

**T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI**

**RAT FETÜSLERİNDE DENEYSEL ÖZEFAGUS  
ATREZİSİ MODELİNDE İNTERSTİSYEL CAJAL  
HÜCRELERİNİN DAĞILIMI**

**CANER İSBİR**

**UZMANLIK TEZİ  
İZMİR-2012**

TC  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI

**RAT FETÜSLERİNDE DENEYSEL ÖZEFAGUS  
ATREZİSİ MODELİNDE İNTERSTİSYEL CAJAL  
HÜCRELERİNİN DAĞILIMI**

**UZMANLIK TEZİ**

**CANER İSBİR**

**Danışman Öğretim Üyesi: Doçent Doktor Oğuz Ateş**

**Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2011.KB.SAG.028 sayı ile  
desteklenmiştir.**

## İÇİNDEKİLER

<b>1. ÖZET.....</b>	<b>1</b>
<b>2. İNGİLİZCE ÖZET.....</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>5</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	
<b>a. Tarihçe.....</b>	<b>7</b>
<b>b. Embriyoloji.....</b>	<b>7</b>
<b>c. Adriyamisin.....</b>	<b>9</b>
<b>d. İnterstisyel Cajal hücreleri.....</b>	<b>10</b>
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>13</b>
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>15</b>
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
<b>8. SONUÇ.....</b>	<b>26</b>
<b>9. KAYNAKLAR.....</b>	<b>27</b>

## **TABLO VE GRAFİK LİSTESİ**

**Tablo:** Gruplardaki fetüslerin interstisyel Cajal hücresi skor dağılımı

**Grafik 1:** Gruplardaki fetüslerin interstisyel Cajal hücresi skor dağılımı

**Grafik 2:** Grupların İCH skor ortalamaları

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1:** Tip C özefagus atrezili rat fetüsünde trakeoözefageal fistül, ve gastroözefageal bileşke görünümü.

**Şekil 2:** Özefagus atrezili rat fetüslerinden elde edilen özefagus dokularında intermusküler alanda İCH (hematoksilen-eozin) .

**Şekil 3:** Özefagus atrezili rat fetüs özefagus dokusunun C-kit boyaması.

**Şekil 4:** Kontrol grubundaki rat fetüs özefagusunda, intermusküler tabakada yerleşimli C-kit (+) İCH.

**Şekil 5:** Adriyamisin grubunda, özefagus atrezisi eşlik etmeyen rat fetüs özefagusunda C-kit (+) boyanan İCH.

## **KISALTMALAR**

**İCH:** interstisyel Cajal hücresi

**ÖA-TEF:** özefagus atrezisi – trakeoözefageal fistül

**NO:** nitrik oksit

**Ca:** kalsiyum

**cGMP:** halkasal guanozin monofosfat

**DNA:** deoksiribonükleik asit

**RNA:** ribonükleik asit

**GÖRH:** gastroözefageal reflü hastalığı

## TEŞEKKÜR

Bu tez Doç Dr Oğuz Ateş'in danışmanlığında hazırlanmıştır.  
Bu tezin hazırlanmasında bana yardımcı olan bölümümüz öğretim üyeleri

Prof.Dr.Feza M.Akgür,

Prof.Dr. Mustafa Olguner

Prof.Dr.Gülce Hakgüder

Uzm.Dr.Osman Zeki Karakuş,

Patoloji Ana Bilim Dalından Prof.Dr.Erdener Özer, Dr.Güray Aktürk'e

Araştırma Görevlisi arkadaşlarım ve aileme teşekkür ederim

## ÖZET

### RAT FETÜSLERİNDE DENEYSEL ÖZEFAGUS ATREZİSİ MODELİNDE İNERSTİSYEL CAJAL HÜCRELERİNİN DAĞILIMI

Caner İsbir

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir

**Giriş ve Amaç:** Özefagus atrezisi 3000 canlı doğumda bir görülen gelişimsel bir anomalidir. Güncel tedavi yaklaşımı özefago-özefagostomidir. Özefagus atrezisi onarımı yapılan hastalarda ameliyat sonrası dönemde, beslenme sorunlarına yol açan anastomoz darlığı ve %90 oranına ulaşan özefagus motilite bozukluğu gibi problemler oluşabilmektedir. Bu hastalarda motilite bozukluğuna bağlı yutma güçlüğü, kusma ve gastroözefageal reflü hastalığı (GÖRH) ortaya çıkmaktadır. Özefagus atrezisi onarımı sonrası özefagusa ait motilite bozukluklarının, nöronal yapının primer malformasyonuna veya ameliyat sırasında sinir doku yaralanmalarına bağlı olabileceği tespit edilmiştir. Nöronal dokuya ait malformasyonların ise nervus vagusa ait dallanma kusurlarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Gastrointestinal sistemde gösterilen interstisyel Cajal hücreleri (İCH) motilite düzenleyici “intrinsic pacemaker“ görevi görür. Bu hücrelerin düz kas öncüllerinden meydana geldiği düşünülmektedir. GÖRH’lı gastrointestinal sistem motilite bozukluğu olan erişkin hastalarda yapılan bir çalışmada, özefagusta İCH’ne ait elektrik aktivitenin azalmış olduğu gösterilmiştir.

DeneySEL olarak, adriyamisin teratojen özelliğinden faydalanarak, rat fetüslerinde özefagus atrezisi-trakeoözefageal fistül (ÖA – TÖF) elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada rat fetüslerinde, deneysel adriyamisin özefagus atrezisi modeli kullanılarak, İCH sayı ve dağılım değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada Wistar albino ratlar kullanıldı. Gebe ratlara, gebeliğin 6 – 9. günleri arasında adriyamisin 2 mg/kg’dan 4 doz halinde intraperitoneal olarak verildi. Gebeliğin 20. gününde fetüsler sezaryen ile doğurtuldu. Fetüslerin özefagusları mikroskop



altında diseksiyon yapılarak görüntülendi. Diseksiyon sonucunda, fetüsler ÖA eşlik eden ve ÖA eşlik etmeyen olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her iki grubun özefaguslarından tam kat doku örneği alındı.

Çalışmada, uygulama yapılmayan normal rat fetüslerinden oluşan kontrol grubu, adriyamisin verilip özefagus atrezisi elde edilen ve özefagus atrezisi elde edilmeyen rat fetüsleri olmak üzere, üç grup oluşturuldu. Her üç grupta 7 fetüs elde edilinceye kadar çalışmaya devam edildi. Fetüslerden elde edilen özefagus dokuları %4 paraformaldehit ile tespit edildi. İmmünohistokimyasal yöntem (C-kit, CD117) ile İCH varlığı araştırıldı.

**Bulgular:** Tüm gruplardan elde edilen rat fetüs özefagus dokuları, immünohistokimyasal yöntem (C-kit, CD117) ile boyanarak İCH yapı ve dağılımı açısından karşılaştırıldığında; özefagus atrezili rat fetüslerinde İCH sayı ve dağılımının diğer gruplara göre anlamlı olarak azalmış olduğu tespit edildi. ( $p < 0.05$ )

**Sonuç:** Deneysel özefagus atrezisi adriyamisin rat modelinde İCH yoğunluğunun azalmış olmasının özefagus düz kas dokusunda gevşeme yanıtının azalmasına yol açarak özefagus motilite sorunlarına neden olabilir. Özefagus atrezisi onarımı yapıldıktan sonra hastalarda görülen özefagus motilite bozukluğu semptomları, İCH'nin yoğunluğunun azalması ile ilişkilendirilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Özefagus atrezisi, intersitisyel Cajal hücresi, C-kit, özefagus motilitesi

## **ABSTRACT**

### **DISTRIBUTION OF INTERSTITIAL CAJAL CELLS IN RAT FETUS ESOPHAGUS IN THE MODEL OF EXPERIMENTAL ADRIAMISIN ESOPHAGEAL ATRESIA**

**CANER İSBİR**

**Department of Pediatric Surgery, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir,  
Turkey**

**Introduction and Objective:** Esophageal atresia is a developmental anomaly seen once per 3000 live births. The current treatment approach is esophago-esophagostomy. In patients who underwent an esophageal atresia repair, such problems as anastomotic stricture which lead to nutritional problems and esophagus motility up to 90 % can appear in the postoperative period. These patients can suffer from dysphagia, vomiting and gastroesophageal reflux disease (GERD) depending on the motility disorder. It was determined that motility disorders of esophagus appearing following the esophageal atresia may result from primary malformation of neural structure or nerve tissue injuries during the operation. It was also argued that malformations of neural tissue may originate from branching faults of nervus vagus.

Interstitial Cajal cells indicated in the gastrointestinal system act as motility regulating “intrinsic pacemaker”. It is thought that these cells are composed of smooth muscle precursors. In a study carried out on adult patients suffering from gastrointestinal system motility disorder with GERD, it was demonstrated that electrical activity of interstitial Cajal cells reduced in esophagus.

Experimentally, esophageal atresia-tracheoesophageal fistula can be obtained in rat fetus by benefiting from the teratojenic feature of adriamycin.

In this study, it was aimed at evaluating the number and distribution of interstitial Cajal cells by using the experimental adriamycin esophageal atresia in rat fetus.

**Material and Method:** In this study, Wistar albino rats were used. 4 doses of adriamycin, 2 mg/kg each, were administered to pregnant rats between the 6th and 9th days of pregnancy. Fetuses were made deliver the babies with caesarian operation at the 20th day of the pregnancy. Esophagus of the fetus were dissected and viewed via microscope. At the end of dissection, fetuses were grouped into two categories: accompanied by esophageal anomaly and not accompanied by esophageal anomaly. Afterwards, tissue samples were taken from esophagus of both groups.

In this study, three groups were created: control group which includes normal rat fetus which did not undergo an effect, the group consisting of rat fetus which developed esophageal atresia following adriamycin administration and the group consisting of rat fetus which did not develop esophageal atresia. Experiments continued until 7 fetuses were obtained in each group. Esophageal tissues taken from fetus were detected with 4 % paraformaldehyde. The presence of interstitial Cajal cells was examined through the immunohistochemical method (C-kit, CD117).

**Results:** Rat fetuses esophagus tissues obtained from all groups were dyed with immunohistochemical method (C-kit, CD117) and they were compared in terms of the structure and distribution of interstitial Cajal cells. It was detected that the number and distribution of interstitial Cajal cells in the rat fetus with esophageal atresia reduced significantly when compared to the other groups ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** The decrease of interstitial Cajal cell intensity in the experimental esophageal atresia adriamycin rat model may cause esophageal motility problems by leading to a reduction in the relaxation response in the esophageal smooth muscle tissue. Esophageal motility disorder symptoms seen in patients who underwent esophageal atresia repair can be associated with the decrease of interstitial Cajal cell intensity.

**Key Words:** Esophageal atresia, interstitial Cajal cells, C-kit, esophageal motility

## GİRİŞ / AMAÇ

Özefagus atrezisinin görülme sıklığı 3000 canlı doğumda birdir (1). Özefagus atrezisinin güncel tedavi yöntemi özefago-özefagostomidir. Bu hastalarda ameliyat sonrası beslenme sorunlarına yol açan anastomoz darlığı ve %90'a ulaşan özefagus motilite bozuklukları görülmektedir (1 – 3). Motilite bozukluğu yutma zorluğu ve kusma gibi nedenlerle beslenme sorunlarına yol açarken, diğer taraftan gastroözefageal reflü hastalığına neden olmaktadır.

Özefagusa ait motilite bozukluklarının, ameliyat sırasındaki sinir doku yaralanmaları ve özefagusa ait sinir doku malformasyonlarından kaynaklanabileceği tespit edilmiştir (4 – 6). Sinir doku malformasyonlarının ise nervus vagusa ait dallanma kusurları nedeni ile olabileceği düşünülmektedir (7). Özefagus atrezisinde, özefagusun hem alt hem de üst parçalarında Auerbach pleksusunun anormal olduğu ve kas tabakasının hipoplazik ya da aplazik olduğu tespit edilmiştir (8). İzole trakeoözefageal fistül olgularında distal ve proksimal özefagus diseksiyonu sınırlı olmasına rağmen, özefagusa ait motilite bozukluğunun bu olgularda görülmesi, özefagusun intrinsik ve ekstrinsik inervasyon kusurlarının varlığını göstermektedir (9).

Gastrointestinal sistemde intrinsik inervasyondan interstisyel Cajal hücreleri (İCH) sorumlu tutulmuştur. Gastrointestinal sistemdeki İCH, barsak duvarında myenterik pleksusta, sirküler kas tabakası içerisinde ve kas lifleri arasında yer alır (10). Peristaltik dalgalar için elektrik aktivite oluşturan “İntrinsic pacemaker“ hücrelerdir. İCH'nin özefagus motilitesi üzerinde düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir (11). Özefagus atrezisi onarımı yapılan hastalarda görülen, özefagus motilite bozuklukları ile ilgili olarak; motilite üzerinde düzenleyici fonksiyonu olan İCH'nin bu konu ile ilişkisi araştırılabilir.

DeneySEL olarak adriyamin ile oluşturulan özefagus atrezisi rat modeli kullanılarak, İCH dağılımları değerlendirilebilir. Adriyaminin teratojen özelliği tanımlandıktan sonra, gebe ratlara verildiğinde rat fetüslerinde özefagus atrezisi-trakeoözefageal fistül (ÖA-TÖF) oluşturduğu bulunmuştur (12,13). Çalışmamızda deneySEL adriyamin ile oluşturulan özefagus atrezisi rat modeli kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, özefagus atrezisinde özefagus motilite bozukluğunun İCH'nin dağılım ve morfolojisi ile ilişkilendiren deneySEL bir çalışmanın olmadığı görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, adriyaminin ile oluşturulan özefagus atrezisi rat modelinde İCH dağılımına bakılarak, özefagus atrezisi ile İCH sayı ve morfolojisindeki değişiklik arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

## GENEL BİLGİLER

### Tarihçe:

Konjenital özefagus atrezisinin ilk tanımlanması 1670'de William Durston tarafından yapılmıştır. Distal trakeoözefageal fistüllü özefagus atrezisi ilk kez 1697'de Thomas Gibson tarafından tanımlanmıştır. Cerrahi düzeltme ameliyatları ise 1920'lerden sonra uygulanmaya başlanmış ve ilk kez 1939'da Leven ve Ladd tarafından gastrostomi, proksimal uca özefagostomi ve sekonder fistül bağlanması yöntemi uygulanmıştır. 1941'de Haight ve Towsley, sol torakotomi ile plevrayı açmadan primer onarımı başarı ile uygulamıştır. Yöntem 1943'de düzeltilerek günümüzde uygulanan şekli ile yerini sağ torakotomi ile yaklaşıma bırakmıştır (14,15).

### Embriyoloji:

ÖA – TÖF patogenezi tam olarak netlik kazanmamış olmakla birlikte özefagus ve trakeanın ortak embriyolojik gelişimine bağlanmaktadır. Günümüzde kabul gören gelişim teorisi şöyle tanımlanmaktadır: İntrauterin 3. haftada faringeal barsağın hemen bitim noktasında, ön barsağın ön duvarında özefagus ile trakeobronşial divertikülü ayıran özefagotrakeal septum oluşmuştur. Başlangıçta çok kısa olan özefagus, kalp ve akciğerlerin kaudale inmesi ile uzar. İki ayrı kanal halinde tek tüp olan özefagus ile trakea, intrauterin 3 – 4. haftalarda karina civarından başlayarak birbirinden ayrılır. İntrauterin 5. haftadan önce trakea ve özefagus gelişim süreçleri birbirinden bağımsız hale gelir. Ayrılma işlemi 36. gestasyonel günde tamamlanır. Özefagus ile trakeanın birbirinden ayrılarak bağımsız organlar haline gelebilmeleri, büyüme hızları arasındaki farka, hücresel farklanmaya ve doğru zamanlı bir apopitozise bağlıdır. Bu apopitozisin notokord tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (16).

İntrauterin 6 – 9. haftalarda mezenşimal dokudan özefagusun önce sirküler kasları, ardından longitudinal kasları gelişir. Kan damarları özefagusa intrauterin 3. ayda girer. Müskülaris mukoza intrauterin 4. ayda gelişir. Özefagus lümeni 7 – 8. haftalarda proliferen olan özefagus epitel hücreleri tarafından tamamen doldurulmuştur. Lümen tam tıkalı değildir ancak arada birbiri ile bağlantılı vakuoller mevcuttur.

Solid evre olarak tanımlanan bu dönemde, özefagus aslında gerçekten solid bir yapıda değildir. Özefagus lümeni intrauterin 10. hafta civarında vakuollerin birleşmesi ile açılır. Özefagus duvarı hem sempatik (torasik trunkus) hemde parasempatik (nervus vagus) sinir lifleri ile inerve olur. Özefagus nihai boyutunu intrauterin 7. haftada elde eder. Doğumda 8–10 cm olan uzunluğu, yaşamın ilk bir kaç yılında iki katına çıkar (17). İntrauterin 4. haftada ayrılma sürecinde aksaklık ya da duraksama özefagus atrezisi ve trakeoözefageal fistül oluşumuna neden olur (17).

### **Sınıflandırma:**

İlk olarak 1953’de Gross tarafından yapılarak kullanılmaya başlanmıştır (14,15).

**Tip A:** Her iki ucun kör sonlandığı izole özefagus atrezisi.

**Tip B:** Proksimal ucun trakeaya fistülize olduğu, distal ucun kör sonlandığı özefagus atrezisi.

**Tip C:** Proksimal ucun kör sonlandığı, distal ucun trakeaya fistülize olduğu özefagus atrezisi.

**Tip D:** Her iki ucun trakeaya fistülize olduğu özefagus atrezisi.

**Tip E:** Atrezi olmadan özefagusun trakeaya bir fistül ile açılması.

**Tip F:** Fistül olmadan özefagus stenozu.

### **Eşlik eden anomaliler:**

ÖA beraberinde %50 – 70 oranında eşlik eden anomaliler görülür. Bunlardan en sık olanı %30 oranında görülen ventriküler septal defekt, atriyal septal defekt, patent duktus arteriozus gibi kardiyak anomalilerdir. Bunun yanı sıra %24 intestinal (anorektal malformasyon, rotasyon anomalileri), %20 genitoüriner (renal displazi, renal agenezi), %5 – 20 nörolojik ve iskelet (hemi vertebra, sakral agenezi, radius yokluğu) anomalileri de eşlik eder. ÖA %25 – 30 oranında VACTERL (vertebral, anal, cardiac, tracheal, esophageal, renal, limb) sendromunun bir bileşeni olarak karşımıza çıkar.

ÖA – TÖF yaklaşık %47 oranında trakeobronşial anomaliler (laringeal stenoz, trakeal stenoz, trakeomalazi, pulmoner agenezi, kistik adenomatoid malformasyon) ile birliktelik gösterir.

## **İnsidans:**

ÖA yaklaşık 3000 canlı doğumda bir görülür. ÖA'li fetüslerde prematurite insidansı %34 civarında olup, %60 – 80 polihidroamnioz mevcuttur (18). En sık tip C (%86) görülür, ardından sırasıyla tip A (%8), tip E (%4), tip B (%1), tip F (%1) takip eder (15).

## **Adriyamisin:**

Adriyamisin streptomiçes türlerinden izole edilmiş, antrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Dört halkalı karakteristik bir yapısı vardır. Adriyamisin DNA'ya direkt bağlanarak, çift heliks yapısının açılmasını sağlar. DNA ve RNA sentezini bloke ederek, sitotoksik etki gösterir. Bu durum, kromozomal hasara öncülük ederek mutajenik ve teratojenik etkiyi oluşturur.

Adriyamisinin sitotoksitesisi için hücresel düzeyde bir kaç etkileşim görülmektedir. DNA'ya sıkı bir şekilde bağlanarak RNA sentezini ve DNA onarımını bloke eder. Hücresel düzeyde etkilerini, mitokondriyal koenzim Q ve DNA onarımında fonksiyon gören topoizomeraz 2 enzim inhibisyonları ile sağlamaktadır. Bu etkileşimler ile hücrede oluşan değişiklikler; mitokondriyal şişme, kritolizis ile mitokondriyal fonksiyonlarda etkilenme, kardiyolipin ve fosfotidilserin gibi fosfolipid fonksiyonlarının etkilenmesi ile membran hasarı (19) ve topoizomeraz 2 enzim inhibisyonu sonucu serbest radikal formasyonu oluşmasıdır. Topoizomeraz 2 enzimi, DNA onarımında görevli bir enzimdir. Bu enzim inhibisyonu ile DNA onarımı yapılamamakta ve hücre ölmektedir (20).

Kemoterapötik bir ajan olan adriyamisin ile teratojenite çalışmaları ilk kez 1978'de Thompson ve ark. tarafından rat ve tavşanlarda yapılmıştır (21). ÖA – TÖF ve eşlik eden diğer anomalilerin hayvan modeli olarak ilk kez tanımlanması ise 1996'da Diez-Pardo ve ark. tarafından gebe ratlara adriyamisin verilmesi ile gerçekleştirilmiştir (12). Yapılan bu çalışmada ratlara, gebeliklerinin 6 – 9. günlerinde, 2 mg/kg tekrarlayan dozlarda adriyamisinin intraperitoneal uygulanması halinde; ÖA – TÖF (%41), duodenal atrezi (%47), incebarsak atrezileri (%52), anorektal malformasyonlar (%41) olduğu gözlenmiştir.

## **İnterstisyel Cajal Hücreleri:**



Ramon Cajal 1911 yılında, barsakta kasılmalardan sorumlu sinir hücrelerinin işlevini düzenleyen interstisyel hücreleri tanımlamıştır. Bu hücelere interstisyel Cajal hücreleri (İCH) adı verilmiştir. İCH'ler C-kit aktivitesi gösterdiğinin bulunması bu hücrelerin fizyolojisinin anlaşılması için önemli bir adım olmuştur (10,22).

C-kit tirozin kinaz reseptörlerini kodlayan bir protoonkogendir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda İCH'nin C-kit aktivitesine ihtiyacı olduğu, C-kit aktivite blokajı durumunda İCH gelişiminin bozulduğu görülmüştür (10). Günümüzde İCH'nin gastrointestinal motilitede önemli olduğu ve eksikliklerinde motilite kusurları ortaya çıkabileceği belirlenmiştir (22).

### **1) Yerleşim:**

İnterstisyel Cajal hücrelerinin gastrointestinal sistemde özefagustan kolona kadar yerleştiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (22). Yerleşim bölgesi olarak, özefagustan internal anal sfinktere kadar olan bölgede submukozal, intramusküler, intermusküler alanda yer alabilir (22).

### **2) İCH yapısı:**

Elektron mikroskopik çalışmalarda, İCH'ler ovoid, hafif boyanan nükleuslu, ince perinükleer sitoplazmalı hücreler olarak gösterilmiştir (10). Çok sayıda kabarcık şeklinde görünüm veren mitokondriler içermektedir. Diğer hücreler ile arasında çok sayıda "gap junction" bulunmaktadır. İCH'ler sinir hücrelerinin genişlemiş yapıları ile komşu olup, bu sinirler tarafından inerve edilir. Genellikle bipolar yapıdadırlar.

İnterstisyel Cajal hücreleri embriyolojik olarak düz kas ile aynı mezenşimal başlangıç hücresinden köken aldığı gösterilmiştir (23). C-kit reseptörünün bloke edilmesi durumunda bu hücrelerin, düz kas fenotipine dönüştüğü görülmüştür (24).

### **3) Fonksiyon:**

İnterstisyel Cajal hücreleri elektriksel yavaş dalgalar üretmektedir. Bu dalgalar düz kas kontraktilitesini tayin ederler. Bu dalgaların yokluğunda peristaltik aktivitede yavaşlama ve inhibisyon görülür. İCH'nin asıl amacı koordineli peristaltizm için potansiyeller üretmektir.

“Pacemaker“ olarak İCH’nin görevleri, düz kaslara düzenli kasılma sağlamaları için sinyal göndererek, aynı zamanda sinir uyarılarının düz kaslara iletimi ve koordinasyonunu sağlamaktır (10, 25, 26).

Ortamdaki nitrik oksit (NO) seviyesinin artırılması ile İCH’nde düz kas hücrelerinin aksine, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunda artma olduğu gözlenmiştir. Bu durum, nitrik oksit seviyesindeki artışın İCH’yi uyardığını göstermektedir (24).

#### **4) İCH ile ilişkilendirilen motilite bozuklukları:**

İCH’nin yokluğu ve sayılarının azlığı ile ilişkilendirilen çok sayıda gastrointestinal ve üriner sistem motilite bozukluğu tanımlanmıştır (10, 11, 27, 28,). İCH’nin özefagus motilitesi bozuklukları ile ilişkilendiren, özefagus motilite bozukluğu olan GÖRH’lı erişkin hastalarda yapılan elektro-özefagogram sonuçlarını içeren bir çalışmada, İCH’ye ait olan elektriksel aktivitenin azalmış olabileceği tespit edilmiştir (11). İdiyopatik gastroparezisi olan erişkin hastalarda yapılan başka bir çalışmada, mide antrumu biyopsi materyalleri immünohistokimyasal yöntem (C-kit, CD 117) ile değerlendirilmiş, hastaların yarısında İCH dağılım ve sayısının azalmış olduğu gösterilmiştir (29).

#### **Özefagus motilite bozukluğu ve İCH ilişkisi:**

Gastrointestinal sistemde düz kas gevşemesine neden olan NO, bu hücrelerde  $Ca^{++}$  ve cGMP artışına neden olmaktadır. NO, İCH aktivitesini arttırmaktadır (30). Bu nedenle, özefagusun peristaltik hareket öncüsü olan gevşeme yanıtını oluşturan sinyallerin İCH tarafından iletildiği düşünülmektedir.

Çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda gastrointestinal sistemdeki motilite bozukluklarının, İCH’nin fonksiyonel değişiklikleri ile birlikteliği saptanmıştır (10, 11, 27, 28). Özefagus motilite bozukluğu olan gastroözefageal reflü hastalıklı bireylerde, peristaltizm için gevşeme yanıtı oluşturan interstisyel Cajal hücresine ait “pacemaker“ elektrik aktivite azalmaktadır (11).

Özefagus atrezisi nedeni ile ameliyat edilen hastalarda, özefagus motilite problemlerine bağlı olarak beslenme sorunları, GÖRH ve büyüme gelişme geriliği olduğu bilinmektedir (1

– 3). Özefagus atrezisi ile İCH ilişkisini değerlendiren ve özefagus atrezili yenidoğanlarda postmortem yapılan bir çalışma özefagus atrezisinde İCH'nin özefagusta anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir (31).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 200 – 250 gram arasında değişen primigravid dişi Wistar albino ratlar kullanıldı. Vajinal smear yapılarak smear bakısında kornifiye hücre hakimiyeti görülen ratlar östrusta kabul edilip katıma alındı. Çiftleşme sonrası 24 saat içerisinde vajinal değerlendirmede plug ve vajinal smearda spermatozoa görülmesi gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi.

Çalışmada kontrol grubu herhangi bir uygulama yapılmayan normal rat fetüslerinden oluşturuldu. Adriyamisin grubunda, gebe ratlara 6 – 9. gebelik günleri arasında adriyamisin 2 mg/kg'dan 4 doz halinde intraperitoneal olarak verildi. Gestasyonun 20. gününde, gebe ratlar eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Fetüsler sezaryen ile doğurtulduktan sonra Bouin solüsyonunda sakrifiye edildi. Mikroskop altında x8 büyütmede, mikrocerrahi aletleri kullanılarak rat fetüslerine distal özefagus diseksiyonu yapıldı. Adriyamisin grubundaki fetüsler özefagus atrezisi eşlik eden ve özefagus atrezisi eşlik etmeyen şeklinde iki gruba ayrıldı. Özefagus gastroözefageal bileşkeden başlayarak trakeal bifurkasyon bölgesine kadar diseke edildi. Tüm gruptaki fetüslerin alt 1/3 özefagus dokusundan tam kat biyopsi materyali alındı.

Çalışma grupları:

- 1) Kontrol grubu
- 2) Adriyamisin grubu
  - a) Özefagus atrezisi eşlik eden
  - b) Özefagus atrezisi eşlik etmeyen

Çalışmaya her gruptan 7 fetüs elde edilinceye kadar devam edildi.

Histopatolojik inceleme için Bouin solüsyonunda 48 saat süre ile tespit edilmiş ve parafine gömülmüş dokulardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. C-kit (CD 117) proteini eksprese eden hücreleri göstermek için immünoperoksidaz ile boyama yapıldı.

Bu amaçla kesitler deparafinize edildi ve antijeni açığa çıkarmak için mikrodalga içerisinde etilendiamintetraasetik asit (**EDTA**) tampon ile kaynatıldıktan sonra, 1/100 dilüsyonda poliklonal primer antikor (**A4502: CD 117 c-kit, DAKO, California, A.B.D**) ile muamele edildi. Daha sonra peroksidaz ve işaretli sekonder antikorlu kromojen madde (**ACT500:DAB Chromogen/Substrate Kit, Scy-Tek, Utah, ABD**) uygulandı. Pozitif boyama için kahverengi rengin ortaya çıkması beklendi. Morfolojik değerlendirme için kesitlerin kontur boyaması hematoksilin–eozin ile yapıldı.

Mikroskobik değerlendirme gruplardan habersiz bir patolog tarafından x40 objektif ile yapıldı. Rastgele 10 alandaki hücreler sayılarak ortalamaları alındı. Fetüsler ortalama İCH sayılarına göre, 1’den 3’e kadar olan skorlamaya dahil edildi. Bunlar;

**Skor-1**, hücre sayısı 0–2 arasında ise,

**Skor-2**, hücre sayısı 3–4 ise,

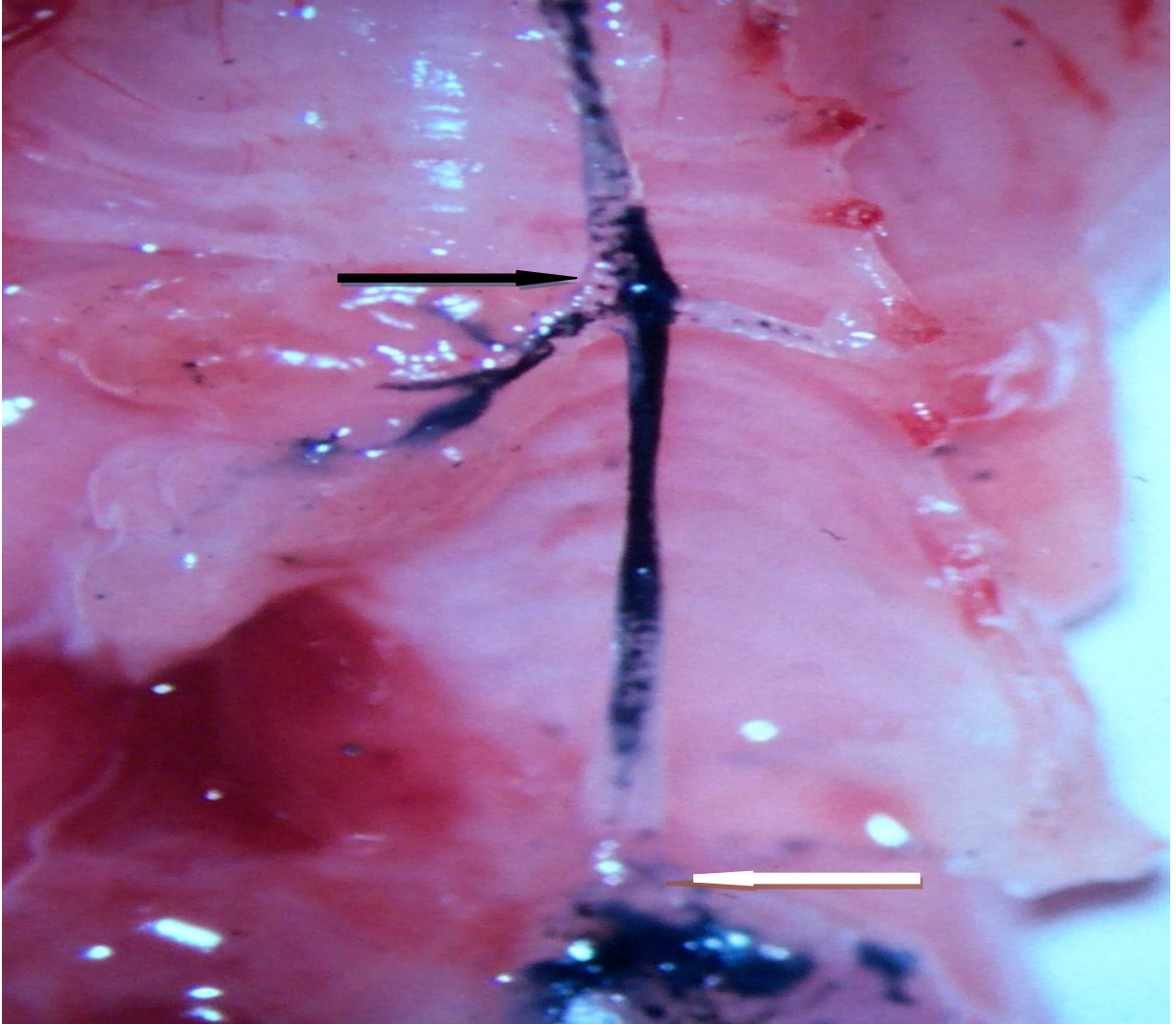
**Skor-3**, hücre sayısı 4’ün üzerinde ise.

İCH’leri fuziform yapıda ince sitoplazmalı, geniş oval nükleuslu, iki dendritik uzantılı ve müküler tabakada yer alan hücrelerdir. Benzer renkte boyanan yuvarlak santral nükleuslu, submukoza, mükularis mukoza ve mukoza yerleşimli olan mast hücrelerinden ayrımı için morfolojik farklılıklar kullanıldı.

Gruplar arasındaki istatistiksel farklar ki–kare testi ve Kruskal–Wallis testleri kullanılarak değerlendirildi.  $p$ ’nin 0.05 den küçük değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

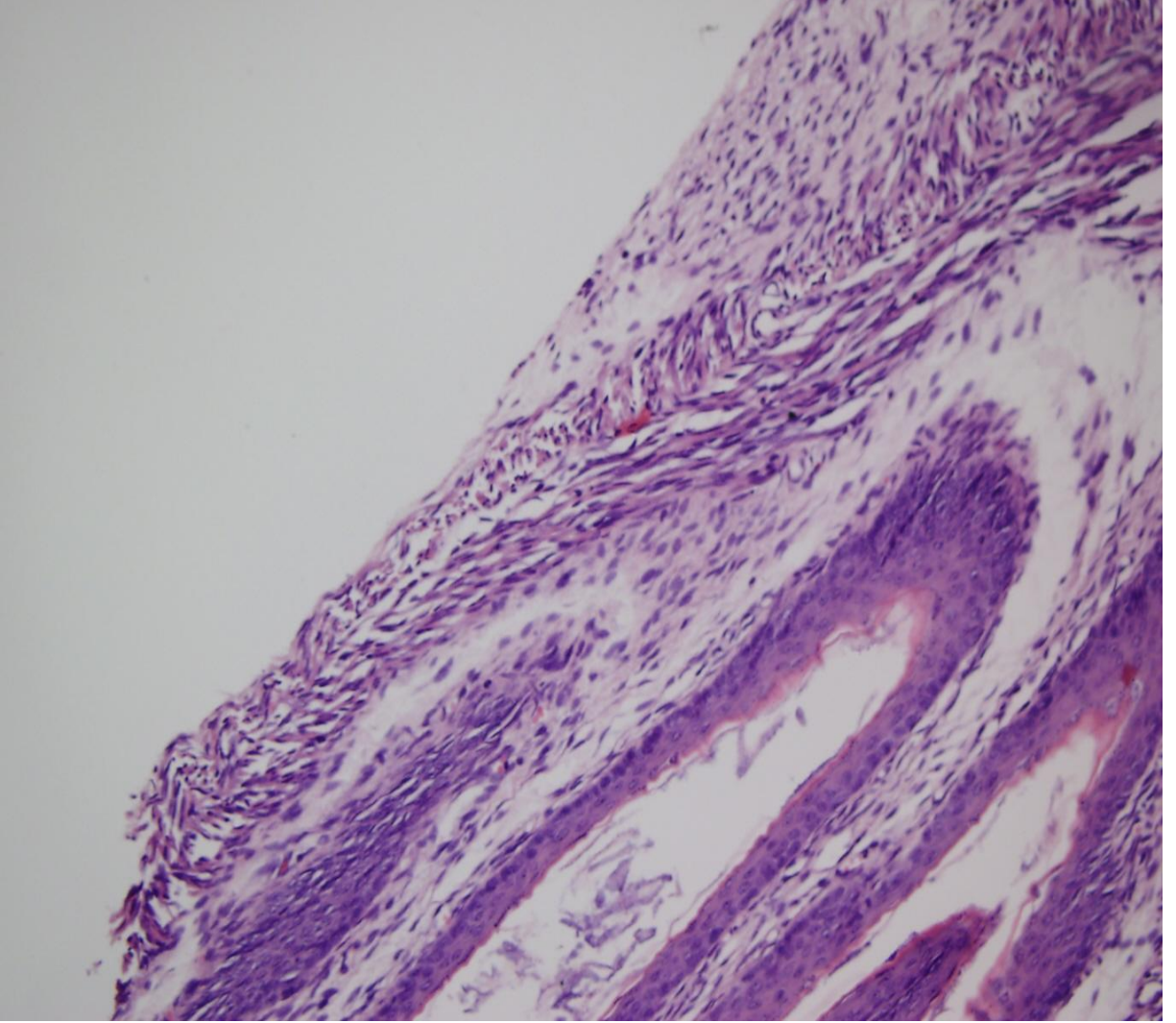
## BULGULAR

Çalışmada 5 gebe rattan 28 fetüs elde edildi. Kontrol grubu 7 fetüs ile oluşturuldu. Adriyamin grubunda, özefagus atrezisi eşlik eden 10 fetüs (%47) ve özefagus atrezisi eşlik etmeyen 11 fetüs (%53) elde edildi. Ancak her grup için 7 fetüs çalışmaya dahil edildi. Özefagus atrezili fetüslerin tamamında tip C özefagus atrezisi tespit edildi (**Şekil 1**). Bu fetüslerin proksimal özefagusları boyunlarının içerisinde kaldığı ve teknik olarak buradan sağlıklı bir doku örneği almak mümkün olmadığından dolayı yalnızca distal özefaguslarından biyopsi alındı. Bu nedenle kontrol ve özefagus atrezisi eşlik etmeyen grupta da 1/3 distal özefagustan doku örnekleri alınarak İCH sayı ve dağılımları değerlendirildi.

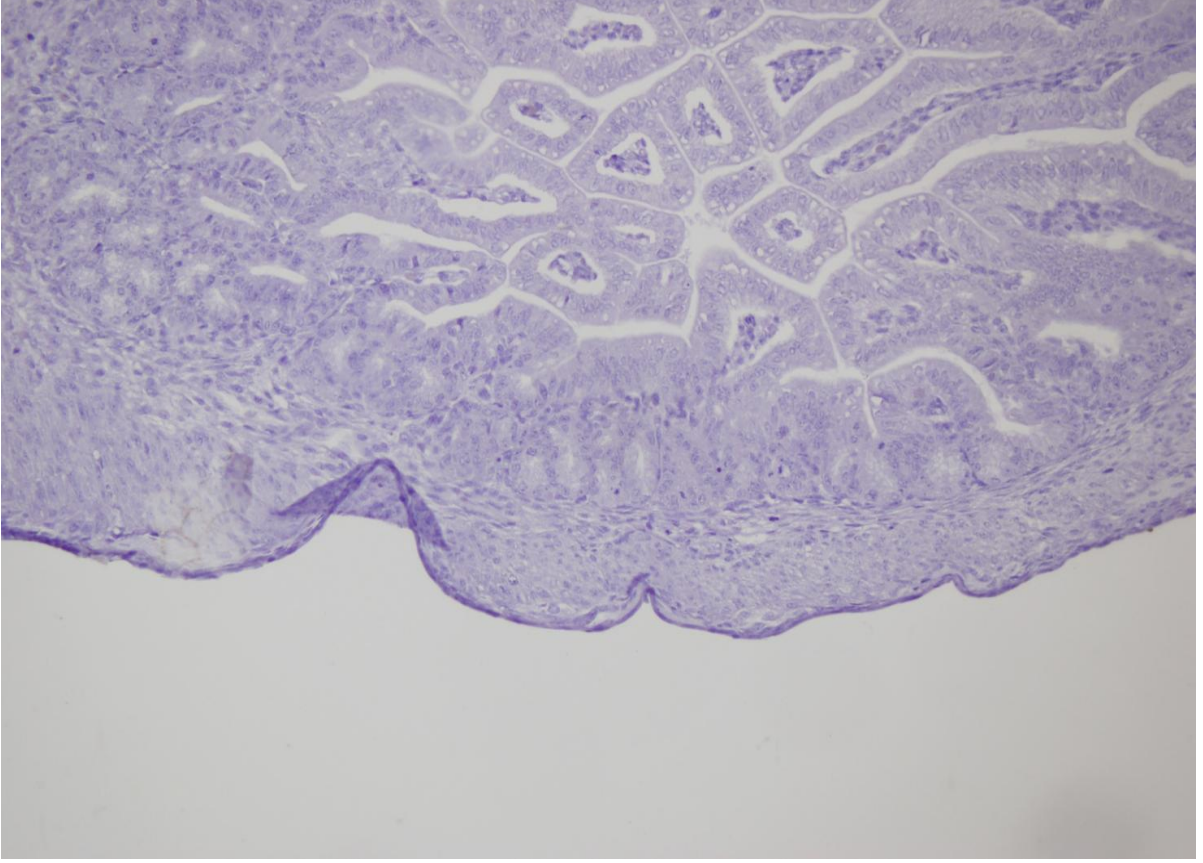


**Şekil 1:** Tip C özefagus atrezili rat fetüsünde trakeoözefageal fistül (TÖF) (siyah ok), ve gastroözefageal bileşke (beyaz ok) görünümü. Diseksiyon sırasında TÖF'ü görüntülemek için trakeadan metilen mavisi verildi.

Mikroskopik değerlendirmede hemotoksilen–eozin boyamasında İCH'ler morfolojik olarak değerlendirildi (**Şekil 2**). İmmünohistokimyasal yöntem ile yapılan boyamada ise, tüm gruplarda C-kit (CD117) pozitif boyanan hücre grubu tespit edildi. Özefagus atrezisi eşlik eden adriyamin grubunda, üç fetüse ait özefagus dokularının immünohistokimyasal yöntem (C-kit, CD117) ile boyanmadığı görüldü (**Şekil 3**). İCH'ler kas tabakası arasında ya da submukozal alanda yerleşimli, fuziform hücre yapısında, ince sitoplazmalı, geniş oval nükleuslu, dendritik uzantıya sahip olarak görüldü (**Şekil 4, 5**).

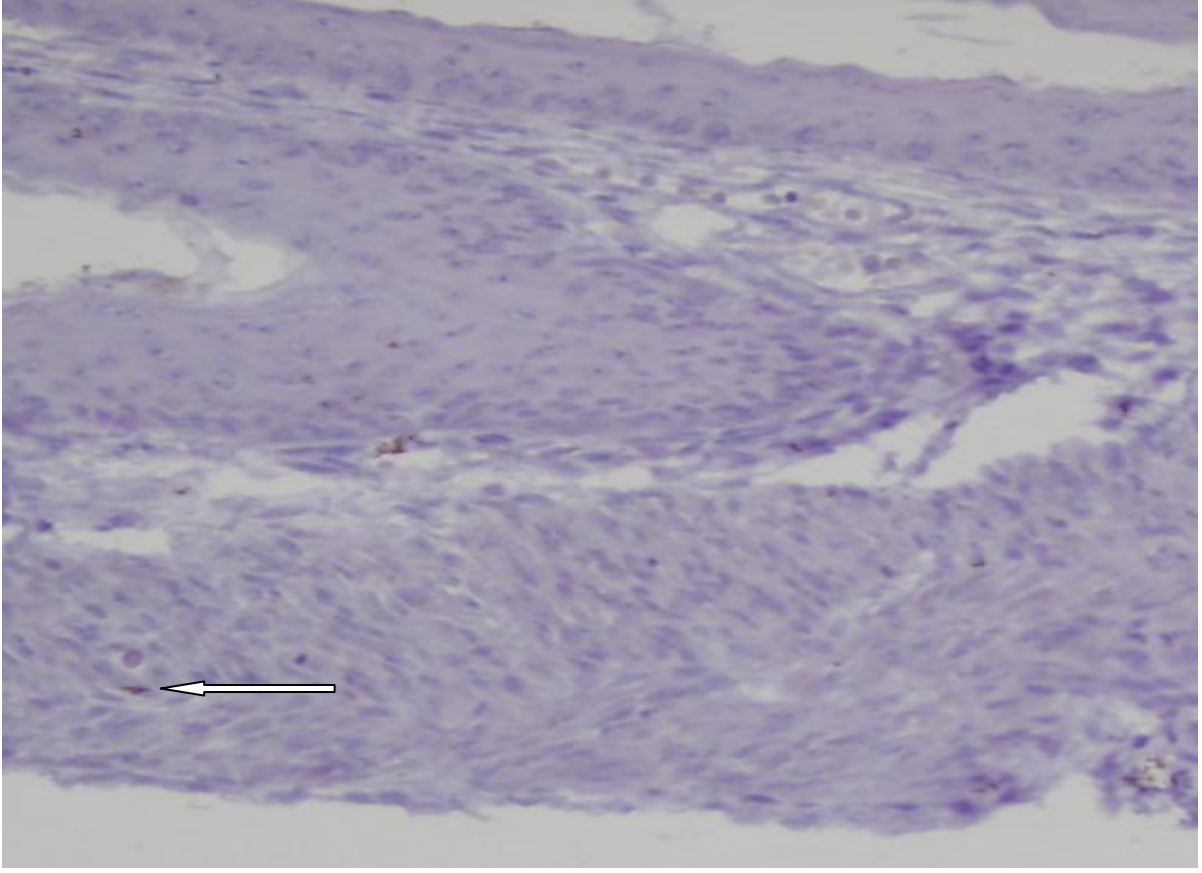


**Şekil 2:** Özefagus atrezili rat fetüslerinden elde edilen özefagus dokularında intermusküler alanda İCH (hematoksilen-eozin, orjinal büyütme x10).

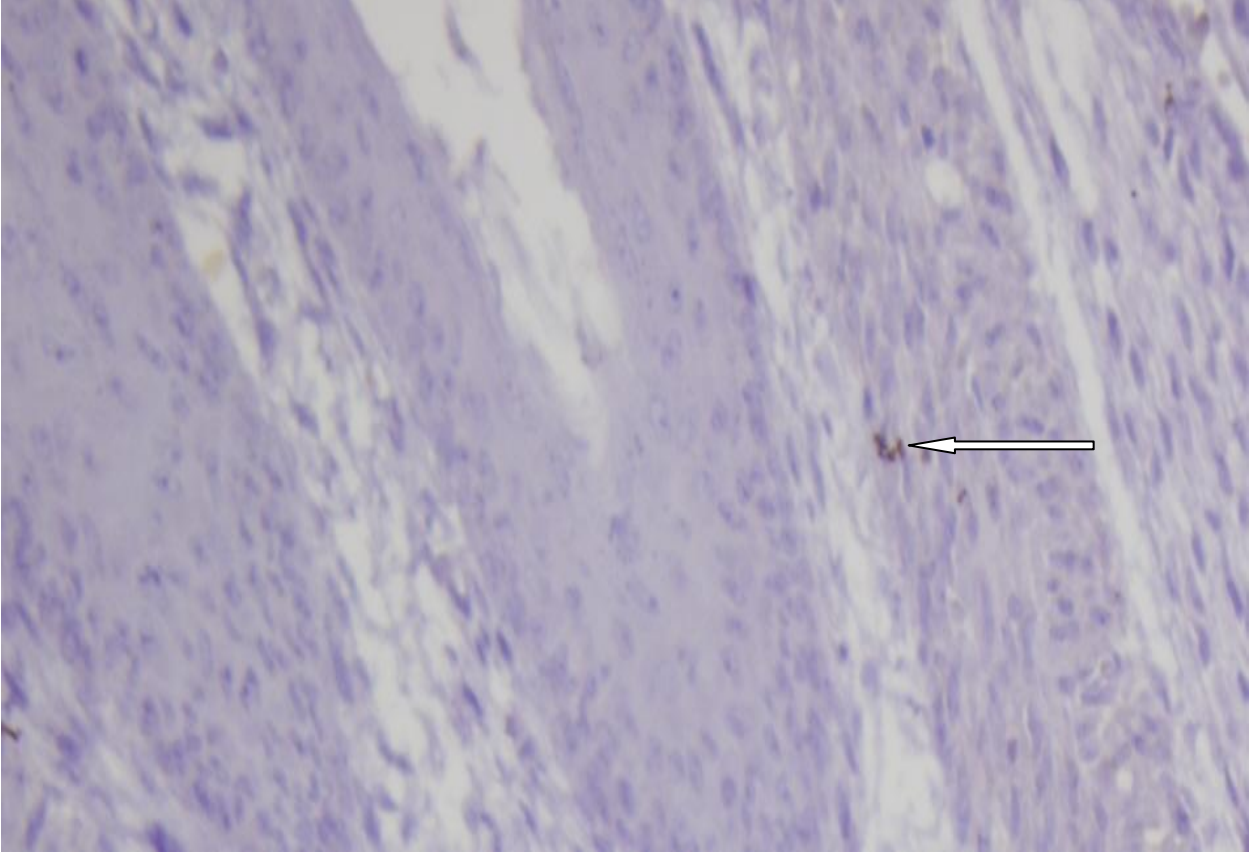


**Şekil 3:** Özefagus atrezili rat fetüs özefagus dokusunun C-kit boyasında, İCH'ler kas tabakası arasında görülmüyor. (C-kit, orjinal büyütme x20).





**Şekil 4:** Kontrol grubundaki rat fetüs özefagusunda intermusküler alanda yerleşimli C-kit (+) İCH (ok) (C-kit, orjinal büyütme, x40).



**Şekil 5:** Adriyaminin grubunda özefagus atrezisi eşlik etmeyen rat fetüs özefagusunda C-kit (+) boyanan İCH (ok) (C-kit, orjinal büyütme x40).

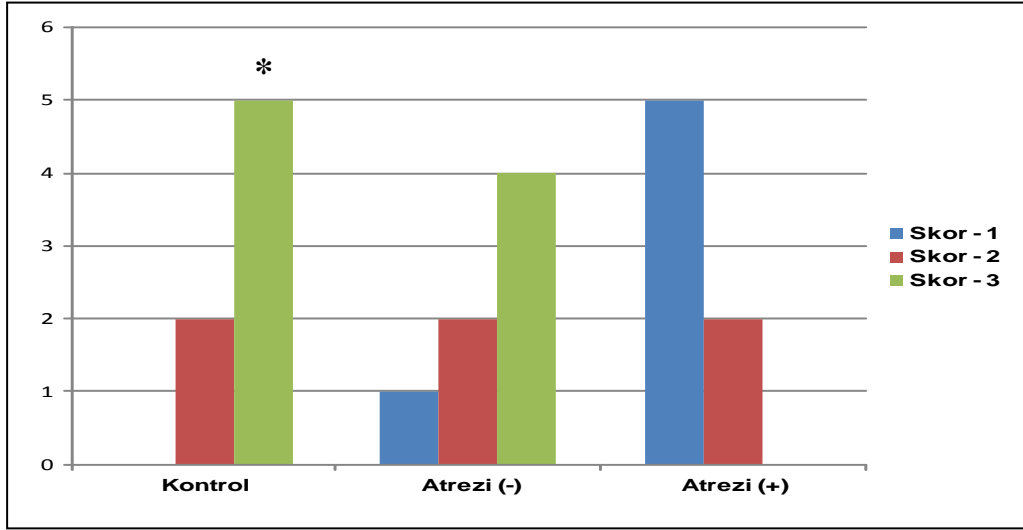
Gruplardaki fetüslerin İCH skor dağılımları ile yapılan değerlendirmede, özefagus atrezisi eşlik eden grup ile kontrol ve özefagus atrezisi eşlik etmeyen gruplar karşılaştırıldığında, özefagus atrezisi eşlik eden grupta İCH dağılımının istatistiksel anlamlı olarak azaldığı görüldü. Özefagus atrezisi eşlik etmeyen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü (**Tablo ve grafik 1**). Grupların skor ortalamaları değerlendirildiğinde özefagus atrezisi eşlik eden grupta 1.25, özefagus atrezisi eşlik etmeyen grupta 2.42, kontrol grubunda ise 2.74 olarak tespit edildi (**grafik 2**).

**Tablo: Gruplardaki fetüslerin interstisyel Cajal hücresi skor dağılımı**

Gruplar	Skor 1	Skor 2	Skor 3
<b>Kontrol (n)</b>		2	5*
<b>Atrezi (-) (n)</b>	1	2	4†
<b>Atrezi (+) (n)</b>	5	2	

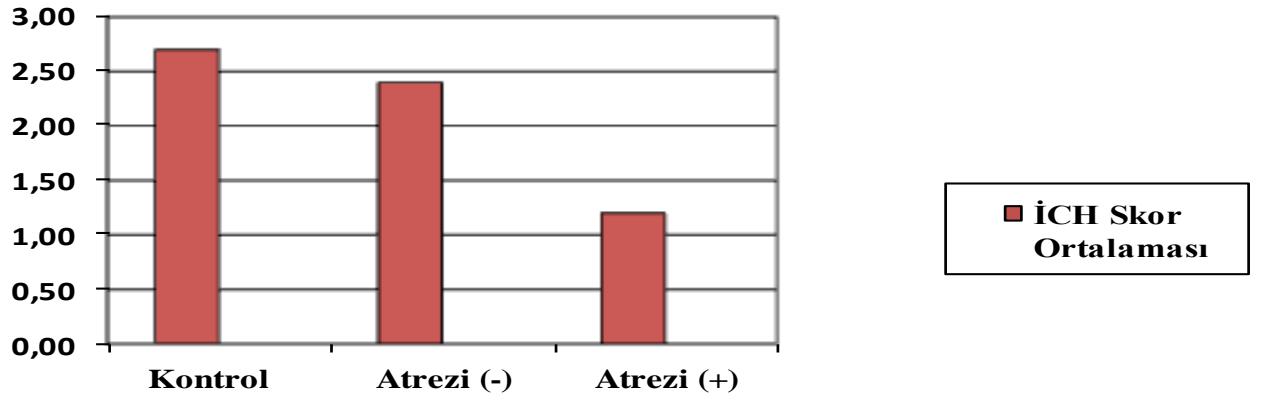
\*  $p < 0.05$  Kontrol ve atrezi (+) grupları karşılaştırıldığında

†  $p > 0.05$  Kontrol ve atrezi (-) grupları karşılaştırıldığında



**Grafik 1: Gruplardaki fetüslerin interstisyel Cajal hücresi skor dağılımı**

**\*  $p < 0.05$  Kontrol ve atrezi (+) grupları karşılaştırıldığında**



**Grafik 2: Grupların İCH skor ortalamaları**

## TARTIŞMA

Özefagus atrezisi ve trakeoözefageal fistül (ÖA – TEF) gittikçe artan sıklıkta karşılaşılan ve yenidoğan döneminde ameliyat gerektiren doğumsal anomalilerdir. Tek aşamalı özefago–özefagostomi yapılması günümüzde tercih edilen tedavi şeklidir. Anastomoz darlığı ve özefagusa ait motilite bozukluğu bu hastalarda sık karşılaşılan sorunlar arasındadır (1 – 3). ÖA onarımı yapılan hastalarda yutma güçlüğü, kusma ve gastroözefageal reflü hastalığı sıklıkla görülmektedir ve bu nedenler ile hastalarda beslenme sorunları gelişmektedir (32, 33). ÖA onarımı yapılan hastalarda hem beslenme sorunları nedeni ile büyüme gelişme geriliği oluşabilir hem de gastroözefageal reflü hastalığına bağlı olarak tekrarlayan akciğer enfeksiyonları ortaya çıkabilmektedir.

ÖA’da görülen özefagus motilite bozukluğunu, ameliyat sırasında oluşan nöronal hasar, nervus vagusa ait dallanma kusurları ve Auerbach pleksus hipoplazisi ile ilişkilendiren yayınlar bulunmaktadır (7, 8, 34). Alt özefagusa yönelik cerrahi diseksiyonun sınırlı yapıldığı izole TEF olgularında özefagusa ait motilite kusurlarının görülüyor olması, bu durumun özefagusa ait intrinsik ve ekstrinsik inervasyon sorunlarından kaynaklandığını düşündürmektedir (9). Ayrıca izole TEF olgularında, ameliyat öncesi dönemde özefagusta düzensiz peristaltizm ve GÖR tespit edilmiş olması, cerrahi işlemde bağımsız olarak motilite bozukluğuna neden olan inervasyon kusurlarının konjenital malformasyonlar nedeni ile olabileceği fikrini güçlendirmektedir (35).

İnsanların peristaltik organlarında bulunan önemli “intrinsic pacemaker“ görevi olan interstisyel Cajal hücreleri ilk olarak gastrointestinal sistemde tanımlanmıştır (10). Bu hücrelerin yüzeyinde, tirozin kinaz aktivitesi olan C-kit reseptörleri spesifik olarak üretilmektedir. Bu reseptörler İCH’nin C-kit antikoru ile boyanmasını sağlar. Bu hücrelerin aplazisi, hipoplazisi veya displazisi, peristaltik disfonksiyon ile yakından ilişkilidir (10). Bu hücrelerin ürettiği elektriksel yavaş dalgalar düz kas kasılma aktivitesini tayin ederler. Dalgaların yokluğunda peristaltik aktivitede yavaşlama veya inhibisyon görülür (36). Gastrointestinal sistemde hipertrofik pilor stenozu, Hirschsprung hastalığı, intestinal psödoobstruksiyon gibi peristaltizm sorunları ile birlikte seyreden değişik gastrointestinal sistem hastalıklarında İCH’nin azaldığı gösterilmiştir (25, 36, 37).

İntestinal motilite fizyolojisine yönelik çalışmalar, nitrik oksit (NO) bağımlı inhibitör sinyallerin iletiminde İCH'nin rol aldığını göstermektedir. NO sinyal yolu gastrointestinal sistemde nöromusküler iletide, non–adrenerjik non–kolinerjik inhibitör bir yoldur (38). NO gastrointestinal sistemde düz kasların gevşemesinde rol alan primer nörotransmitterdir (39). Nitrejik sinyallerin gastrointestinal sistemde düz kaslara iletim mekanizması henüz tam olarak açık değildir. Nöronlardan kaynaklanan NO, İCH'de cGMP ve Ca<sup>++</sup> artışına neden olarak düz kaslarda gevşeme sağlar. Bu fonksiyon özefagus için peristaltik hareket oluşumuna neden olur (33, 39).

Hücre yüzeyinde yer alan C-kit reseptörünün tirozin kinaz aktivitesinin yanı sıra nitrit oksit sentetaz enzim aktivitesini düzenleyici etkisi mevcuttur (39). İCH yüzeyinde yer alan C-kit reseptörü (CD117), İCH'nin motilite üzerine olan etkilerinde önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda bu reseptör sayesinde rat fetüs özefagusunda İCH sayı ve dağılımına ilişkin spesifik değerlendirme yapılmıştır.

İCH'nin kökeni halen araştırılmaktadır. Ramon Cajal bu hücrelerin metilen mavisi ve gümüş kromat ile boyanan bir çeşit primitif nöron tipi olduğunu savunmuştur (40). Ancak Christensen ve ark. ışık ve elektron mikroskobu kullanarak İCH'nin nöronlardan, makrofajlardan, Schwann hücrelerinden ayırmıştır (41). Fausone-Pellegrini ve ark. İCH'nin morfolojik özelliklerini, bazal lamina, az miktarda düz olmayan endoplazmik retikulum, çok sayıda düz endoplazmik retikulum ve düz kas hücrelerinde bulunan myoflamanları içermesi olarak tarif etmiştir (42). İCH ile düz kas hücreleri arasında hücreler arası bağlantılar olması ve sinir uçları ile yakın bağlantıları olmasından dolayı, bu hücrelerin sinir ve bağ dokusundan köken alamayacakları, düz kaslardan geliştikleri savunulmuştur (10). Aynı çalışmada İCH'nin nöral krestten gelişmediğini, özelleşmiş sinir ya da glial hücre olmadıkları da gösterilmiştir (10). C-kit salgılayan mezenşimal prekürsörlerden kit stimülasyonuna maruz kalan hücrelerin İCH, kalmayanların düz kas hücresi olarak geliştiği savunulmaktadır (10). Özefagus düz kas yapısının bozulduğu konjenital bir anomali olan özefagus atrezisinde, aynı öncüllerden gelişen İCH'nin sayı ve dağılımının etkilenebileceği düşünülebilir.

1978'de adriyaminin teratojen özelliği tanımlandıktan sonra, 1996'da gebe ratlara hamileliklerinin belirli bir döneminde verildiğinde, fetüslerde ÖA – TÖF geliştiği bulunmuştur (12, 13, 21, 43, 44). Özefagus atrezisi hayvan modeli tanımlandıktan sonra özefagus atrezisi fizyopatolojisinin anlaşılmasına yönelik olarak birçok çalışmada bu model

kullanılmıştır. Model ÖA’de görülen invazyon kusurlarını açıklamada kullanılmış olup, ÖA’li rat fetüslerinden alınan özefagus biyopsi materyallerinde ganglion ve sinir pleksusları azalmış olarak tespit edilmiştir (7). Bu nedenle çalışmamızda İCH’leri incelemek için önceden tanımlı olan bu modeli kullanmayı tercih ettik.

ÖA’da görülen motilite bozukluğunda özefagus duvarındaki düz kas yapısının yetersiz gevşeme yanıtına bağlı olduğu gösterilmiştir (8, 45, 46). Romeo ve ark yeni doğan döneminde ÖA nedeni ile ameliyat edilen hastalara yaptıkları videomanometrik değerlendirme sonucunda, alt özefagus sfikterindeki gevşeme yanıtının yetersiz olduğunu tespit etmişlerdir (8). Başka bir çalışmada Turgay ve ark deneysel adriyamin – ÖA rat modelinde, ÖA’da alt özefagusta gevşeme yanıtının azaldığını göstermişlerdir (46). Ancak literatürde, ÖA’da özefagusta olan yetersiz gevşeme yanıtı ile İCH arasında ilişki olup olmadığına dair bir çalışma saptanmamıştır.

Çalışmamızın planlandığı dönemde literatürde yer almayan ancak sonuçları ile hipotezimizi destekleyen, yeni doğan özefagus atrezili bebekler üzerinde postmortem yapılan bir çalışmada; hem proksimal hemde distal özefagustan alınan biyopsi örneklerinde yapılan immünohistokimyasal boyamada, İCH’lerin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (31).

Çalışmamızda, gruplardan elde edilen özefagus dokuları C-kit (CD117) ile immünohistokimyasal boyama yapılarak karşılaştırıldığında, özefagus atrezisi elde edilen rat fetüs özefaguslarında kontrol ve özefagus atrezisi eşlik eden gruplardaki rat fetüs özefaguslarına göre İCH sayı ve yoğunluğu anlamlı olarak azalmış bulundu, ancak kontrol grubu ve atrezi eşlik etmeyen grup arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi. Bu bulgular, özefagus motilitesi üzerinde düzenleyici fonksiyonu olan İCH’nin sayı ve dağılımının, özefagus atrezisinde konjenital olarak anormal olduğu düşüncemizi desteklemektedir.

## SONUÇ

Özefagus atrezisinde görülen motilite bozuklukları konjenital ve iatrojenik olarak gelişen intrinsik ve ekstrinsik inervasyon kusurlarına bağlı olabilir. Bu nedenle, deneysel özefagus atrezisi adriyaminin rat modelinde, özefagus atrezisi eşlik eden grupta İCH yoğunluğunun azalmış olmasının özefagus düz kas dokusunda kontraktıl güçlere karşı gevşeme yanıtının azalmasına yol açarak özefagus peristaltizmini olumsuz etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, özefagus atrezisinde İCH yoğunluğunun azalması, tedavi sonrası yaygın olarak görülen ve farklı klinik bulgular ile ortaya çıkan özefagus motilite kusurunun bir sebebi olabilir. Ancak adriyaminin ÖA oluşumundaki teratojenik etkisinin İCH dağılımı üzerine etkisi olup olmadığı ve İCH yokluğunun özefagus peristaltizm bozuklukları ile ilişkisi hakkında daha ileri deneysel histolojik ve fizyolojik çalışmaların yapılması gereklidir.



## KAYNAKLAR

1. Lija HE, Wester T. Outcome in neonates with esophageal atresia treated over the last 20 years. *Pediatr Surg Int* 2008;24:531-36
2. Spitz L. Esophageal atresia. Lessons I have learned in a 40- year experience. *J Pediatr Surg* 2006;41:1635-40
3. Tomaselli V, Volpi ML, Dell'Agnola CA, et al. Long-term evaluation of esophageal function in patients treated at birth for esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 2003;19:40-43
4. Kirkpatrick JA, Cresson SL, Pilling GP, et al. The motor activity of the esophagus in association with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1961;86:884-87
5. Davies MR. Anatomy of the extrinsic motor nerve supply to mobilized segments of the oesophagus disrupted by dissection during repair of oesophageal atresia with distal fistula. *Br J Surg* 1996;83:1268-70
6. Cheng W, Bishop AE, Spitz L, et al. Abnormal enteric nerve morphology atretic esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 1999;15:8-10
7. Qi BQ, Uemura S, Farmer P, et al. Intrinsic innervation of the oesophagus in fetal rats with oesophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 1999;15:2-7
8. Romeo G, Zuccarello B, Proietto F, et al. Disorders of the esophageal motor activity in atresia of the esophagus. *J Pediatr Surg* 1987;22:120-24
9. Burgess JN, Carlson HC, Ellis FH Jr, et al. Esophageal function after successful repair of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. A manometric and cinefluorographic study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;56:667-73
10. Sanders KM, Ordög T, Koh SD, et al. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999;11:311-38
11. Shafik A, El-Sibai O, Shafik I, et al. Electroesophagogram in gastroesophageal reflux disease with a new theory on the pathogenesis of its electric changes. *BMC Surg* 2004;4:13
12. Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, et al. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg* 1996;31:498-502

13. Merei J, Hasthorpe S, Farmer P, et al. Visceral anomalies in prenatally adriamycin-exposed rat fetuses: a model for the VATER association. *Pediatr Surg Int* 1999;15:11-16
14. Harmon CM, Coran AG. Congenital anomalies of the esophagus. Grosfeld JL, O'Neill JA, Fonkalsrud EW, et al (eds). In *Pediatric Surgery* 6.edition, Philadelphia, Mosby Elsevier 2006:1051-81
15. Bax K. Esophageal atresia and tracheoesophageal malformations. Holcomb III GW, Murphy JP, Ostlie DJ (eds). In *Ashcraft's Pediatric Surgery* 5. Edition, Philadelphia, Saunders Elsevier 2005:345-61
16. Merei J, Hasthorpe S, Farmer P, et al. Relationship between esophageal atresia with tracheoesophageal fistula and vertebral anomalies in mammalian embryos. *J Pediatr Surg* 1998;33:58-63
17. Liebermann D, Skandalakis JE. Esophagus. Skandalakis JE, Weidman TA, Foster RS, et al (eds). In *Skandalakis Surgical Anatomy*, Georgia, Paschalidis Medical publication 2008:647-89
18. Satoh S, Takashima T, Takeuchi H, et al. Antenatal sono-graphic detection of the proximal esophageal segment: Specific evidence for congenital esophageal atresia. *J Clin Ultrasound* 1995;23:419-23
19. Olson HM, Young DM, Prieur DL, et al. Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin treated rabbits. *Am J Pathol* 1974;77:439-54
20. Tewey KM, Chen GL, Nelson EM, et al. Intercalative antitumor drugs interfere with breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase 2. *J Biol Chem* 1984;259:9182-87
21. Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, et al. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology* 1978;17:151-57
22. Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part 1: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* 2007;50:176-89
23. Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, et al. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology* 2004;64:809-13
24. Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, et al. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology* 1999;117:140-48

25. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Altered expression of interstitial cells of Cajal in congenital ureteropelvic junction obstruction. *J Urol* 2003;170:2420-22
26. Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, et al. Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence. *Cell Tissue Res* 2001;305:331-40
27. Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med* 1998;4:848-51
28. Ward SM, Morris G, Reese L, et al. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 1998;115:314-29
29. Harberson J, Thomas RM, Harbison SP, et al. Gastric neuromuscular pathology in gastroparesis: analysis of full-thickness antral biopsies. *Digestive Diseases and Sciences* 2010;55:359-70
30. Publicover NG, Hammond EM, Sanders KM, et al. Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proc Natl Acad* 1993;90:2087-91
31. Midrio P, Alaggio R, Strojna A, et al. Reduction of interstitial cells of Cajal in esophageal atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:610-17
32. Louhimo I, Lindahl H. Esophageal atresia: primary result of 500 consecutively treated patients. *J Pediatr Surg* 1983;18:217-29
33. Nissen R. Gastropexy and fundoplication in surgical treatment of hiatal hernia. *The American J Digestive Diases* 1961;6:954-61
34. 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* 1986;21:831-37
35. Gundry SR, Orringer MB. Esophageal motor dysfunction in an adult with a congenital tracheoesophageal fistula. *Arch Surg* 1985;120:1082-83
36. McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cell in the guinea pig bladder. *J Urol* 2002;168:832-36
37. Metzger R, Schuster T, Till H, et al. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 2004;172:769-72
38. Cheng W, Bishop AE, Spitz L, et al. Abnormalities of neuropeptides and neural markers in the esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 1997;32:1420-23

39. Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, et al. Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett* 2002;326:191-95
40. Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, et al. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* 1996;180:97-107
41. Christensen J. A commentary on the morphological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J Auton Nerv Syst* 1992;37:75-78
42. Faussone-Pellegrini MS, Thuneberg L. Guide to the identification of interstitial cells of Cajal, *Microsc Res Tech* 1999;47:248-66
43. Possögel AK, Diez-Pardo JA, Morales C, et al. Embryology of esophageal atresia in the adriamycin rat model. *J Pediatr Surg* 1998;33:606-12
44. Meri J, Kotsios C, Hutson JM, et al. Histopathologic study of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula in an animal model. *J Pediatr Surg* 1997;32:12-14
45. Montgomery M, Witt H, Kuylentierna R, et al. Swallowing disorders after esophageal atresia evaluated with videomanometry. *J Pediatr Surg* 1998;33:1219-23
46. Turgay M, Yildiz F, Utkan T. Impaired esophageal reactivity in adriamycin-induced rat esophageal atresia: an in vitro study. *J Pediatr Surg* 2001;36:1569-73