştiği saptanmıştır<sup>(14,50)</sup>.

### **Bazal Membran:**

Hücrelerle, stroma arasında yer alan ince bir yapıdır. Tip IV kollajen, laminin, entaktin, heparan sülfat ve daha az miktarda da diğer matriks elemanlarını içerir. Elektron mikroskopisinde iki ayrı tabaka olarak fark edilir: lamina densa ve lamina lusida. Bütün epitellerin altında, epitelyal hücreleri stromadan ayıran devamlı bir bazal membran vardır. Yalnızca kemik iliğinin sinüzoidal endoteli altında, lenfoid dokularda ve karaciğerde yoktur. Bazal membranın en iyi bilinen yapı taşı laminindir. Üç büyük polipeptid kolu olan bir glikoproteindir. Her bir kolda da tip IV kollajen, entaktin ve hücre zarı için bağlanma noktaları içerir. Özellikle hücrelerin birbirlerine tutunmasını sağlar. Bir çok proteaza duyarlıdır. Laminin lokalizasyonu, bazal lamina ile sınırlandırılmıştır.

Bazal membran, hücrelere yapısal desteğin yanında, onlara tutunma yerleri de sağlar. Aynı zamanda filtre görevi görür. Endotel ve renal glomerulusta bu fonksiyonu detaylı olarak gösterilmiştir. Yüksek anyonik yükteki bazal membranın seçici filtrasyon için oldukça önemli olduğu ve bu sayede metastatik hücrelerin yayılımını da engelleyebildiği bilinmektedir. Bütün bu görevleri ile beraber hücrelere kendi özgün çevresinde idame olanağı sağlarlar<sup>(48,49,50)</sup>.

### **Glikoproteinler:**

GP'ler, hücrelerin ESM'ye tutunmasına yardımcı olurlar. Bilinen majör GP'ler; fibronektin, laminin, entaktin, tenaskin, kondronektin ve

osteonektindir. Fibronektin geniş çaplı, birbirine benzeyen iki polipeptid alt gruptan oluşur. “ V ” şeklindeki kollarında hücre zarındaki integrinlere, ekstrasellüler makromoleküllere (kollojen, heparin, hyalüronik asit gibi), hücre yüzeyine, fibrinojene, bakterilere ve DNA'ya bağlanmak için özel alanları vardır. Embriyo döneminde, çeşitli hücrelerin göçü için yol hazırladığı saptanmıştır<sup>(48,49,50)</sup>.

### **Proteoglikanlar ve Glikozaminoglikanlar (GAG):**

GAG'lar, uzun, kırılmayan ve dallanmayan polisakkaridlerden oluşurlar. Bir tane majör GAG hariç hepsi sülfatlanmış halde bulunurlar. Bunlar; keratan sülfat, heparin, kondrotin 4 sülfat, kondrotin 6 sülfat ve dermatan sülfattır. Bu GAG'lar protein moleküllerine kovalen bağlarla bağlanarak PG'leri oluştururlar. Sülfatlanmamış tek GAG, hyalüronik asittir<sup>(48,49)</sup>.

Bir çok PG, özellikle “agrekan”, hyalüronik aside bağlanarak ESM'nin jel formunda kalmasını sağlar. Bu sayede mikroorganizmalara ve metastatik hücrelere bariyer oluşturarak yayılımlarını engellerler. Bazal lamina ile beraber de filtre görevi üstlenip, belli büyüklükteki makromoleküllere geçiş izni vermezler. Aynı zamanda özel moleküllerle , bağlanma noktaları oluşturarak bu moleküllerin dokulara etki etmesini sağlarlar ( örneğin “transforming growth factor”). ESM'de oldukça fazla bulunmalarının yanında, hücre yüzeyi ve bir çok biyolojik sıvıda da saptanmışlardır<sup>(48,49,50)</sup>.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarında, Etik Komite onayı alınarak yapıldı.

Çalışmada, deney hayvanı olarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarında üretilen, puberteyi geçmiş (2 aylıktan büyük), en az bir kez doğum yapmış, ortalama ağırlıkları  $232.4 \pm 25,8$  (205 – 284 )gr olan dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı.

Sıçanlar çalışma boyunca, hayvan laboratuvarında, hava döngüsü ve 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık ışık döngüsü sağlanan bir odada tutuldular. Bakımları laboratuvar teknisyenleri tarafından yapıp, şehir suyu ve sıçan yemi ile beslendiler.

### **Sıçanların Çiftleştirilmesi:**

Dişi sıçanlar gebe olmadıkları saptandıktan sonra, çiftleşmeleri için her bir kafese üçer dişi ve bir erkek sıçan konarak, 24 saat beklenildi. Bu sürenin sonunda dişi sıçanlar, erkek sıçanlardan ayrıldı. Gebeliğin belirlenmesi için dişi sıçanların vajenlerinde mukus plak varlığı kriter olarak seçildi. Dişi sıçanların çiftleşme sonrası ilk günden itibaren, sakrifiye olacakları 21. güne kadar her gün sabah vücut ağırlıkları elektronik hassas terazi ile (Ohyo MP 3000, Tokyo/Japan) tartıldı (Resim 1).

### **Özofagus Atrezi Modelinin Oluşturulması:**

Gebe olduğu belirlenen toplam 15 sıçanın 12'sine adriamisin (Adriblastina, Carlo Erba, İtalya) verilerek çalışma grubu, kalan 3 gebe sıçana da serum



Resim 1. Gebe sıçanların hassas terazi ile tartılma işlemleri

fizyolojik verilerek kontrol grubu oluşturuldu. Dişı sıçanların erkek sıçanla aynı kafeste olduğu gün gestasyonun sıfırncı günü, erkek sıçandan ayrıldıkları gün de gestasyonun birinci günü olarak kabul edildi. Çalışma grubundaki 12 gebe sıçana, gestasyonun 6, 7, 8 ve 9. günlerinde intraperitoneal yolla 2 mg/kg/gün adriamisin verildi. Kontrol grubuna da gestasyonun aynı günlerinde intraperitoneal yolla 2 cc/gün serum fizyolojik verildi.

### **Sakrifikasyon ve Fetusların Hazırlanması:**

Gestasyon 21. gününe gelen gebe sıçanlar derin eter anestezisi ile sakrifiye edilerek, uterusları laparotomi ile blok halinde çıkarıldı (Resim 2). Her bir gebelik için fetuslar sayıldı ve amniyon mayi ile ayrı ayrı tartıldı (Resim 3). Fetusların amniyon zarı çıkarılıp, mayi boşaldıktan sonra da tartıldı ve histopatolojik incelemeler için %10'luk formol solüsyonu içine konarak, patoloji laboratuvarına iletildi.

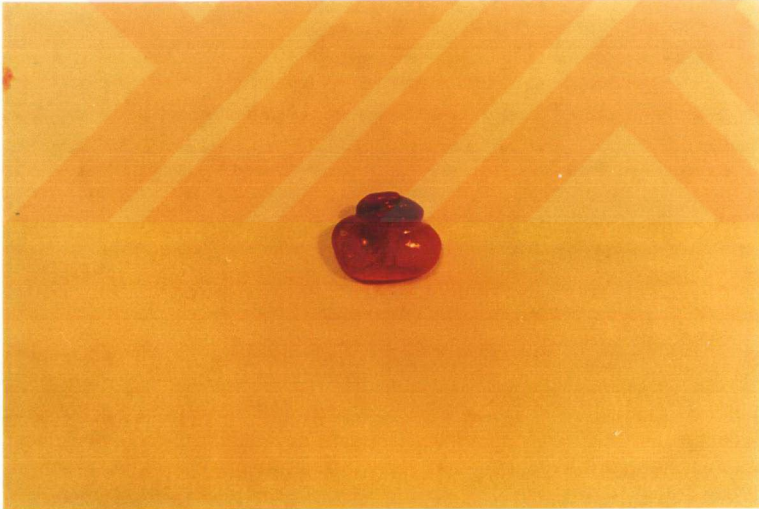
### **Histopatolojik İnceleme**

Histopatolojik incelemeler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda yapıldı.

Çalışmamızda, her fetustan, ağız kısmından diyafragma altına kadar 2 mm kalınlığında horizontal dilimler alındı. Bu örneklemelere ototeknikonda rutin takip yöntemi uygulanıp, 2 – 3 adet örneğin biraraya konduğu parafin bloklardan 3-5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Tüm kesitler Hematoksilen – Eozin ile boyanarak ışık mikroskopisi altında incelenmiştir. Atrezi gelişen



Resim 2. Gebe sıçanların uteruslarının blok halinde çıkarılması



Resim 3. Fetüslerin uterusdan tek tek alınıp tartıya hazırlanması

fetuslar saptanarak, immunohistokimyasal çalışmaların yapılacağı gruplar oluşturuldu.

### **İmmunohistokimyasal Boyama ve Değerlendirme:**

Herbir grupta yer alan fetuslara ait bloklardan, immunohistokimyasal çalışma için 3-5 mikron kalınlıktaki kesitler organosilane ile kaplı lamlara alındılar. Deparafinize edilen kesitler, endojen peroksidaz blokajından sonra antijenlerin geri kazanımı amacıyla fibronektin ve laminin için 37 °C'ta pepsin ile 50 dakika; kollajen tip IV için proteaz ile 45 dakika ön işleme tabi tutuldu. Primer antikor olarak kollajen tip IV Ab-2 (Clone CIV 22, Neomarkers, ABD), mouse monoklonal anti-laminin (ScyTek, ABD), fibronektin Ab-9 (Clone 568+TV-1, NeoMarkers, ABD); sekonder ve konjuge antikorlar için "Ultravision Mouse Tissue Detection System" kullanıldı. Streptavidin - Biotin yönteminin uygulandığı çalışmanın kromojeni diaminobenzidin, zemin boyası ise Mayer Hematoksilendir.

Hyaluronik asit diğer ESM proteinlerinden farklı olarak histokimyasal metodla işlem gördü. Bunun için de, kesitler hidrate edildikten sonra Weigert's Hematoksilen içinde 20 dakika tutuldu. Akan suda yıkanıp, Alcian Blue (pH:2,5) da bir saat bekletildi. Bu işlem sonrası kesitler tekrar akan suda yıkanıp, Van Gieson solüsyonu içine kondu. 3 –5 dakika beklendikten sonra dehidrate edilen, kesitler kapatıldı.

Her bir antikor için immunoreaktivite yerleşimi belirlenerek, yoğunluğu üçlü skala kullanılarak:

- 0- Yok
- 1- Zayıf pozitif
- 2- Kuvvetli pozitif, olarak değerlendirildi.

### **İstatistik Çalışması :**

Kontrol (n:3) ve adriamisin (n:12) grubundaki gebe sıçanların gestasyonun 0, 6 ve 21. günlerdeki kilo takiplerinin karşılaştırılması “ eşleştirilmiş ölçümler için ANOVA testi “ ile bakıldı. Bu testin sonunda  $p<0,05$  durumunda ise, ikili karşılaştırmalar için “ Student Newman Keuls çoklu karşılaştırma testi “ yapıldı. Grupların aynı günlerdeki karşılıklı kilo değerlendirilmeleri de “ Mann Whitney testi “ ile karşılaştırıldı.

Kontrol (n:107) ve adriamisin (n: 32) grubundaki fetusların amniyon sıvılı ve yalın ağırlıklarının karşılaştırılmasında “ Bağımsız gruplar için t testi“ ile gerçekleştirildi.

## BULGULAR

Çalışmamızda, kontrol grubunda 3, adriamisin grubunda ise 12 gebe sıçan kullanılmıştır. Gebe sıçanların gestasyonun 0., 6., ve 21. günündeki ortalama tartıları ve standart sapmaları tablo 1’de verilmiştir:

Tablo 1. Gebe sıçanların vücut ağırlıklarının gruplara göre dağılımı

	Kontrol Grubu (n:3) Gebe Sıçan VA (Ort. $\pm$ SD) gr	Adriamisin Grubu (n:12) Gebe Sıçan VA (Ort. $\pm$ SD) gr
0. Gestasyonel Günde	221,3 $\pm$ 17,2	235,1 $\pm$ 27
6. Gestasyonel Günde	233,3 $\pm$ 16,6	248,2 $\pm$ 27,3
21. Gestasyonel Günde	283 $\pm$ 27,6	249,1 $\pm$ 27,3

VA : Vücut Ağırlığı

Kilo takiplerinde, kontrol ve adriamisin grubunda 0. gestasyonel günle, 6. ve 21. gestasyonel günler karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). Kontrol grubunda ise 0. ve 6. günler arasında fark bulunmazken ( $p > 0.05$ ), 0. ile 21. günler arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ).

Kontrol grubu ve adriamisin verilen gruptaki gebe sıçanların kilo takipleri, gestasyonun 0., 6. ve 21. eşgünlerde birbirleriyle karşılaştırıldığında, anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Kontrol grubunda 21. gestasyonel günde belirgin kilo artışı gözlenmesine karşın, bu anlamsız fark, kontrol grubundaki az denek sayısına bağlanmıştır.

Kontrol grubunda 3 gebe sıçandan 32 adet, adriamisin grubunda ise 12 gebe sıçandan 107 adet olmak üzere toplam 139 fetus elde edilmiştir. Adriamisin verilen gruptaki 107 fetusun 37 tanesinde ÖA, 2 tanesinde trakeal atrezi saptanmıştır (Resim 4, 5, 6 ve 7). Adriamisine maruz kalan fetusların ÖA gelişme sıklığı % 34,5'dir. Trakeal atrezi sıklığı da % 1,8 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz adriamisine maruz kalan ve kontrol grubundaki fetuslar, gebe sıçandan sezaryanla alındıkları 21. gestasyonel günde, hem amniyon mayi ve kesesi ile hem de amniyon kesesi çıkartıldıktan sonra yalın hali ile tartılmışlardır. Fetusların ortalama ağırlıkları ve standart sapmaları aşağıda tablo 2'de verilmiştir:

Tablo 2. Fetusların amniyon mayili ve yalın vücut ağırlıkları

	Amniyon Mayili VA (Ort. ± SD) gr	Yalın VA (Ort. ± SD) gr
Kontrol Grubu (n:32)	7.33 ± 0.21	5.10 ± 1.06
Adriamisin Grubu (n:107)	6.06 ± 0.25	3.78 ± 1.02

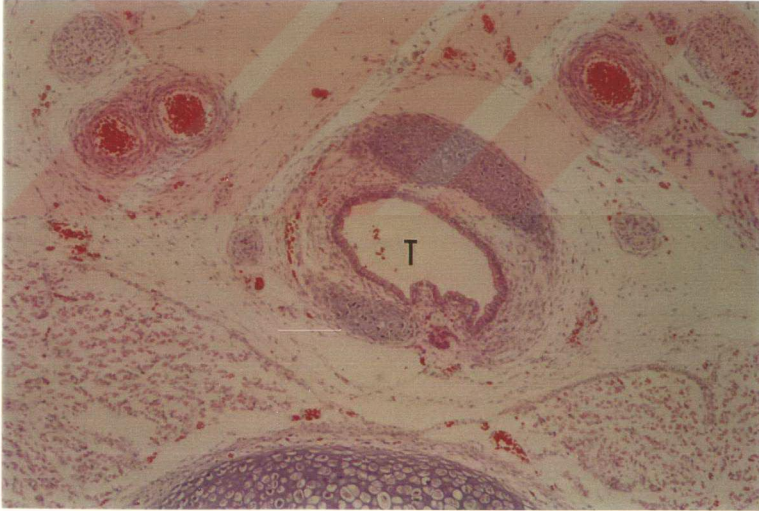
VA: Vücut Ağırlığı

Kontrol grubundaki fetusların amniyon mayili ve yalın ağırlıklarının ortalaması, adriamisine maruz kalan fetusların ortalamasından daha fazladır (Tablo 3). Her iki grubun amniyon mayili tartıları ve yalın halleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak belirgin fark saptanmıştır ( $p < 0.0001$ ). Ancak aynı karşılaştırma amniyon mayi miktarları için yapıldığında, saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ( $p > 0.05$ ).



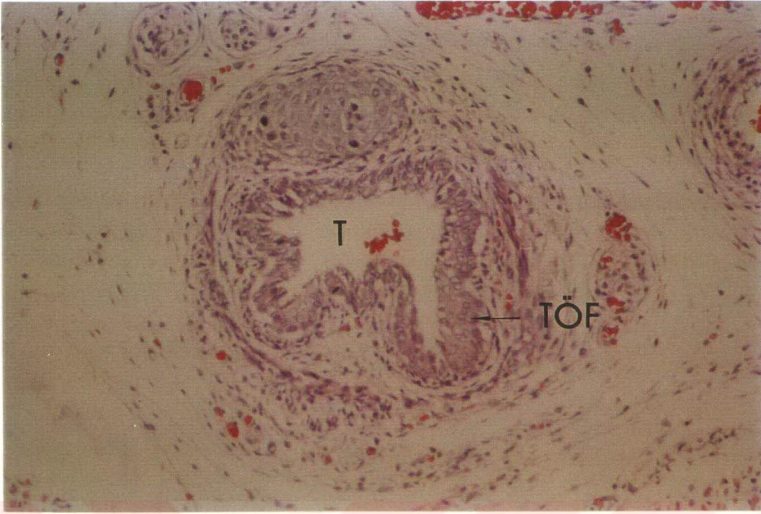
Resim 4. Hematoksilen –Eosin boyası ile normal fetus

Ö: Özofagus T: Trakea



Resim 5. Hematoksilen –Eosin boyası ile ÖA'lı fetus

T: Trakea



Resim 6. Hematoksilen –Eosin boyası ile ÖA, distal TÖF'lü fetus  
T: Trakea TÖF: Trakea-özofageal fistül



Resim 7. Hematoksilen –Eosin boyası ile trakeal atrezili fetus  
Ö: Özofagus

Tablo 3. Fetusların amniyon mayi miktarlarının gruplara göre dağılımı

	Kontrol Grubu (n: 32)	Adriamisin Grubu(n: 107)
Amniyon Mayi (Ort. $\pm$ SD) gr	1,25 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,18

### İmmunohistokimyasal ve Histokimyasal Bulgular

Çalışmamızda, kontrol grubundaki 32 adet fetusun, 10 tanesi rastgele seçilerek Grup I oluşturuldu. Adriamisin verilen çalışma grubundaki 37 adet ÖA gelişen fetustan rastgele 20 tane alınarak Grup II (A+), atrezi gelişmeyen 70 fetusun içinden de rastgele 20 adet seçilerek Grup II (A-) oluşturuldu (Tablo 4).

Tablo 4. Fetus gruplarının tanımlanması

Grup	Fetus sayısı	Tanımlama
Grup I	n:10	Kontrol grubu
Grup II (A+)	n:20	Atrezi gelişen grup (Adriamisin verilen)
Grup II (A-)	n:20	Atrezi gelişmeyen grup (Adriamisin verilen)

Laminin, fibronektin, kollagen tip IV immunohistokimyasal, hyaluronik asit de histokimyasal işlemlerden geçtikten sonra toraks kesitlerinde kalitatif olarak değerlendirildiler ( Resim 8,9,10,11,12,13,14,15 ). Fibronektin ve hyalüronik asit tüm gruplarda ( ++ ), kollagen tip IV ve laminin ( + ) olarak saptandı. Grup I, Grup II (A+) ve Grup II(A-) de saptanan dört ayrı matriks proteini için aynı değerlerde bulunmasından dolayı istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir ( Tablo 5,6,7 ).

Tablo 5. Grup I'deki dokularda ESM proteinleri yoğunluğu

	Düz Kas	Damar Duvarı	İskelet Kası	Kalp Kası	Kemik
Fibronektin	++	++	++	++	++
Hyalüronik asit	++	++	++	++	++
Kollagen tip IV	+	+	+	+	+
Laminin	+	+	+	+	+

Tablo 6. Grup II (A+)’deki dokularda ESM proteinleri yoğunluğu

	Düz Kas	Damar Duvarı	İskelet Kası	Kalp Kası	Kemik
Fibronektin	++	++	++	++	++
Hyalüronik asit	++	++	++	++	++
Kollagen tip IV	+	+	+	+	+
Laminin	+	+	+	+	+

Tablo 7. Grup II (A-)’deki dokularda ESM proteinleri yoğunluğu

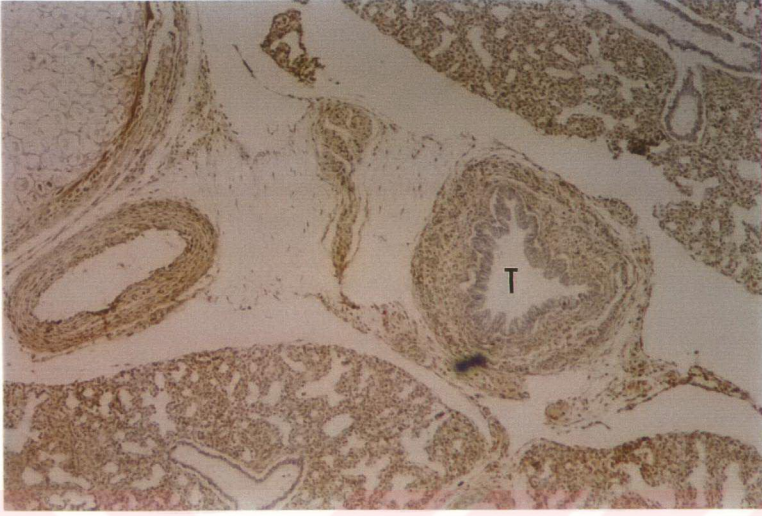
	Düz Kas	Damar Duvarı	İskelet Kası	Kalp Kası	Kemik
Fibronektin	++	++	++	++	++
Hyalüronik asit	++	++	++	++	++
Kollagen tip IV	+	+	+	+	+
Laminin	+	+	+	+	+



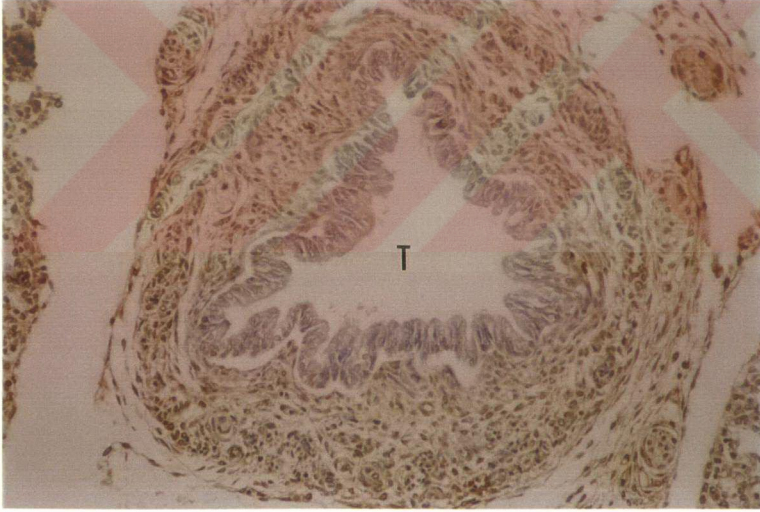
Resim 8. Fibronektin için immunohistokimyasal boyama  
Normal fetus Ö: Özofagus (4 X)



Resim 9. Fibronektin için immunohistokimyasal boyama  
Normal fetus T: Trakea (4X)



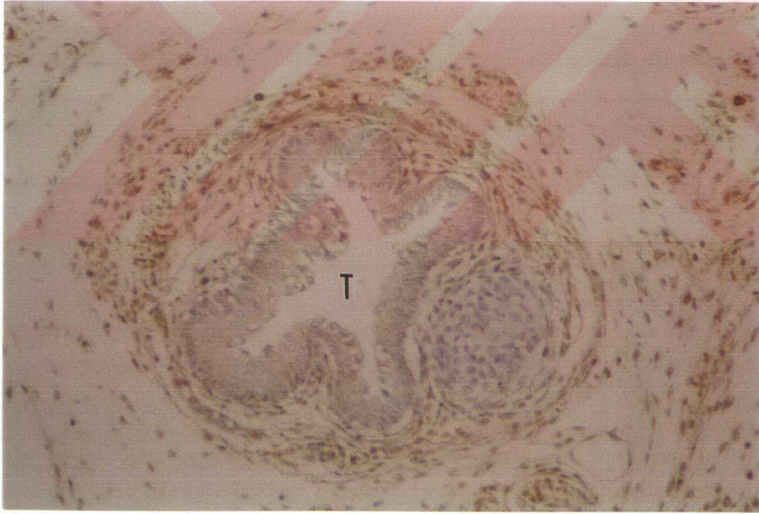
Resim 10. Fibronektin için immunohistokimyasal boyama  
ÖA'lı fetus T: Trakea (4X)



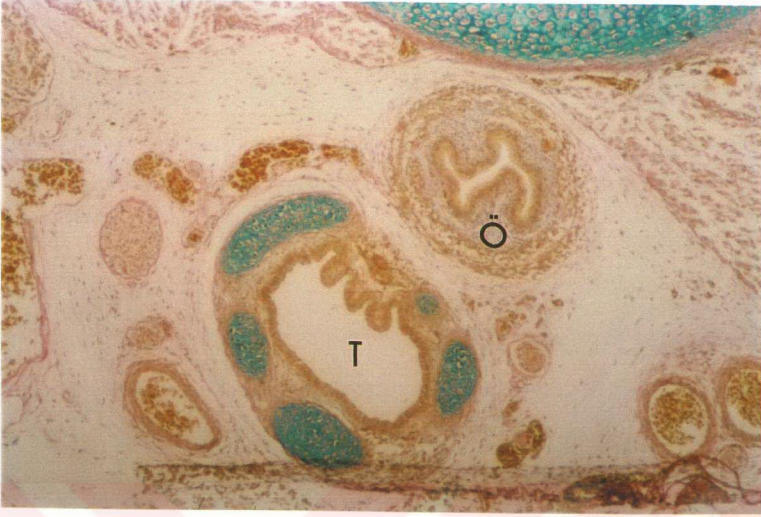
Resim 11. Fibronektin için immunohistokimyasal boyama  
ÖA'lı fetus T: Trakea (10X)



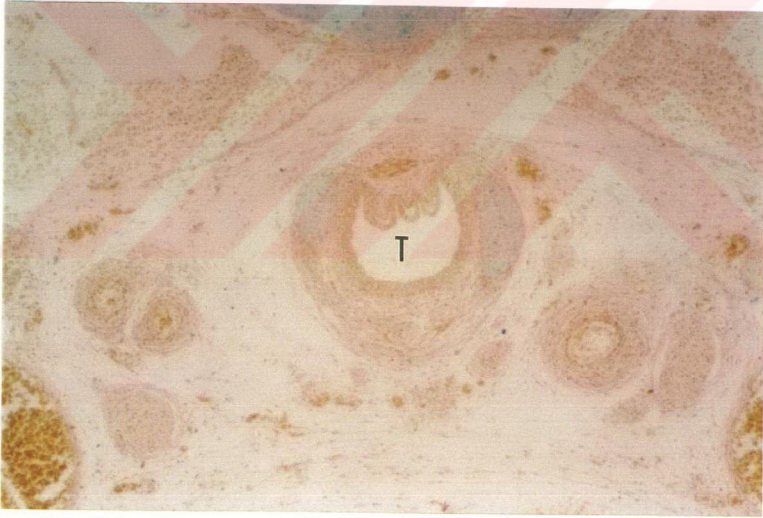
Resim 12. Kollajen tip IV için immunohistokimyasal boyama  
Ö: Özofagus (10X)



Resim 13. Laminin için immunohistokimyasal boyama  
ÖA'lı fetus T: Trakea (10X)



Resim 14. Hyaluronik asit için histokimyasal boyama  
Normal fetus Ö: Özofagus T: Trakea



Resim 15. Hyaluronik asit için histokimyasal boyama  
ÖA'lı fetus T: Trakea

## TARTIŞMA

### Gereç ve Yöntemin İrdelenmesi

Çalışmamızda kullandığımız hayvan modeli, ilk defa 1995 yılında Tovar ve ark. tarafından Wistar türü sıçanlarda oluşturulmuştur<sup>(5)</sup>. Daha sonra aynı model, Sprague Dawley sıçanlarda da çalışılmıştır<sup>(7,8,10)</sup>. İlk yapılan çalışmalarda 1.5, 1.75 ve 2 mg/kg/gün adriamisin dozları gebe sıçanlarda denenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda bazı araştırmacılar 1.75 mg/kg/gün, bazıları da 2 mg/kg doz miktarını tercih etmişlerdir<sup>(5,7,8,10)</sup>. Orford ve Cass'ın 1999 yılında yaptığı çalışmada, sıçan modelinde adriamisin ile anomali ilişkisini saptamışlardır. Bu çalışmada 1.25 ve 1.5 mg/kg/gün adriamisin dozunun sıçanlarda anomali oluşturan eşik doz olduğu, 2.25 mg/kg/gün dozu uygulandığında bütün fetuslarda anomali olduğunu, 2.5 mg/kg/gün dozunda ise bütün fetusların ölü doğduğunu belirtmişlerdir. Kullanılan güvenli doz aralığını 1.75 – 2 mg/kg/gün olarak kesinleştirmişlerdir<sup>(51)</sup>. Biz de çalışmamızda 2 mg/kg/gün dozunu kullandık.

Çalışmamızdaki gebe sıçanların kilo takibinde dikkati çeken tek nokta, grupların kendi içinde gestasyonun 0. ve 21. günlerindeki ortalama kilolarını karşılaştırdığımızda ortaya çıktı. Kontrol grubunda ki gebe sıçanların adriamisin grubuna göre daha fazla kilo almışlardı. Bu da bize göstermiştir ki, adriamisine maruz kalan dişi sıçanlar, fetus ağırlıkları çıkarıldığında ,gebelikte kilo kaybetmişlerdir. Ancak bunun sebebi şu ana kadar yapılan çalışmalarda açıklanamamıştır.

Fetusları incelediğimizde ise, hem amniyon mayili hem de yalın tartılarında kontrol grubu ile çalışma grubu arasında istatistiksel olarak fark vardır. Çalışma grubundaki fetusların kontrol grubundakilere oranla daha zayıf olmalarının sebebini adriamisine maruz kalmalarına bağlanmıştır. Bunun nedeni de şu ana kadar ortaya konamamıştır.

Çalışmada elde edilen fetuslarda diseksiyon yapmadan, horizontal kesitler almamızın en önemli nedeni; özofagus ve çevre dokulara zarar vermemek, aynı zamanda ESM proteinlerini geniş bir çevre dokuda incelemek isteği idi.

ESM proteinlerini inceleyen diğer çalışmalara baktığımızda bu maddelerin tespiti için en sık immunohistokimyasal metodun kullanılmış olduğu dikkati çekmektedir<sup>(52,53,54)</sup>. Ancak bu metod, kısıtlılıkları olan bir tekniktir; bu kısıtlılıklar antijen geri kazanımı ile ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Ancak başarı, ölçülebilir kriterlere sahip değildir.

İmmunohistokimyasal teknik yorum açısından kantitatif değil, kalitatif bir yöntemdir. En büyük avantajı bakılan maddelerin yerleşiminin belirlenmesidir<sup>(52,53)</sup>. Ancak ortamda, ölçülmesi planlanan madde yoğunluğu düşük olduğunda, kantitatif yöntemlere örneğin, polimeraz zincir reaksiyonuna göre duyarlılığı düşüktür. Yine de ESM proteinleri ile ilgili çalışmalara baktığımızda immunohistokimyasal yöntem ile , kalitatif değerlendirme yapılan bir çok çalışmayı görmekteyiz<sup>(52,53,54)</sup>. Laboratuvarımızda sık kullanılan bir yöntem olması ve tecrübe birikimi nedeniyle biz de immunohistokimyasal incelemeyi tercih ettik.

Çalışmamızda kullanılan laminin, kollajen tip IV ve fibronektin antikorlarının tümünün insana özgün antikorlar olmasına karşın önceki benzer çalışmalarımız ile bu kitlerin sıçanlar için de uygun olduğu ve oldukça iyi sonuçlar alındığı gösterilmiştir.

## **Bulguların İrdelenmesi**

Yutma zorluğu, kusma, GER ve sık akciğer enfeksiyonları gibi yakınmalara neden olan özofagus motilite bozukluğu, ÖA ameliyatı geçirmiş hastalarda, özofagus lümen içi manometrik, pH ve/veya radyolojik çalışmalarla saptanmaktadır<sup>(1,2,55,56)</sup>. Hastalar özellikle yutma zorluğu ve/veya aspirasyona bağlı solunum sıkıntısı nedeniyle başvurmaktadır. Başarılı ÖA onarımı yapılan hastalarda hiç bir darlık, refistül, GER saptanmadan da motilite sorunu görüldüğü bilinmektedir<sup>(55,56)</sup>. Bu nedenle uzun yıllardır araştırmacılar için ilginç bir konu oluşturmaktadır. Lind 1966 yılında, ÖA nedeniyle primer onarım ameliyatı geçirmiş hastalarında yaptığı manometri çalışmasında, uygunsuz dalgalanmalar veya aperistaltik alanlar kaydetmiştir<sup>(57)</sup>. Burgess ve ark.1968 yılında, ÜÖS ve AÖS işlevlerini normal bulurken, anastomozun proksimalinde bir-kaç cm'lik aperistaltik alan saptamıştır<sup>(58)</sup>. Duranceau ve ark. ise 1977 yılında, ÜÖS işlevini, dinlenme basıncını ve farenks ile AÖS arasındaki uyumu normal bulurken bazı hastalarda da ÜÖS'de yetersiz gevşeme görmüştür<sup>(59)</sup>.

Bu çalışmalar sonucunda gösterilen ÖA'da motilite bozukluklarının kaynağı, bazı yazarlar tarafından primer (doğumsal nöromusküler anomali), bazılarına göre de sekonder (ameliyat sırasında özofagus ekstrinsik sinir sistemine zarar verilmesi gibi) nedenlere bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Ancak yapılan araştırmalara karşın etiyolojisi halen tam olarak ortaya konamamıştır.

ÖA'lı yenidoğanların ameliyat öncesi proksimal ve distal poşlarda yapılan manometrik incelemelerin bir kısmı primer bir kısmı da sekonder nedenlere işaret eden sonuçlar vermişdir. Romeo ve ark. 1987 yılında 20 ÖA'lı yenidoğanda yaptığı çalışmada 2 hastada ÜÖS'de, 3 hastada AÖS'de bozukluk, hastaların tümünde ise üst poşta motor uyumsuzluk saptamıştır<sup>(2)</sup>. Ancak bu çalışmaya, özofagus motilitesinin yenidoğan döneminde olgunlaşmasını tamamlamadığı savıyla itiraz edilmiştir. Montgomery ve ark. da 1998 yılında yeni geliştirilen videomanometri cihazı sayesinde bu hastalarda farenks kasılması ile ÜÖS gevşemesi arasında bir uyumsuzluk olduğunu saptamışlardır<sup>(3)</sup>. Ayrıca Nakazato ve ark. ÖA'lı hastalarda özofagus ve mideden aldıkları biyopsilerde anormal Auerbach pleksusları bulmuşlardır<sup>(60)</sup>. Yapılan bu alışmalar, ÖA motilite bozukluğunun primer nedenlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Motilite bozukluğunun sekonder nedenlere bağlı olabileceğini düşündüren çalışmaların ilki ise, 1962 yılında Carveth tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada köpeklerde servikal vagotomi sonrası düşük değerli özofagus kasılmaları saptanmıştır<sup>(61)</sup>. Shono ve ark. da 1993 yılında izole ÖA'lı bir hastada geç dönemde, üst ve alt poşun manometrik incelemesinde, her iki poşun uygun kasıldığını bulmuşlardır<sup>(4)</sup>. Aynı grubun köpeklerde yaptıkları özofagus geniş diseksiyonu sonrası manometrik incelemelerinde, anormal kasılmalar görölmüştür. Davies'in 1996 yılında ÖA'lı kadavrada yaptığı çalışma, vagus ve reküren larengeal sinirlerin özofagusa daha az dal

verdiğini ve primer onarımda diseksiyonun ekstrinsik sinir sistemini zarara uğrattığını göstermiştir<sup>(62)</sup>.

Motilite konusunda, manometrik ve kadavra çalışmalarından ileri gidilemeyen 1990'lı yılların ortalarında, Tovar ve ark. tarafından, tipleri ve eşlik eden anomalileri yönünden, insanlarda görülen ÖA'ya yakınlık gösteren bir hayvan modeli oluşturulmasıyla<sup>(5)</sup>, ÖA'da cevaplanamamış sorular hızla araştırılmaya başlanmıştır.

Bu sıçan modelinde motilite üzerine yapılan birkaç çalışmada ise, etiyojinin primer kaynaklı olabileceğini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Qi ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışma ile ÖA sıçan modelinde, özofagusu innerve eden vagus ve reküren larengeal sinirlerin, kontrol grubuna göre daha farklı yapıda olduğunu saptamışlardır. Bu farklar; üst poşu innerve eden reküren larengeal sinirler ve alt poşu innerve eden vagus sinirinin özofagusa daha az dal vermesi, sol vagusun da aort arkusunu geçtikten sonra sağ vagus ile birleşerek tek bir sinir trasesi oluşturmasıdır<sup>(10)</sup>.

Ekstrinsik sinir sisteminde bozukluk saptayan araştırmacılar, son bir kaç yılda ÖA sıçan modeliyle beraber motilitede önemli rol oynayan intrinsik sinir sistemini de sorgulamaya başladılar. İlk olarak 1997 yılında Cheng ve ark. nöropeptid ve nöral markerların tespiti için yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada, atretik özofagusta S100 ve galanin seviyelerini yüksek düzeyde bulmuşlardır. S100 glial hücrelerde yer alan bir proteindir ve bunun yüksek bulunması nöral hasara sekonder glial hücre hipertrofisi olabileceğini düşündürmektedir. Motiliteyi ve AÖS gevşemesini yok eden galaninin yüksek bulunması ise, bu maddenin motilite

bozukluğundan sorumlu olabileceğini akla getirmektedir<sup>(63)</sup>. Cheng, iki yıl sonra aynı sıçan modelinde, enterik sinir sistemi morfolojisini incelemiştir. Bunun sonucunda, atretik pošta myenterik ganglionların azalıp, sinir dokusu demetlerinin arttığını ve pleksus boylarının kontrol grubuna göre yarı yarıya kısaldığını göstermiştir<sup>(12)</sup>. Qi ve ark. ise 1999 yılında atretik pošta kontrol grubuna göre anlamlı olarak, myenterik pleksustaki ganglion hücrelerinin ve sinir liflerinin azalmış olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda intrinsik sinir sistemi nöropeptidlerinden VIP ve “Substans P”yi çok düşük seviyede tespit etmiş ve motilite sorununun cevabının bunlarda olabileceğini öne sürmüştür<sup>(13)</sup>. Tüm bu saptamalara karşın, ÖA'nın intrinsik sinir sistemindeki bozukluğunun nedenini irdeleyen çalışma yapılmamıştır.

İntrinsik sinir sistemi yapısını inceleyen çalışmalar, ESM proteinlerinin bu sistemin göçünde ve olgunlaşmasında önemli rol aldığını göstermektedir. Çalışmamız içinde üzerinde en çok çalışılan, yapısı ve görevleri en iyi şekilde ortaya konan ESM proteinlerinden; laminin, fibronektin, kollagen tip IV ve hyalüronik asidi incelemeye karar verdik.

Ericson ve Turley 1983 yılında, nöral krest hücre kültürlerinde kollajen, fibronektin, hyaluronik asit, kondrotin sülfat gibi ESM bileşenlerinin değişik konsantrasyonları ve kombinasyonlarından, bu hücrelerin hareketlerinin nasıl etkilendiğini araştırmışlardır<sup>(64)</sup>. Fibronektin hem yayılma şiddeti hem de yayılma yönünü etkileyen bileşik olarak saptanmıştır. Ayrıca fibronektin konsantrasyonunun da önemli rol oynadığı; yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümü ile sonlandığı, düşük konsantrasyonlarda ise hücre yayılım hızının yavaşladığı gözlenmiştir. Kollajen, fibronektinin bağlanması için bir iskelet

görevi görmekte, ya da fibronektin matriksteki kollajen fibrillerini organize etmektedir. Düşük konsantrasyondaki hyaluronik asit ise morfolojiyi etkilemezken yayılım hızını belirgin olarak düşürmüştür<sup>(14,49,50,65)</sup>.

Yukarıda sunulan ve benzer çalışmalardan yola çıkarak biz de, ÖA'da intrinsik sinir sistemindeki bozukluktan, embriyolojik dönemdeki yüksek veya düşük konsantrasyonda ki fibronektin düzeyinin sorumlu tutulabileceğini düşünerek, fibronektini çalışma parametrelerimizden biri olarak seçtik.

Fibronektin, nöral krest hücre göçünü etkileyen en önemli ESM proteindir. Göçün başlangıcında en yüksek yoğunlukta iken göçün tamamlanmasına paralel bir şekilde azalır ve ganglionlar oluştuğunda ise, en düşük seviyeye ulaşır<sup>(14,65)</sup>. İnsan embriyoları ile yapılan çalışmalarda fibronektin immunoreaktivitesinin nöral hücre göçünden hemen önce, başlangıçta bazal membranda, daha sonra ise düz kas tabakasında varlığı gösterilmiştir<sup>(52)</sup>. Nöral krest hücreleri özellikle fibronektinin zengin olduğu alana lokalize olmuşlardır. Ayrıca in vitro çalışmalarda fibronektinin ortamdan uzaklaştırılması sonucunda nöronal dokuda hem asetilkolin esteraz hem de kolinasetil transferaz ekspresyonunun inhibe olduğu görülmüştür<sup>(66)</sup>. Bunun da anlamı, kolinerjik diferansiyasyonun bloke olmasıdır. Parikh ve ark.1994 yılında Hirschsprung hastalığı (HH) nedeniyle opere olan hastaların transizyonel zon ve aganglionik kolon spesimenlerinde yaptıkları çalışmada, tenaskin ve fibronektini, bazal membran ve mezenşimal dokuda oldukça yoğun olarak bulmuşlardır. Daha önce yapılan in vitro çalışmalardan da fazla miktardaki tenaskin ve fibronektinin nöral krest hücrelerinin göçünü

engellediđi bilindiđinden, HH'deki intrinsik sinir sistemi bozukluđunun bu maddelerin yođunluđuna bađlı olabileceđi dűşünűlműştür<sup>(14,53)</sup>.

Çalışmamızda, fibronektinin immunoreaktivite skoru; damar duvarı, düz kas, iskelet kası, kalp kası ve kemik için aynı ( ++ ) olarak değerlendirilmiştir. Sözü edilen tüm yerleşimlerde gruplar arasında kalitatif olarak fark yoktur. Nakazato ve Cheng'in çalışmalarının sonuçları ışığında yüksek veya düşük konsantrasyonlarda ki fibronektinin hipoganglionozisin oluř nedenlerinden biri olabileceğini dűşünsek de, çalışmamızın sonuçları bu tip bir yorumu yapabilmekten uzaktır<sup>(12,60)</sup>.

Hyaluronik asit de ESM'nin temel yapı taşlarından biridir. İnsan embriyolarında barsak gelişimin ilk evrelerinde bağ dokusunda yaygın olarak bulunur<sup>(52)</sup>. Bu yüzden parametrelerimizden birini de hyaluronik asit oluşturur.

Hyaluronik asit, intrinsik sinir sisteminin gelişiminden sonra kraniyokaudal yönde kademeli olarak azalıp kaybolur. Gestasyonun ilk günlerindeki belli yoğunluktaki hyaluronik asitin, intrinsik sinir sistemin göçünün başlaması için önemli olduğu saptanmıştır<sup>(52)</sup>. Tavuk embriyolarında hyaluronidaz enzimi verilerek ortamdaki hyaluronik asiti uzaklaştırıldığında, bu göçün olmadığı görűlműştür<sup>(14)</sup>. Hyaluronik asidin yüksek veya düşük konsantrasyonlarının intrinsik sinir sisteminin oluşum mekanizmasına yönelik bilgi verebileceğini dűşünerek, çalışmamıza dahil ettik. Ancak çalışmamız sonucunda, her üç fetus grubunda saptanan hyaluronik asit yoğunlukları, seçilen tüm dokular için aynı düzeyde bulunmuştur. Bu

nedenle, ESM'in bu temel taşının da ÖA sıçan modelindeki bozuk intrinsik sinir sisteminden sorumlu tutulamayacağını düşündük.

Kollajen tip IV de çok sayıdaki kollajen tipleri arasında bazal membranlarda bulunan tek kollajen olarak bilinir. Diğer bazal membran bileşeni olan laminin, entaktin ve heparan sülfat proteoglikanların birbirleri ile kaynaşması için iskelet görevi görür. İnsan embriyoları ile yapılan çalışmalarda, embriyonik döngü sırasında ilk olarak kolon bazal membranında, daha sonra ise düz kas tabakasında ortaya çıktığı saptanmıştır. Nöral göçten sonra ise gerek submukozal gerekse myenterik aksonal proliferasyon odaklarında yoğunluk kazanmaktadır<sup>(14,49,50)</sup>. Sıçan fetuslarında bazal membran boyanması E15,5 günden itibaren kaybolmaktadır<sup>(66)</sup>.

Lamininin erken embriyolojik dönemdeki dağılımı fibronektine benzemektedir. Laminin dağılımı, gestasyonun 4. haftasında gelişen barsaktaki epitelyal ve endoteliyal bazal membranla sınırlıdır. Nörofilamanların mezenkim içinde gözükmeleriyle, aksonların etrafında da görülmeye başlanır. Nöral krest hücrelerinin göçünü tamamlamasından sonra, gelişen barsak mezenkiminde zayıf immunoreaktivite gösterir<sup>(14,50,54)</sup>. HH modeli olarak kullanılan mutant farelerin son barsaklarında nöronal göçten önce iç sirküler düz kas tabakasında kollajen ve laminin miktarlarının fazla olduğu görülmüştür<sup>(67,68)</sup>. Benzer bulgu, Parikh ve ark.'nın HH'li hastaların aganglionik ve normoganglionik kolon segmentlerinde yaptığı çalışmada da saptanmıştır. Aynı grubun 1992 yılında yaptığı benzer bir çalışmada ise lamininin aganglionik segmentte kantitatif olarak oldukça fazla (32,4 ng/mg), normoganglionik kısımda daha az (17,2 ng/mg) ve

normal kontrol grubunda ise en az miktarda (9,7 ng/mg) olduğu bulunmuştur<sup>(54)</sup>. Bizim çalışmamızda incelenen tüm doku grupları için, laminin ve kollajen tip IV'ün yoğunlukları açısından, gruplar arasında fark görülmemiştir. Laminin ve kollajen tip IV için saptadığımız bu bulgular da diğer iki ESM proteinin de olduğu gibi, bozuk intrinsek sinir sistemi mekanizmasına işaret etmekten uzak gözükmektedir.

HH için yapılan çalışmalarda, intrinsek sinir sisteminin anormal gelişimi term fetuslarda, ESM proteinleri kullanılarak gösterilmektedir. Bu nedenle bizde ESM proteinlerini inceleme penceresi olarak gestasyonun 20. gününü tercih ettik. Ancak gestasyonun 21. günü gruplar arasında, dört ayrı ESM proteini için de hiç fark bulmamamızın gestasyonun daha önceki dönemleri için bir gösterge olmayacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamız, ÖA sıçan modelinde intrinsek sinir sistemi bozukluğunun nedenini, ESM proteinlerin etkisi yönünde sorgulayan ilk araştırmadır. Literatürde intrinsek sinir sistemi bozukluğu ve ESM proteinleri ilişkisi yönünden benzer bir sorgulama HH çalışmalarında yer almaktadır. Mutant farelerde oluşturulan HH modelinde ve HH olan çocukların spesimenlerinden elde edilen sonuçlar benzerlik göstermekte ve kontrol grubuna göre yüksek bulunan ESM protein seviyelerinin bu hastalıktaki intrinsek sinir sistemi bozukluğundan sorumlu olabileceğini düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda da ESM proteinleri kontrol grubuna göre yüksek veya düşük çıksaydı, yorumumuz da bu verilere göre olacaktı. Yüksek seviyede ki proteinlerin nöral krest hücreleri üzerindeki yok edici etkisinden, düşük seviyede ki proteinlerinde, nöral krest hücrelerinin göç ve olgunlaşmasını azalttığından sözedebilecektik.

Sonuç olarak, intrinsik sinir sisteminin g ve olgunlaşmasında rol oynayan ESM proteinlerinden; fibronektin, hyaluronik asit, kollajen tip IV ve laminini, çalışmamızdaki tüm gruplar için bakılan her dokuda aynı yoğunlukta saptadık. Bu da bize, A sıçan modelinde, bozuk intrinsik sinir sistemi oluşumunda, ESM proteinlerinden daha farklı etkenlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.



## SONUÇ

Bu çalışmada, ÖA sıçan modelinde intrinsik sinir sistemi ile ekstrasellüler matriks proteinleri arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Gestasyonel dönemde, intrinsik sinir sistemi göçü ve olgunlaşmasında rol oynayan ESM proteinlerinden; laminin, kollajen tip IV, fibronektin ve hyaluronik asidi kalitatif olarak değerlendirdik.

Çalışmamızın sonunda, bu dört ESM proteinini bakılan her grup ve dokuda aynı yoğunlukta saptadık. Bu da bize, ÖA sıçan modelinde bozuk intrinsik sinir sistemi oluşumundan, ESM proteinlerinin sorumlu olmadığını düşündürmektedir.

## ÖZET

Özofagus motilite bozukluğu, ÖA ameliyatı geçirmiş hastalarda sık karşılaşılan bir sorundur. Bu temel problemin sebebinin primer (doğumsal nöromusküler anomali) veya sekonder (ameliyat sırasında özofagus ekstrinsik sinir sistemine zarar verilmesi gibi) nedenlere bağlı olabileceğini düşündüren bir çok çalışma yapılmasına karşın, bozuk olduğu saptanan intrinsik sinir sistemi oluş mekanizmasını açıklayacak hiç bir çalışma yapılmamıştır.

Bu amaçla; gestasyonel dönemde intrinsik sinir sisteminin göçünde ve olgunlaşmasında rol oynayan ESM proteinleri ile intrinsik sinir sistemi ilişkisini ÖA sıçan modelinde inceledik.

Gruplarımızı, kontrol grubu (grup I), adriamisine maruz kalar ÖA gelişen grup II (A+) ve adriamisine maruz kaldığı halde ÖA gelişmeyen grup II (A-) fetuslardan oluşturduk. ESM proteinlerinden laminin, kollajen tip IV ve fibronektini immunohistokimya, hyaluronik asidi ise histokimyasal yöntemle kalitatif olarak değerlendirdik.

Sonuç olarak; ESM proteinlerini bakılan tüm gruplar için her dokuda aynı yoğunlukta saptadık. Bu da bize, ÖA sıçan modelinde bozuk intrinsik sinir sistemi oluşumundan ESM proteinlerinin sorumlu olmadığını düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. O'Neill JA, Rowe MI: *Pediatric Surgery*. 5<sup>th</sup> Edition: 959, 1998
2. Romeo G, Zuccorello B, Pioietto F, Romeo C: Disorders of the Esophageal Motor Activity in Atresia of the Esophagus. *J Pediatr Surg* 22(2): 120-124, 1987
3. Montgomery M, Witt H, Kvyylenstierna R, Frencker B: Swallowing Disorders After Esophageal Atresia Evaluated with Videomanometry. *J Pediatr Surg* 33(8): 1219-1223, 1998
4. Shono T, Suito S, et al: Motility of the Esophagus Before Primary Anastomosis in Esophageal Atresia. *J Pediatr Surg* 28(5): 673-676, 1993
5. Diez-Pordo JA, Baoquan Q, Navarro C, Tovar AJ: A New Rodent Experimental Model of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula: Preliminary Report. *J Pediatr Surg* 31(4): 498-502, 1996
6. Qi B, Diez-Pordo JA, Navarro C, Tovar AJ: Narrowing the Embryologic Window of the Adriomycin-induced Fetal Rat Model of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. *Pediatr Surg Int* 11: 444-447, 1996
7. Merei J, Hasthorpe S, et al: Histopathologic Study of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula in an Animal Model. *J Pediatr Surg* 32(1): 12-14, 1997
8. Zhou B, Hutson J, et al: Apoptosis in Tracheoesophageal Embryogenesis in Rat Embryos with or without Adriomycin Treatment. *J Pediatr Surg* 34(5): 872-876, 1999
9. Qi B, Merei J, et al: Tracheomalacia with Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula in Fetal Rats. *J Pediatr Surg* 32(11): 1575-1579, 1997
10. Qi B, Merei J, Hutson JM, et al: Cardiovascular Malformations in Rat Fetuses with Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula Induced by Adriomycin. *Pediatr Surg Int* 12: 556-564, 1997

11. Qi B, Merei J, Hutson JM, et al: The Vagus and Recurrent Laryngeal Nerves in the Rodent Experimental Model of Esophageal Atresia. *J Pediatr Surg* 32(11): 1580-1586, 1997
12. Cherg W, Bistop AE, Spitz L, Polak JM: Abnormal Enteric Nerve Morphology in Atretic Esophagus of Fetal Rats Adriomycin-induced Esophageal Atresia. *Pediatr Surg Int* 15: 8-10, 1999
13. Qi B, Hutson JM, et al: Intrinsic Innervation of the Esophagus in Fetal Rats with Esophageal Atresia. *Pediatr Surg Int* 15: 2-7, 1999
14. Sanes RJ: Roles of Extracellular Matrix in Neural Development. *Ann Rev Physiol* 45: 581-600, 1983
15. Orringer MB: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. 4<sup>th</sup> Edition Vol 1; 3-38, 1996
16. Moore LK: Clinically Oriented Anatomy. 2<sup>nd</sup> Edition 131-141, 1985
17. Orringer MB: Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract. 4<sup>th</sup> Edition Vol 1; 39-50, 1996
18. Pearson G, Deslauriers J: Esophageal Surgery. 2<sup>nd</sup> Edition 34-49, 1995
19. De Nardi FG, Riddel HR: The Normal Esophagus. *Am J Surg Path* 15(3): 296-309, 1991
20. Moore, Persaud: The Developing Human. 5<sup>th</sup> Edition, WB Saunders 70-92, 1993
21. Cooke J: The Early Embryo and the Formation of Body Pattern. *American Scientists* 76: 35, 1988
22. Moore, Persaud: The Developing Human. 5<sup>th</sup> Edition, WB Saunders 237-264, 1993
23. Grey SW, Skondalakis JE: Embryology for Surgeons. WH Saunders 63-100, 1972

- 24. Katharine SS, Grover MH: Septation of Respiratory and Digestive Tracts in Human Embryos: Crucial Role of the Tracheoesophageal Sulcus. The Anat Rec 238:237, 1994**
- 25. Embryology for Surgeons. Horizon XVII**
- 26. O'Neill JA, Rowe MI: Pediatric Surgery. 5<sup>th</sup> Edition: 941, 1998**
- 27. Pringle PC: Pathology of Esophageal Atresia with Tracheoesophageal Fistula. Presented at 16<sup>th</sup> Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. Fukuolca, Japan, 1993**
- 28. Gruenwald P: A Case of Atresia of Esophagus Combined with Tracheoesophageal Fistula in a 9 mm Human Embryo and its Embryological Exploration. Anat Rec 78: 293, 1940**
- 29. Vogt EC: Congenital Esophageal Atresia. A J R 22: 463, 1929**
- 30. Gross RE: Surgery of Infancy and Childhood. WB Saunders pp: 76, 1953**
- 31. Beasley SW, Myers NA, Auldish AW: Oesophageal Atresia. 1<sup>st</sup> Edition, Chapman and Hall Medical 31-43, 1991**
- 32. Fluss S, Poppen KJ: Embryogenesis of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. Arch Pathol 52: 168, 1951**
- 33. Smith EI: The Early Development of Trachea and Esophagus in Relation to Atresia of Esophagus and Tracheoesophageal Fistula. Contrib Embryol Carnegie Institution of Washington, 36: 41, 1957**
- 34. Piekarski DH, Stephans FD: The Association and Embryogenesis of Tracheo-esophageal and Anorectal Anomalies. Anorectal Malformations Associated Diseases, Progress in Pediatric Surgery, vol 9, Baltimore University Park Press, 63-76, 1976**
- 35. Keckner SC, Pringle KC, Clark EB: The Effect of Chicken Embryo Hyperflexion on Tracheoesophageal Development. J Pediatr Surg 19: 340, 1984**

36. Kieuter E: Die Angeborenen Verschiessungen und Verengungen des Darmkanals im Lichte der Entwicklungsgeschichte. Dtsch Z Chir 73: 1, 1905
37. Rosenthal AH: Congenital Atresia of Esophagus and Tracheoesophageal Fistula: Report of 8 Cases. Arch Pathol 12: 756, 1931
38. Embryology vol 2 (17), Kiebel and Mall, Philadelphia 355-68, 1980
39. Kluth D, Habenicht R: The Embryology of Usual and Unusual of Esophageal Atresia. Pediatr Surg Int 2:223, 1987
40. Kluth D, Steding G, Seidl W: The Embryology of Foregut Malformations. J Pediatr Surg 22: 389, 1987
41. Zwa TH: The Tracheo Esophageal Septum- Fact or Fantasy? Acta Arat 114: 1, 1987
42. Dickens DRV, Myers NA: Esophageal Atresia and Vertebral Anomalies. Pediatr Surg Int 2: 178, 1987
43. Barnard CN: The Genesis of Intestinal Atresia. Surg Forum 7: 393, 1956
44. Katter H, Warkang J: Congenital Malformations in Inbred Strains of Mice Induced by Riboflavin Deficient, Galaktoflavin Containing Diets. J Exp Zool 136: 531, 1957
45. Warkang J, Roth JB, Wilson GB: Multiple Congenital Malformations: A Consideration of Etiologic Factors. Pediatr 1: 462, 1948
46. Kapur RP: Contemporary Approaches Toward Understanding the Pathogenesis of Hirschprung Disease. Pediatr Pathol 13: 83-100, 1993
47. Coventry S, Yost C, Palmiter RD, Kapur RP: Migration of ganglion Cell Precursors in the Ileoceco of Normal and Lethal Spotted Embryos, a Murine Model for Hirschprung Disease. Lab Invest 71: 82-93, 1994
48. Cotran, Kumar, Robbins: Pathologic Basis of Disease 5<sup>th</sup> Edition: 41-43, 1997

- 49. Porth CM: Pathophysiology 5<sup>th</sup> Edition : 31, 1998**
- 50. Rubin E, Farber JL: Pathology 3<sup>rd</sup> Edition: 78-103, 1999**
- 51. Oxford JE, Cass DT: Dose Response Relationship Between Adriamycin and Birth Defects in a Rat Model of VATER Association. J Pediatr Surg 34(3): 392-398, 1999**
- 52. Fujimoto T, Hato J, Yokoyama S, Mitomi T: A Study of the Extracellular Matrix Protein as the Migration Pathway of Neural Crest Cells in the Gut: Analysis to the Pathogenesis of Hirschprung's Disease. J Pediatr Surg 24: 550-556, 1989**
- 53. Porikh DH, Tom PKH, VonVelzen D, Edgar D: The Extracellular Matrix Components, Tenascin and Fibronectin,: An Immunohistochemical Study. J Pediatr Surg 29(10): 1302-1306, 1994**
- 54. Porikh DH, Tom PKH, VonVelzen D, Edgar D: Quantitative and Qualitative Analysis of the Extracellular Matrix Protein, Laminin, in Hirschprung's Disease. J Pediatr Surg 27(8): 991-996, 1992**
- 55. Shepard R, Fenn S, Sieber EK: Evaluation of Esophageal Function in Postoperative Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. Surgery. 59: 608-617, 1967**
- 56. Parker AF, Christie DL, Cahill CL: Incidence and Significance of Gastroesophageal Reflux Following Repair of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula and the need for Anti-reflux Procedures. J Pediatr Surg 14: 5-8, 1979**
- 57. Jindl JF, Blanchord RJ, Gudho H: Esophageal Motility in Tracheoesophageal Fistula and Esophageal Atresia. Surg Gynecol Obstet 1232: 537-564, 1966**
- 58. Burgess JN et al: Esophageal Function After Successful Repair of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. A Manometric and Cine Fluorographic Study. J Thorac Cardiovasc Surg 56: 667-673, 1968**

59. Duranceav A et al: Motor Function of the Esophagus After Repair of Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. *Surgery* 1:116-123, 1977
60. Nakazato Y, Landing BH, Wells TR: Abnormal Auerbach Plexus in the Esophagus and Stomach of Patients with Esophageal Atresia and Tracheoesophageal Fistula. *J Pediatr Surg* 21: 831-837, 1986
61. Carveth SW, Schlegel JF, Code CF et al: Esophageal Motility after Vagotomy, Phrenicotomy, Myotomy and Myectomy in Dogs. *Surg Gynecol Obstet* 114: 31, 1962
62. Davies MRQ: Anatomy of the Extrinsic Nerve Supply of the Oesophagus in the Oesophageal Atresia of the Common Type. *Pediatr Surg Int* 11: 230-233, 1996
63. Chang W, Bishop AE, Spitz L, Polak JM: Abnormalities of Neuropeptides and Neural Markers in the Esophagus of Fetal Rats with Adriomycin-induced Esophageal Atresia. *J Pediatr Surg* 32:1420-1423, 1997
64. Ericson CA, Turkey EA: Substrata Formed by Combinations of Extracellular Matrix Components Alter Neural Crest Cell Motility in vitro. *J Cell Sci* 61: 299-323, 1983
65. Newgreen D, Thiery JP: Fibronectin in Earjl Avion Embryos: Synthesis and Distribution Along the Migration Pathways of Neural Crest Cells. *Cell Tissue Res* 211: 269-291, 1980
66. Kamagata S, Danahone PK: The Effects of Fibronectin on Cholinergic Differentiation of the Fetal Colon. *J Pediatr Surg* 20: 307-314, 1985
67. Jacops-Cohen RJ et al: Inability of Neural Crest Cells to Colonise the Presumptive Aganglionic Bowel of 1s/1s Mutant Mice; Requirement for a Permasive Microenvirement. *J Comp Neurol* 255: 425-438, 1987
68. Payette RF, Tennyson VM, Pomeranz HD, Pham TD, Rothman TP, Gershon MD: Accumulation of Components of Basal Laminae: Association with the Failure of Neural Crest Cells to Colonise the Presumptive Aganglionic Bowel of 1s/1s Mutant Mice. *Dev Biol* 125: 341-360, 1988