

Deneyisel özofagus atrezisi modelinde özofagus ile trakea arası destek dokudaki farklılıklar*

Engin Günel¹, Hasan Madenci¹, Mustafa Cihat Avunduk²

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi ¹Çocuk Cerrahisi ve ²Patoloji Anabilim Dalları, Konya

Amaç: Deneyisel özofagus atrezisi modelinde, cerrahi tedavi sonrası özofagus fonksiyonlarında yetersizliğe neden olabilecek, özofagus ile trakea arası destek dokudaki yapısal farklılıkları ortaya koymak. **Yöntem:** Çalışmamızda, 18 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan ve bunlardan kontrollü olarak elde edilen 30 adet fetüs kullanıldı. Grup 1'i; annelerine gebeliklerinde hiç bir müdahale yapılmayan ve özofagus atrezisi gelişmeyen fetüsler. Grup 2'yi; annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, intraperitoneal 2 ml serum fizyolojik verilen ve özofagus atrezisi gelişmeyen fetüsler. Grup 3'ü; annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, intraperitoneal 2 mg/kg adriamisin verilen ve özofagus atrezisi oluşmayan fetüsler. Grup 4D'ü; annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, intraperitoneal 2 mg/kg adriamisin verilerek ÖA'si oluşan ve distal TÖF seviyesindeki kesitlerinin değerlendirildiği fetüsler ve Grup 4P'yi; ÖA'si oluşan ve proksimal özofagus poşu seviyesindeki kesitlerinin değerlendirildiği fetüsler oluşturdu. Histopatolojik çalışma için toraksı içine alan bloklardan 5 µ kalınlığında kesitler alınıp, bağ dokusu boyalarından, Masson's Trichorome ve Van Gieson's ile boyandı. Trakeanın bifürkasyonu seviyesinde, özofagus ile trakeayı içine alan kesitlerde, iki yapı arasındaki alanda fibroblastlar ve kollajen lifleri sayıldı. **Bulgular:** Grup 4D'den alınan kesitlerdeki sayımlarla Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4P'den alınan kesitlerdeki sayımlar karşılaştırıldığında, Grup 4D'de fibroblast sayılarında azalma ve kollajen lif sayılarında artma saptandı. **Sonuç:** Trakea-özofageal fistül seviyesinde fibroblast sayılarının az, kollajen liflerinin sayıca artmış olması, embriyonel gelişim sürecinde burada bir enflamatuar olayın geliştiğini düşündürmektedir. Bu enflamatuar kollajen birikiminin doğum sonrasında da devam etmesi, özofagusun fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyeceği kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Özofagus atrezisi, adriamisin, fibroblast, kollajen, dismotilite

The differences of connective tissue between trachea and esophagus in the experimental model of esophageal atresia

Objective: To search the differences of connective tissue between trachea and esophagus in the experimental model of esophagus atresia that makes esophageal dysfunctions after surgery. **Methods:** We have studied in 30 fetuses that are extracted by cesarean section from 18 pregnant Sprague-Dawley rats that are specified by vaginal plug method. The fetuses were divided into 4 groups: Group 1 control that no intervention done to their mothers during pregnancy. Group 2 sham in which only 2 ml saline was injected intraperitoneally to their mothers. Group 3 that a dose of 2 mg/kg adriamycin in 2 ml saline have injected intraperitoneally to their mothers from 6th to 9th day of pregnancy in which no esophageal atresia happened. Group 4D that 2 mg/kg adriamycin was given intraperitoneally to their mothers from 6th to 9th day of pregnancy in which esophageal atresia happened. Group 4P in which fetus had esophageal atresia and section taken only in the level of proximal esophageal atresia. All fetuses were barred in paraffin blocks for histopathologic examination and 5µ serial sections were taken from the fetal thorax. Histopathological sections were stained by Masson's Trichrome and Van Gieson's Stains. The fibroblast number and collagen fiber numbers that are between trachea and esophagus in the level of tracheal bifurcation were determined. **Results:** When we compared sections taken from Group 4D with Group 1, Group 2, Group 3 and Group 4P, it was found that fibroblast numbers were decreased and collagen fibers numbers were increased. **Conclusion:** The decrease in number of fibroblast and increase in number of collagen fibers in the level of trachea-esophageal fistula makes us to think of an inflammatory process developing during the embrional evolution, and this inflammatory collagen accumulation continues even after birth thus affect negatively the esophageal functions.

Key words: Esophageal atresia, adriamycin, fibroblast, collagen, dismotility

Genel Tıp Derg 2004;14(2):39-44

*Çalışma XXI. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (8-10 Ekim 2003, Şanlıurfa).

Yazışma adresi: Doç.Dr.Engin Günel, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı 42080, Konya.

e-posta: egunel@hotmail.com

Özofagus atrezisi (ÖA), özofagusun lümen devamlılığının olmaması ile karakterize konjenital bir anomalidir. ÖA'nin cerrahi tedavisinde kullanılan lümen devamlılığını sağlamaya yönelik tekniklerin başarısı giderek artmakla birlikte, operasyon sonrasında görülen komplikasyonlar hala önemini korumakta, hatta yaşayan hastalar arttıkça daha da çeşitlenmektedir (1-3).

Ameliyat sonrasında görülen anastomoz kaçağı, anastomoz ayrılması, tekrar eden trakea-özofageal fistül (TÖF) erken, gastro-özofageal reflü (GÖR), anastomoz darlığı ve özofagus dismotilitesi ise geç komplikasyonlardandır (1,2). ÖA onarımı sonrasında özofagus fonksiyonlarındaki yetersizlik ya özofagusun yapısındaki kas, sinir, bağ dokusu gibi yapıların doğumsal bozukluklarından ya da ameliyat sırasında özofagus çevresindeki sinir, damar ve bağ dokusu gibi yapıların hasarlanmasından kaynaklanmaktadır (4). Özofagus dismotilitesinin fizyopatolojisini ortaya koymak amacı ile çok sayıda çalışma yapılmıştır (4-6).

Çalışmamızda, sıçanlarda ÖA oluşturarak, özofagus fonksiyonlarında yetersizliğe neden olabilecek, özofagus ve trakea arası destek dokudaki yapısal farklılıkları belirlemeyi ve oluşturulan özofagus atrezili segment ve TÖF'ün mezenkimal dokuları ile normal özofagus ve trakea mezenkimal dokularını birbirleriyle, fibroblast ve kollajen lif sayısı yönünden karşılaştırmayı amaçladık.

Yöntem

Bu çalışma, Deney Hayvanları Etik Kurulunun 17.10.2002 tarih ve 05 sayılı onayı alındıktan sonra Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi şartlarında yapıldı. Çalışmamızda, 200-250 gr ağırlığında, 18 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan ve bunlardan kontrollü olarak elde edilen 30 adet fetüs kullanıldı. Anne sıçanlar 4-5 aylık olup daha önce doğum yapmış olanlardan seçildi.

ÖA ve TÖF'lü fetüsleri elde etmek için, koitus günü vajinal tıkaç yöntemi ile belirlenen 11 dişi sıçana, hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, 2 ml serum fizyolojik içinde sulandırılan 2 mg/kg adriamisin (Adriblastina® Flakon 10 mg, C Erba, Deva) intraperitoneal olarak verildi (5). Hamileliklerinin 21. gününde tüm anne sıçanlara 50 mg/kg IM ketamin

hidroklorür (Ketalar® flakon) ile anestezi sağlandıktan sonra steril şartlar hazırlanıp, alt-median laparotomi kesisi ile seksiyö yapıldı ve fetüsler alındı. Adriamisin verilerek ÖA modelini oluşturması beklenen hamile sıçanlardan 13 adet fetüs, sham grubunu oluşturması beklenen 4 hamile sıçandan 11 adet fetüs ve kontrol grubunu oluşturması beklenen 3 hamile sıçandan ise 11 adet fetüs elde edildi.

Çalışma grupları:

Çalışma grupları kontrollü olarak elde edilen 30 adet sıçan fetüsünden oluşturuldu.

Grup 1: Bu gruptaki fetüslerin annelerine hiçbir müdahale yapılmadı. Elde edilen 10 fetüsden hiçbirinde ÖA ve TÖF yoktu. Bu fetüsler kontrol grubunu oluşturdu.

Grup 2: Bu gruptaki fetüslerin annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, intraperitoneal 2 ml serum fizyolojik verildi. Elde edilen 10 fetüsden hiçbirinde ÖA ve TÖF yoktu. Bu fetüsler sham grubunu oluşturdu.

Grup 3: Bu gruptaki fetüslerin annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, 2 ml serum fizyolojik içinde sulandırılan 2 mg/kg adriamisin intraperitoneal olarak verildi. Elde edilen 10 fetüsden 4'ünde ÖA ve TÖF oluşmadı.

Grup 4D: Bu gruptaki fetüslerin annelerine hamileliklerinin 6-9. günleri arası 4 gün, 2 ml serum fizyolojik içinde sulandırılan 2 mg/kg adriamisin intraperitoneal olarak verildi. Elde edilen 10 fetüsden 6'sında proksimal segmentte ÖA ve distal segmentte TÖF oluştu. Bu grupta sadece distal TÖF seviyesindeki kesitler değerlendirildi.

Grup 4P: Adriamisin verilerek oluşturulan ÖA ve TÖF'lü 6 fetüsün sadece proksimal özofagus poşu seviyesindeki kesitlerin değerlendirildiği grup.

Histopatolojik değerlendirme:

Histopatolojik inceleme, % 10 formaldehid solüsyonunda iki hafta bekletilen fetüslerde yapıldı (7). Fetüslerin hepsi mandibula altından ve ksifoid hizasından horizontal planda kesilerek üçe ayrıldı ve parafin bloklara gömüldü. Bloklanan parçalardan mikrotom ile 5 µ'luk kalınlıkta kesitler alındı. Birer kesit rutin hemotoksilen eozin ile boyanarak seviyeler ve anomaliler tespit edildi. Daha sonra

diğer kesitler, bağ dokusu boyalarından Masson's Trichorome ve Van Gieson's boyaları ile boyandı.

Grup 1, 2, 3 ve 4D'de trakeanın bifürkasyonu seviyesinde, özofagus ile trakeayı içine alan kesitlerde iki yapı arasındaki alanda fibroblastlar ve kollajen lifleri 40'lık büyütme ile 4 farklı alanda sayıldı (Tablo ve Şekil 1). Grup 4P'deki incelemeler, yine 40'lık büyütme ile 4 farklı alanda, proksimaldeki atrezik özofagus lümeninin tam olarak görüldüğü en distal kesitlerde yapıldı (Şekil 2).

İstatistiksel değerlendirme:

Gruplardan elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarıldı, SPSS (10.0 for Windows) programı ile istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Çalışma gruplarının karşılaştırılmasında parametrik test varsayımlarını yerine getiren gruplar için tek yönlü ANOVA (varyans analizi), parametrik test varsayımlarını yerine getirmeyen gruplar için ise Kruskal-Wallis testleri uygulandı. Tek yönlü ANOVA'nın anlamlı olduğu durumlarda ikincil test olarak Tukey-HSD testi, Kruskal-Wallis testinin anlamlı olduğu durumlarda ise ikincil test olarak Bonferroni düzetmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bulunan P değeri Tukey-HSD testi için $P<0.05$ ise, Bonferroni düzetmeli Mann-Whitney U testi için $P<0.01$ ise gruplar arasındaki fark anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

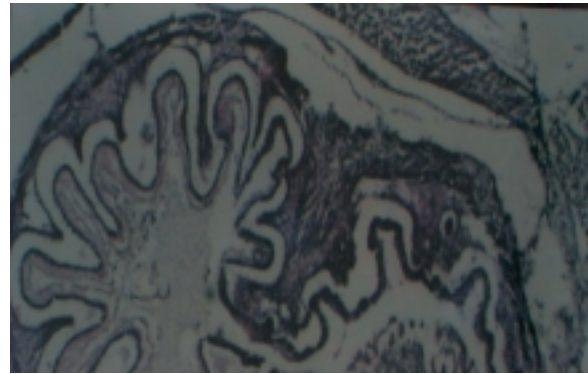
Hemotoksilen Eozin ile boyanan kesitlerde, hamilelikleri sırasında intraabdominal adriamisin verilen dişi sıçanlardan elde edilen 10 fetüsten 6'sında proksimalde ÖA ve distalde TÖF tespit edildi (Grup 4). Fetüslerden diğer 4'ünde ise ÖA ve TÖF saptanmadı (Grup 3). Grup 4'de ÖA ve TÖF gelişen fetüs özofaguslarının yapısı; proksimalde larenks seviyesinde atreziye uğramış kısa bir poş, distalde ise trakeal bifürkasyonun hemen üzerinden trakeaya fistülüz olmuş şekilde idi. Herhangi bir girişim yapılmayan (Grup 1) ve hamilelikleri sırasında intraabdominal serum fizyolojik verilen (Grup 2) dişi sıçanlardan elde edilen fetüslerin özofaguslarında malformasyona rastlanmadı.

Bütün gruplardan yapılan kesitlerin histopatolojik incelemesinde: Grup 1'i oluşturan fetüs kesitlerindeki fibroblast sayıları, Masson's Trichorome ve Van

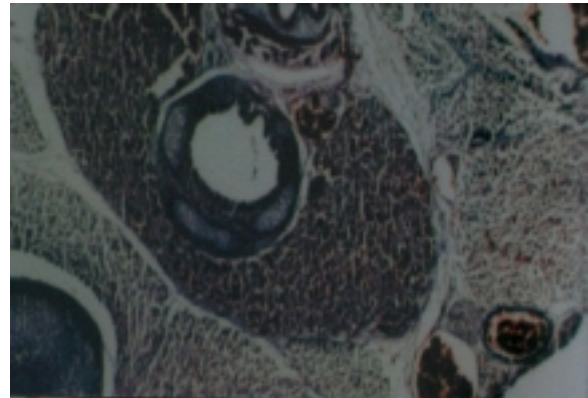
Tablo. Grupları oluşturan fetus kesitlerindeki fibroblast ve kollajen lif sayıları

	Fibroblast		Kollajen	
	Masson's	Van	Masson's	Van
	Trichorome	Gieson's	Trichorome	Gieson's
Grup 1	11.30±1.70	10.30±2.67	7.80±2.10	10.30±2.50
Grup 2	10.70±3.77	12.30±2.31	9.50±3.21	10.10±1.73
Grup 3	10.25±3.30	10.25±1.50	10.50±2.38	9.25±5.06
Grup 4D	4.17±2.14*	3.83±1.83*	19.50±6.35*	21.17±5.91*
Grup 4P	9.00±2.97	9.50±2.88	10.50±3.15	9.33±2.50

Değerler ortalama ± SS olarak gösterilmiştir. * $P<0.05$

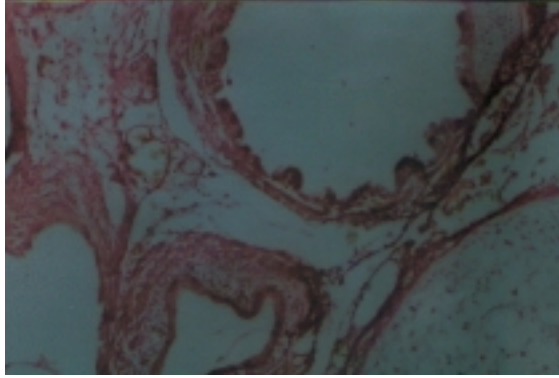


Şekil 1. Trakeanın bifürkasyonu seviyesinde yapılan kesitlerde TÖF'ün görünümü (HE; x10)

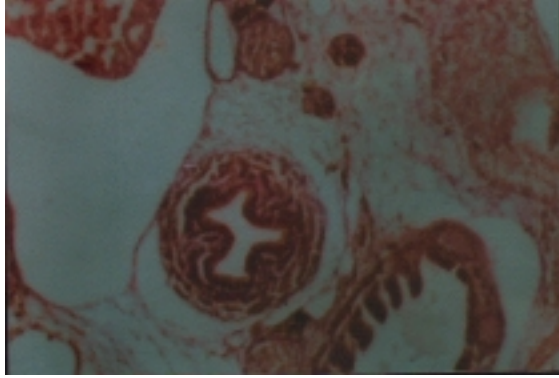


Şekil 2. Proksimaldeki atrezik özofagus seviyesinde yapılan kesitin görünümü (MT; x10)

Gieson's boyamalarına göre sırası ile 11.30±1.70, 10.30±2.67 ve kollajen lif sayıları sırası ile 7.80±2.10, 10.30±2.50 idi. Grup 2'de; fibroblast sayıları sırası ile 10.70±3.77, 12.30±2.31 ve kollajen



Şekil 3. Grup 2'deki fetüslerde trakeanın bifürkasyonu seviyesinde alınan kesit (VG; x20)



Şekil 4. Grup 4D'deki fetüslerde trakeanın bifürkasyonu seviyesinde alınan kesit (VG; x20)

lif sayıları 9.50 ± 3.21 , 10.10 ± 1.73 idi (Şekil 3). Grup 3'de; fibroblast sayıları sırası ile 10.25 ± 3.30 , 10.25 ± 1.50 ve kollajen lif sayıları 10.50 ± 2.38 , 9.25 ± 5.06 idi. Grup 4 D'de; fibroblast sayıları sırası ile 4.17 ± 2.14 , 3.83 ± 1.83 ve kollajen lif sayıları 19.50 ± 6.35 , 21.17 ± 5.91 idi (Şekil 4). Grup 4 P'de; fibroblast sayıları sırası ile 8.83 ± 2.71 , 9.50 ± 2.88 ve kollajen lif sayıları 10.50 ± 3.15 , 9.33 ± 2.50 idi. Gruplara ait bulguların tümü Tablo 1'de özetlenmiştir.

Bütün grupların her iki boyama tekniğindeki karşılaştırılmalarında, Grup 4D'nin fibroblast sayıları Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4P'den anlamlı olarak az olduğu ($p < 0.05$), kollajen lif sayıları ise yine aynı gruplardan anlamlı olarak yüksek olduğu ($p < 0.05$) saptandı.

Tartışma ve sonuç

Kusma, yutma zorluğu ve aspirasyona bağlı sık akciğer enfeksiyonu geçirme gibi yakınmalara neden olan özofagus motilite bozukluğu, başarılı ÖA onarımı yapılan hastalarda sıklıkla rastlanan en önemli komplikasyondur (4). ÖA'nde motilite bozukluğunun sebebi, ya sinir ve bağ dokusundaki doğumsal anomaliler gibi primer nedenlere, ya da ameliyat sırasında özofagusun ekstrinsik sinir sistemine verilen zarar sonucu gelişen sekonder nedenlere bağlıdır (4,8-10).

Dismotilitenin primer nedenlerine yönelik ilk çalışmada, ÖA olan bebeklerin özofagus ve midelerinden alınan biyopsilerde, Auerbach pleksuslarında çeşitli patolojilerin olduğu belirlendi (8). Diez-Pardo ve ark (5) 1996 yılında sıçanlarda adriamisin ile ÖA'ni oluşturdukları modeli yayınlamalarının ardından, ÖA oluşturulan deneklerde yaptıkları çalışmada özofagusun ekstrinsik sinir sistemi, kas yapısı ve nöronal yapıları üzerinde durdular (11-14). Sıçanlarda oluşturulan ÖA modelinde, fibroblast growth faktörün ve bazı alt tiplerinin özofagus ile trakea çevresi konnektif dokuda normal sıçanlardakine oranla daha az olduğu ortaya kondu (13,14).

İnsan deri kültüründe yapılan çalışmada, adriamisin fibroblastların proliferasyonunu etkileyerek, pirolil hidroksilaz inaktivasyonuna neden olduğu gösterildi (15). Benzer çalışmalarda (15,16), matriks proteinlerinin sentezlerinin bozulması ve matriks profilinin değişmesinin fibroblastların migrasyonlarının azalmasına yol açtığı ortaya konuldu. Özellikle nöral krest hücrelerindeki migrasyon defektinin eş zamanlı etkileşiminden dolayı diğer sistem anomalileriyle birlikte ortaya çıktığı, ÖA oluşumunda embriyolojik dönemde lokal mezenkimal faktörlerin önemli olduğu bildirildi (17).

Matriks proteinlerinin sentezinin etkilenmesine bağlı olarak fibroblast göçünün azalması intrauterin dönemde çok önemli olan hücre hareketlerini doğrudan etkilemektedir. İntrauterin dönemde bu matriks farklılığından dolayı özofagusun mezenkimal dokusunu oluşturan hücrelerin, yani fibroblastların göçlerinin yavaşlaması ile anormal gelişim gösteren özofagus mezenkiminde bu hücrelerin sayıca az olmaları beklenmektedir (18,19). Biz de çalışmamızda, ÖA oluşturulan deneklerle normal

özofagus gelişimine sahip olan deneklerde çevre dokudaki fibroblast sayılarını karşılaştırıldığımızda, ÖA'ne sahip deneklerde fibroblast sayılarında anlamlı azalma olduğunu bulduk. Bu azalmanın adriamisin'in direkt etkisine bağlı olabileceği düşünülebilir. Ancak; adriamisin verilip de ÖA oluşmayan grupla, ÖA oluşan grup arasında fibroblast sayıları açısından anlamlı fark vardı. Adriamisin verilen her fetüste ÖA'nin oluşmaması, ÖA ve TÖF oluşan deneklerde atrezik poş ve TÖF seviyelerinde fibroblast sayılarının farklı bulunması, embriyonel gelişim sürecinde lokal mezenkimal faktörlerin farklı yöndeki etkilerinden dolayı olduğu kanısındayız.

Bugüne kadar oluşturulan ÖA modellerinde, özofagusun destek dokusundaki matriks elemanlarından olan kollajenin dağılımı hakkında ayrıntılı bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak, adriamisin'in genel olarak fibroblasttaki pirotil hidrosilaz enziminin inaktivasyonuna neden olarak kollajenin yeniden modellenmesini azalttığı ve dokuda düzenlenmemiş kollajende artışa yol açtığı bilinmektedir (15,16). Biz de çalışmamızda ÖA oluşturulan deneklerde, özellikle TÖF seviyesindeki kollajen lif sayısında, ÖA oluşmayanlara göre anlamlı bir artış olduğunu tespit ettik. ÖA'de proksimal poşun kollajen lif sayısı TÖF seviyesinin bulguları ile karşılaştırıldığında, kollajenin TÖF seviyesinde yine anlamlı olarak arttığını belirledik. Bu da intrauterin mezenkimal etkileşimin TÖF alanına lokalize olduğunu düşündürmektedir.

ÖA olan hastalarda, TÖF seviyesinde değişen bu matriks yapısı ve cerrahi onarım sonrasında yeniden enflamatuar olayın başlaması, özofagusun mezenkimal dokusunda fibroblastların aktivasyonu ve kollajen sentezinin artması sonucu anastomoz bölgesinin doğal protein matriksinin tamamen değişmesine neden olacaktır. Ayrıca, cerrahi tedavide özofagusun disseke edilmesi ile intrinsek ve ekstrinsek sinir sistemi devamlılığının hasara uğramasına bağlı olarak özofagusun peristaltik hareketlerinin kötü yönde etkilenmesi beklenir. Zaten mezenkimal dokusu farklı olan özofagusda yara iyileşmesinin daha da bozulması ile özofagus hareketlerinin olumsuz yönde etkileneceğini düşünüyoruz.

Sonuçta, ÖA anomalisinin, intrauterin dönemde özofagus mezenkimindeki bozulan matriks yapısını

takiben, embriyonel gelişimi yönlendiren hücrelerin göçlerinde ve fonksiyonlarında oluşan yetersizliğe bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. TÖF seviyesinde fibroblast sayılarının az ve kollajen liflerinin sayıca artmış olması, embriyonel gelişim sürecinde burada enflamatuar bir olayın geliştiğini düşündürmektedir. Bu hastalarda cerrahi tedavi sonrası enflamatuar kollajen birikiminin devam etmesi özofagusun fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyeceği kanatındayız. Bu konuda yapılacak daha ayrıntılı çalışmalar ile ÖA onarımı sonrası görülen özofagus disfonksiyonunun nedenlerini daha ayrıntılı olarak ortaya koyabiliriz.

Kaynaklar

1. Celayir S, İlçe Z, Topuzlu GT, Emir H, Yeker Y, Kaya G, et al. Özofagus atrezili olgularla ilgili 22 yıllık deneyim. Cerrahpaşa Tıp Derg 2002;33:86-92.
2. Little DC, Rescorla FJ, Grosfeld JL, West KW, Scherer LR, Engum SA. Long-term analysis of children with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. J Pediatr Surg 2003;6:852-6.
3. Okada A, Usui N, Inoue M, Kawahara H, Kubota A, Imura K, et al. Esophageal atresia in Osaka: A review of 39 years' experience. J Pediatr Surg 1997;11:1570-4.
4. Romeo G, Zuccarello B, Proietto F, Romeo C. Disorders of the esophageal motor activity in atresia of the esophagus. J Pediatr Surg 1987;2:120-4.
5. Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, Tovar JA. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: Preliminary report. J Pediatr Surg 1996;4:498-502.
6. Ioannides AS, Chaudhry B, Henderson DJ, Spitz L, Copp AJ. Dorsoventral patterning in oesophageal atresia with tracheo-oesophageal fistula: Evidence from a new mouse model. J Pediatr Surg 2002;2:185-91.
7. Qi BQ, Beasley SW. Pathohistological study of adriamycin-induced tracheal agenesis in the fetal rat. Pediatr Surg Int 1999;1:17-20.
8. 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;10:831-7.
9. Possogel AK, Diez-Pardo JA, Morales C, Navarro C, Tovar JA. Embryology of esophageal atresia in the adriamycin rat model. J Pediatr Surg 1998;4:606-12.
10. Crisera CA, Connelly PR, Marmureanu AR, Colen KL, Rose MI, Li M, et al. Esophageal atresia with tracheoesophageal fistula: Suggested mechanism in faulty organogenesis. J Pediatr Surg 1999;1:204-8.
11. Qi BQ, Uemura S, Farmer P, Myers NA, Hutson JM. Intrinsic innervation of the oesophagus in fetal rats with oesophageal atresia. Pediatr Surg Int 1999;1:2-7.

12. Cheng W, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. Abnormal enteric nerve morphology in atretic esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. *Pediatr Surg Int* 1999;1:8-10.
13. Crisera CA, Maldonado TS, Longaker MT, Gittes GK. Defective fibroblast growth factor signaling allows for nonbranching growth of the respiratory-derived fistula tract in esophageal atresia with tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg* 2000;10:1421-5.
14. Spilde TL, Bhatia AM, Marosky JK, Preuett B, Kobayashi H, Hembree MJ, et al. Fibroblast growth factor signaling in the developing tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg* 2003;3:474-7.
15. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol* 1992;11:664-6.
16. Muszynska A, Palka J, Wolczynski S. Doxorubicin-induced inhibition of prolidase activity in human skin fibroblasts and its implication to impaired collagen biosynthesis. *Pol J Pharmacol* 1998;2:151-7.
17. Otten C, Migliazza L, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Neural crest-derived defects in experimental esophageal atresia. *Pediatr Res* 2000;2:178-83.
18. Crisera CA, Grau JB, Maldonado TS, Kadison AS, Longaker MT, Gittes GK. Defective epithelial-mesenchymal interactions dictate the organogenesis of tracheoesophageal fistula. *Pediatr Surg Int* 2000;4:256-61.
19. Zhou B, Hutson JM, Farmer PJ, Hasthorpe S, Myers NA, Liu M. Apoptosis in tracheoesophageal embryogenesis in rat embryos with or without adriamycin treatment. *J Pediatr Surg* 1999;5:872-5.