



<sup>1</sup> Yeşim Hülya UZ

<sup>1</sup> Gülnur KIZILAY

<sup>2</sup> Meryem AKPOLAT

<sup>1</sup> Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR

<sup>1</sup> Melike SAPMAZ METİN

<sup>1</sup> Trakya Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Histoloji ve  
Embriyoloji AD. Edirne

<sup>2</sup> Zonguldak Karaelmas  
Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD.  
Zonguldak

Submitted/Başvuru tarihi:

08.07.2010

Accepted/Kabul tarihi:

01.12.2010

Registration/Kayıt no:

10 07 130

**Corresponding Address**  
**/Yazışma Adresi:**

**Dr. Yeşim Hülya UZ**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji AD.

22030 Edirne

E-mail: yesimuz@yahoo.com

© 2012 Düzce Medical Journal  
e-ISSN 1307- 671X  
www.tipdergi.duzce.edu.tr  
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

## **Adriyamisin Sıçan/Fare Modeli Ve Embriyolojide Önemi**

### **The Adriamycin Rat/Mouse Model And Its Importance To The Embryology**

#### **ÖZET**

Adriyamisinin teratojenik etkisi ile oluşturulan sıçan ve fare modelleri; güvenilir, kolaylıkla uygulanabilen ve insanlarda VACTERL birlikteliğinde görülen anomalilere benzer oluşabilen bir dizi konjenital anomalinin embriyolojik ve moleküler biyolojik olarak araştırılmasına olanak veren modellerdir. Adriyamisin VACTERL birlikteliğinde görülen konjenital anomalileri oluşturma mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu modellerle yapılan araştırmalarda özellikle anormal notokord morfolojisi üzerinde durulmuş ve embriyo gelişiminde notokordun rolünün ve öneminin anlaşılmasına ışık tutmuştur. Ayrıca hatalı Sonic hedgehog (Shh) sinyal yolu da üzerinde durulan diğer mekanizmayı oluşturmaktadır. Bu derlemede, adriyamisin sıçan ve fare modelleri ile bu modellerin VACTERL birlikteliğinde görülen konjenital anomaliler üzerine etkisinin, güncel literatür bilgileri ışığında ele alınması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Adriyamisin, Sıçan, Fare, VACTERL, Notokord

#### **ABSTRACT**

Rat and mouse models induced by the teratogenic effect of adriamycin are reliable and easily reproducible methods of studying the embryology and molecular biology of a range of complex congenital anomalies similar to those seen in humans with VACTERL association. The mechanism by which adriamycin produces the congenital anomalies found in the VACTERL association is not yet clear. Studies with these models have focused on mainly abnormal notochord morphology, shedding more light on the important role of this structure in the developing embryo. Moreover, defective Shh signaling pathway is another emphasized mechanism. This review aims to discuss adriamycin rat and mouse models and their impact on congenital anomalies similar to those seen in humans with VACTERL association, in the light of current literature data.

**Key Words:** Adriamycin, Rat, Mouse, VACTERL, Notochord

#### **GİRİŞ**

Hayvan modelleri, hastalıkların moleküler ve biyokimyasal temellerinin anlaşılmasına ve bu hastalıkların hem medikal hem de cerrahi tedavilerinde yeni ilaç denemelerine imkan vererek bize oldukça yarar sağlar. Fareler ve sıçanlar; biyolojik, fizyolojik ve genetik olarak insanlara çok benzerlik gösterdiğinden bu modellerin oluşturulmasında özellikle tercih edilmektedirler. Doğal olarak meydana gelen, teratojenler ile oluşturulan, cerrahi olarak yapılan ve transgenik olmak üzere bugün başlıca dört tip hayvan modeli kullanılmaktadır (1).

Adriyamisin teratojenik etkisi ile oluşturulan sıçan ve fare modelleri; güvenilir, kolaylıkla uygulanabilen ve insanlarda VACTERL birlikteliğinde görülen anomalilere benzer oluşabilen bir dizi konjenital anomalinin embriyolojik ve moleküler biyolojik olarak araştırılmalarına olanak veren modellerdir (2). Adriyamisin, Streptomyces peucitius'tan elde edilen antrasiklin bir antibiyotik olup; sarkom, lenfoma, lösemi, nöroblastom ve meme kanseri gibi durumlarda tedavide kullanılan antineoplastik bir ajandır (3). Teratojenik etkisi ilk defa 1978'de Thompson ve ark. (4) tarafından

bildirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışma ile sıçanlarda, adriyamisin ve daunomisininin; özofagus atrezisi, trakeoözofagial fistül, hipoplazik mesane ve çeşitli kardiyak anomalilere yol açtığını göstermişlerdir. Adriyamisin'in daunomisinden daha etkili olduğu gözlemlenen bu çalışmada, gebeliğin 6-9. günlerinde intraperitoneal (ip) olarak 1,25-2 mg/kg/gün adriyamisin uygulamasının anomali ortaya çıkışında etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada, tavşanlarda 6-18. gestasyon günlerinde 0,6 mg/kg/gün verilen adriyamisin abortus hızında artışa neden olurken, anomali meydana getirmemiştir (4). Ayrıca, adriyamisin tavuk embriyolarında çalışılarak, eksensefali ve anoftalmi oluşturduğu gösterilmiş, fakat sıçan ya da farelerde görülen anomali spektrumu elde edilememiştir, bu yüzden günümüzde kullanımı kısıtlanmıştır (5).

#### **Adriyamisin Sıçan Modeli (ASM)**

Adriyamisin sıçan modeli (ASM), ilk defa Diez-Pardo ve ark. (6) tarafından 1996 yılında oluşturularak çocuk cerrahisine tanıtılmıştır. Bu çalışmada 6-9. günlerde 1,5-2 mg/kg ip adriyamisin dozu kullanılarak trakeoözofagial fistül ve/veya özofagus atrezisi, anorektal malformasyonlar, renal ve ekstremite anomalileri gibi VACTERL birlikteliğinde görülen anomaliler gözlenmiş olup, bu anomalilerin ortaya çıkışında en etkin doz, 1,75 mg/kg olarak saptanmıştır. (6). VACTERL birlikteliği; vertebral anomaliler (V), anal atrezisi (A), kardiyak malformasyonlar (C), trakeoözofagial fistül (TE) ve/veya özofagus atrezisi, renal (R) ve ekstremite (L) anomalilerini içeren rastlantısal olmayan defektler topluluğu şeklinde tanımlanır. Diez-Pardo'ya göre adriyamisin'in uygun zaman ve yeterli dozda kullanılması, özellikle trakeoözofagial fistül ve/veya özofagial atrezisi anomalisi için fevkalade kullanılabilir bir modeldir (6) ve bu tarihten sonra birçok araştırmacı tarafından başarılı bir şekilde çalışmalarda kullanılmıştır (7-9). VACTERL birlikteliği aslında önce, Quan ve Smith (10) tarafından 1973 yılında VATER birlikteliği olarak tarif edilmiş ancak daha sonra, kardiyak ve ekstremite anomalilerinin de eklenmesi ile VACTERL birlikteliği şeklinde ele alınmaya başlanmıştır (11). VACTERL teşhisi koyabilmek için bu anomalilerden en az ikisinin olması gerekir (2,12-15). Çoğu hastada (>%90) bu anomalilerden ancak üç ya da daha azına rastlanmaktadır. %1'i ise ancak 5 ya da daha fazlasını içermektedir (2,12-14). Bu birlikteliğin nedeni henüz bilinmemektedir. Yaklaşık olarak 5000 canlı doğumda bir görülen ve doğumdan hemen sonra acil cerrahi müdahale gerektirebilen bir durumdur (13,14). Beyaz erkeklerde görülme eğilimi daha fazla olup, olguların

%12'si ölü doğumla sonuçlanır ve yaklaşık %48'i de doğduktan sonraki ilk yılda kaybedilir (12,13). VACTERL içerisindeki anal atrezisi ve trakeoözofagial malformasyonlar dışında yer alan vertebral anomaliler; hemivertebra ve skolyoz, kardiyak malformasyonlar; ventriküler septal defekt, atrial septal defekt, dekstrokalardi, patent duktus arteriosus, kardiyomegali ve aort koarktasyonu (13), renal anomaliler; renal agenezi ve kistik renal hastalık, ekstremite anomalileri ise; polidaktili, sindaktili gibi (12) çok çeşitli anomaliler yelpazesi şeklinde bulunurlar. Weaver ve ark. (16), VACTERL birlikteliği olan 46 hastada yaptıkları çalışma ile 186 literatür olgusunu karşılaştırmışlar ve vertebral anomalileri %60.4, anal atrezisi %55.9, kardiyak malformasyonları %73.9, trakeoözofagial fistül ve/veya özofagus atrezisini %59.6, renal anomalileri %73.9, ekstremite anomalilerini de %44.2 oranında saptamışlardır.

VACTERL'in nedeninin multifaktöriyel olduğu sanılmaktadır. Başlangıçta mezodermal gelişimde defekt olduğuna inanılmış (10,12), daha sonra birinci trimesterde maternal hormon kullanımının embriyogeneze etki edebileceği düşünülmüş (11), ancak günümüzde daha çok çevresel veya teratojenlerin etken olabileceği üzerinde durulmaktadır (12).

Adriyamisin'in VACTERL birlikteliğindeki anomalileri oluşturmaya ilişkin etki mekanizması açık değildir (17). Ajan hücreye girdiğinde, DNA çift zincirinde interkalasyon yaparak transkripsiyon ve replikasyonunu bozar, ayrıca topoizomera II enzimine bağlanarak DNA hasarı oluşturur. Topoizomera II, ATP-bağımlı DNA'ya bağlanarak çift dizisini ayıran, dizi akışı ve dizi heliksinin çözülmesinden sonra tekrar birleştiren bir enzim olup, DNA replikasyonu ve tamiri için gereklidir. Ayrılmış DNA dizisinin tekrar birleşmemesi sonucu apopitoz meydana gelir. Mide-barsak kanalından absorbe edilmediği için intravenöz yolla verilir. Karaciğerde metabolize edilerek safra ile atılır, yarı ömrü 3-30 saat arasında değişmektedir. Karaciğerde yerleşmiş metastaz veya primer tümör varlığında ya da başka bir nedenle karaciğer fonksiyonunun bozulduğu durumlarda toksisitesi artar (3,18).

Adriyamisin'in sıçanlar üzerinde oluşturduğu etkiler, 3 başlık altında toplanarak incelenebilir.

**1) Apopitoz üzerine etkisi:** Apopitoz, normal embriyonik gelişim için gerekli oldukça önemli bir olaydır (19). Adriyamisin ile oluşturulan sıçan modelinde, trakeoözofagial seperasyon oluşması ile ilgili yapılan çalışmalarda; normal seperasyon için apopitoza ihtiyaç olduğu ve trakeoözofagial

malformasyonların apopitoz yokluğundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (20, 21). Ayrıca, birçok teratojenin etkisini hedef organlarda apopitoz yolu ile oluşturduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, adriyamisin de klinikte tümör tedavilerinde etkisini apopitoza yol açarak gösterdiğinin ileri sürülmesine rağmen, başka bir çalışmada teratojenik etkisinin apopitoz yolu ile oluştuğuna ait hiçbir bulguya rastlanmamıştır. Günümüzde ise artık apopitoz üzerinde pek durulmamaktadır (17).

**2) Notokord morfolojisi üzerine etkisi:** ASM'de en dikkat çekici bulguyu, önbarsak bölgesinde ortaya çıkan anormal notokord morfolojisi oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, notokordun önbarsağa bağlı kalma süresinin uzadığı ve anormal notokord dallanmasının meydana geldiği gözlenmiştir. (22-25). Özdamar ve ark.'nın (25) yaptığı ışık mikroskopik çalışmada, anormal notokord dallanmasının yanında, özellikle notokordun ektopik yerleşimine de rastlanmıştır. Notokordun bu ektopik yerleşiminin daha ventralde, aortaların arasında yer aldığı ve dallanmalar gösterdiği gözlenmiştir. Notokordun kendisi veya dallarının ise, önbarsağa çok yakın veya önbarsak mezenkimine karışmış bir durumda olduğu, ayrıca perinotokordal mezenkiminde önemli bir azalma meydana geldiği belirtilmiştir (25). Yine Gillick ve ark. (17) da adriyamisin oluşturduğu defektlerin, notokord malformasyonu ve ektopik yerleşimi ile bağlantılı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Orford ve ark. (9), özofagial atrezinin mekanizmasını açıklamak için yaptıkları çalışmada, adriyamisin paraaksiyal ve perinotokordal mezenkimdeki hücrel proliferasyonu inhibe ettiğini belirtmiş ve böylece yetersiz mezenkimin, gelişen notokordun, önbarsağın daha yakınında veya bitişik olarak ektopik yerleşimine yol açtığı kanısına varmışlardır. Yine, ASM ile özofagus atrezisi ve/trakeoözofagial fistül oluşturularak yapılan bir araştırmada, defekt seviyesindeki mezenkimde fibroblast sayısının normale göre azaldığı ve kollajen lif sayısının da arttığı tespit edilmiştir (26). Arsic ve ark. (27) da, adriyamisinli sıçan embriyolarında anormal notokord morfolojisine değinmişler, ek olarak anormal dallanan notokordun önbarsağa yapışık olan ventral parçasından güçlü bir şekilde Sonic hedgehog (Shh) gen ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Shh ekspresyonunun güçlü olduğu önbarsağın ventral parçasından trakea, düşük ya da hiç eksprese olmadığı kısmından da özofagus gelişir şeklinde yorumlamışlardır. ASM ile yapılan başka bir çalışmada, stereolojik Cavalieri metodu kullanılarak notokord hacmi değerlendirilmiş, 12 ve 14 günlük embriyolarda notokord hacminin total embriyo

hacmine oranının belirgin bir şekilde arttığı gösterilerek adriyamisin notokord hipertrofinine neden olduğu bildirilmiştir. Bu durumda, notokordun bütün bölgelerinden anormal bir şekilde eksprese edilen Shh'nin, VACTERL birlikteliğindeki malformasyonlara katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (28).

Notokordal süreç, ektoderm ve endoderm arasında primitif düğümden kranial olarak göç eden mezenkimal hücrelerden oluşur, ektoderm ve endodermin eridiği prekordal tabakada son bulur, bu iki katman ileride ağız boşluğunun gelişeceği orofarengial zarı oluşturur. Primitif çizginin kaudal ucunda da embriyonik diskin bilaminar olarak kaldığı ve ileride anüsün gelişeceği dairesel bir alan olan kloak zarı bulunur. Notokordal süreç hücreleri yayılır ve embriyonik endoderm ile karışır. Böyle bir şekilde nöroenterik kanal, yolk kesesi ve amnion boşluğu arasında küçük geçici bir ilişki olduğunu gösterir. Daha sonra notokordun hücreleri, yolk kesesinin endodermal çatısından ayrılır ve tanımlayıcı notokordu oluşturur. Notokord, embriyonun ilkel eksenini tanımlar ve ileride etrafında omurga kolonu gelişir. Fetal dönem sırasında dejenere olur ve yok olurken küçük kalıntı ise diskus intervertebralis içinde nukleus pulposus olarak devam eder (29). Organogenez sırasında, kemik, kırık, çizgili ve düz kaslar, kalp, kan damarları ve böbrekler gibi mezoderm, nöral kanal gibi ektoderm ile barsaklar gibi endodermden köken alan yapıların gelişmesi için genetik olarak belirlenmiş uyarıcı etkiye sahiptir (9, 24).

**3) Moleküler sinyal mekanizmaları üzerine etkisi:** Notokordun, uyarıcı etkisini yaparken gönderdiği genetik sinyallerden bir tanesi, Shh sinyalidir. Shh, vertebral embriyolarda notokorddan başka, nöral tüp ve taban plağı ile ekstremiteler tomurcuklarının polarize edici aktivasyon zonundan salgılanan bir proteindir (30-32). Bu protein, patched (Ptc) ve smoothed (Smo) transmembran reseptörleri ile etkileşerek transkripsiyon faktörlerinden Gli proteinlerini aktive eder ve hücre içi sinyal oluşturur (33-35). Böylece somitlerde sklerotom ve myotom belirlenmesi için, notokord sinyal molekülü olarak çalışır (36). Shh eksikliğinde vertebral kolon ve ekstremitelerin distal kısımları gelişemez (14). Shh'nin aynı zamanda özellikle endodermde sentez edilerek önbarsak (37) ve sonbarsak (38) gelişiminde önemli rol oynadığı daha önce bildirilmiştir. Sıçanlarda 1,75 mg/kg adriyamisin kullanımının, Shh sinyal yolunu etkileyerek önbarsağın gelişimini engellediği ileri sürülmüştür (27). Buna ek olarak, Spilde ve ark., özofagial atrezi ve/veya trakeoözofagial fistül

anomalisi olan yenidoğanlarda yaptıkları araştırmada, immünohistokimyasal olarak özofagial pošta Shh ekspresyonunun ve RT-PCR metoduyla da Shh'nin intrasellüler mediyatörü olan Gli 1,2,3 proteinlerinin varlığını, distal fistülde ise yokluğunu göstermişler (39) ve fistülün özofagus kaynaklı değil solunum tomurcuğu gelişim yetersizliğine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (8, 39). Bu bulgular Shh sinyalinin, özofagial atrezi ve trakeoözofagial fistül gibi önbarsak anomalileri etiolojisinde rol oynayabileceğini desteklemektedir. Ektopik Shh ekspresyonu sayesinde anormal notokord morfolojisinin de VACTERL anomalilerinin oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir (40). Chiang ve ark.'nın (41) Shh delesyonu olan farelerde Shh'nin bazı malformasyonlarla ilgisini göstermesiyle fare çalışmaları başlamış ve Shh delesyonu olan mutant farelerde VACTERL anomalilerinin yaygın olarak gözlemlendiği yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (14, 42).

#### **Adriyaminin Fare Modeli (AFM)**

VACTERL anomalilerinin genetik temelini araştırmak amacı ile çalışmaların çoğu artık fareler üzerinde yapılmaktadır. Bu nedenle sıçanlarda olduğu gibi adriyaminin teratojenitesi ile güvenilir fare modeli oluşturmak hedeflenmiş ve Ioannides ve ark. (43) ilk olarak fare modelini geliştirmiştir. Bu çalışmada, farelere 4 mg/kg adriyaminin, ip olarak 7,5 ve 8,5. günlerde verilmiş ve hayvanların %47'sinde trakeoözofagial fistül/özofagus atrezisi meydana gelmiş, ancak notokord morfolojisi değerlendirilmemiştir. Aynı grubun aynı dozu kullanarak yaptığı bir diğer çalışmada, anormal Shh sinyalinin adriyaminin model gelişiminde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (44).

Dawrant ve ark. (45) ise, farelere 7 ve 8. günlerde dozu yükselterek 6 mg/kg adriyaminin vermişler, ancak trakeoözofagial anomalileri %29 oranında saptamışlardır. ASM'de trakeal agenezinin çok nadir ve trakeoözofagial kleftin hiç görülmemesine rağmen fare modelinde, sırası ile %10 ve %3 sıklıkta ortaya çıktıklarını bildirmişlerdir. Ek olarak özofagial atrezi de %15 oranında görülmüştür. Bu malformasyonları Dawrant ve ark. kolaylıkla tekrarlanabilir ancak değişkenlik gösterir şeklinde yorumlanmıştır. Aynı dozla oluşturdukları model ile yaptıkları diğer bir çalışmalarında, önbarsak ve notokord anomalisinin %64 oranında ve 9,5. günden itibaren ortaya çıktığını gözlemleyerek notokord morfolojisinin ASM'dekine benzer olduğunu belirtmişlerdir. Yani, notokordun önbarsak endodermine bağlı kalarak ayrılması gecikmekte ve bu da ektopik notokord dallanmaları gelişmesine yol açabilmektedir (46). Fare modelinde kullanılan adriyaminin dozu, 4-6 mg/kg arasında değişmekte olup, en etkili doz, bu grubun

çalışmalarında 6 mg/kg olarak belirtilmiştir. (46,47). Yine bu grubun bir başka çalışmasında, ortaya çıkan VACTERL anomalileri, adriyaminin farelere verildiği gestasyon gününe göre değişiklik göstermiştir (48). Buna göre eğer adriyaminin, gestasyonun 7 ve 8. günlerinde verilirse larengeal kleftli özofagus atrezisi gelişmekte, eğer biraz gecikme ile 7,5 ve 8,5. günlerde verilirse daha çok larengotrakeoözofagial kleft gelişmektedir. Oysa ASM'de bunların yerine yalnızca özofagial atrezi veya nadir olarak ta trakeal agenezi gelişmektedir (49).

Adriyaminin farelerde de VACTERL anomalilerini geliştirme mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır. Sinyal yollarına ilişkin yapılan çalışmalarda; Shh, Gli 2 ve Gli 3 mutant farelerde VACTERL anomalilerinin yaygın olarak gözlemlendiği ilk olarak Kim ve ark. (42) tarafından gösterilerek, VACTERL birlikteliğinin embriyogenez sırasında defektif Shh sinyali nedeni ile oluşabileceği, VACTERL embriyogenez ve patogenezini çalışmak için Shh ve Gli mutant farelerin en iyi genetik sistemler olarak kullanılabilirliği ileri sürülmüştür (14).

#### **SONUÇ**

Adriyaminin teratojenik etkisi ile oluşturulan sıçan ve fare modelleri; güvenilir, kolaylıkla uygulanabilen ve insanlarda VACTERL birlikteliğinde görülen anomalilere benzer oluşabilen bir dizi konjenital anomalinin embriyolojik ve moleküler biyolojik olarak araştırılmalarına olanak veren modellerdir. Adriyaminin bu anomalileri oluşturma mekanizmasının henüz açıklanamamasına rağmen, teratojenik etkisinin bildirilmesinden sonra, ilk olarak ASM geliştirilerek VACTERL birlikteliğindeki anomalilere yol açtığı gösterilmiştir. Böylece bu anomalilerin embriyogenez ve patogenezinin çalışılmasına imkan sağlamıştır. Daha sonra Shh sinyal yolu defekti saptanmasıyla bu hastalıkların genetik temelini araştırılması için fareler kullanılmaya başlanmış ve AFM geliştirilmiştir. Oluşturulan sıçan/fare hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda en dikkat çekici bulgular, anormal notokord gelişimi ve hatalı sinyal yolları üzerinde yoğunlaşmıştır.

Sonuçta, adriyaminin ile oluşturulan sıçan ve fare modellerinin, VACTERL birlikteliğinde görülen anomalilerin hücresel ve moleküler mekanizmalarının araştırılmasına ve insanlarda patogenezinin açıklanmasına kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. ASM, AFM'ye göre daha fazla çalışılmış ve açıklanmış olsa da görünen odur ki adriyaminin, her iki model gelişimi üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için gelecekte daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**KAYNAKLAR**

- 1- Mortell A, Montedonico S, Puri P. Animal models in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int.* 2006;22(2):111-28.
- 2- Gillick J, Mortell A, Dawrant M, Giles S, Bannigan J, Puri P. The Adriamycin rat/mouse model and its importance to the paediatric surgeon. *Pediatr Surg Int.* 2008;24(1):113-8.
- 3- Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE. Chemotherapy of neoplastic disease. In Brunton LL (ed): *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York: McGraw-Hill Companies; 2006:1358-9.
- 4- Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, Dyke IL. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology.* 1978;17(2):151-7.
- 5- Mortell A, Giles J, Bannigan J, Puri P. Adriamycin effects on the chick embryo. *Pediatr Surg Int.* 2003;19(5):359-64.
- 6- Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Narrova C, Tovar JA. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheo-oesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg.* 1996;31:498-502.
- 7- Merei JM, Farmer P, Hasthorpe S, et al. Timing and embryology of esophageal atresia and tracheo-esophageal fistula. *Anat Rec.* 1997;249(2):240-8.
- 8- Crisera CA, Connelly PR, Marmureanu AR, et al. Esophageal atresia with tracheoesophageal fistula: suggested mechanism in faulty organogenesis. *J Pediatr Surg.* 1999;34(1):204-8.
- 9- Orford J, Manglick P, Cass DT, Tam PP. Mechanisms for the development of esophageal atresia. *J Pediatr Surg.* 2001;36(7):985-94.
- 10- Quan L, Smith DW. The VATER association. Vertebral defects, Anal atresia, T-E fistula with esophageal atresia, Radial and Renal dysplasia: a spectrum of associated defects. *J Pediatr.* 1973;82(1):104-7.
- 11- Nora AH, Nora JJ. A syndrome of multiple congenital anomalies associated with teratogenic exposure. *Arch Environ Health.* 1975;30(1):17-21.
- 12- Khoury MJ, Cordero JF, Greenberg F, James LM, Erickson JD. A population study of the VACTERL association: evidence for its etiologic heterogeneity. *Pediatrics.* 1983;71(5):815-20.
- 13- Rittler M, Paz JE, Castilla EE. VACTERL association, epidemiologic definition and delineation. *Am J Med Genet.* 1996;63(4):529-36.
- 14- Kim J, Kim P, Hui CC. The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. *Clin Genet.* 2001;59(5):306-15.
- 15- Gokhale SG, Gokhale S. Genetic and evolutionary mechanisms explain associated malformations--a 'G-E-M' concept. *Med Hypotheses.* 2007;69(4):879-83.
- 16- Weaver DD, Mapstone CL, Yu PL. The VATER association. Analysis of 46 patients. *Am J Dis Child.* 1986;140(3):225-9.
- 17- Gillick J, Giles S, Bannigan J, Puri P. Cell death in the early adriamycin rat model. *Pediatr Surg Int.* 2002;18(7):576-80.
- 18- Turker A ve Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. İçinde Kayaalp O (ed): *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.* Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009:331.
- 19- Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(10):512-9.
- 20- 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;34(5):872-5.
- 21- Williams AK, Qi BQ, Beasley SW. Temporospatial aberrations of apoptosis in the rat embryo developing esophageal atresia. *J Pediatr Surg.* 2000;35(11):1617-20.
- 22- Merei JM, Hasthorpe S, Farmer P, Hutson JM. Embryogenesis of tracheal atresia. *Anat Rec.* 1998;252(2):271-5.
- 23- Qi BQ, Beasley SW. Relationship of the notochord to foregut development in the fetal rat model of esophageal atresia. *J Pediatr Surg.* 1999;34:1593-8.
- 24- Possoegel AK, Diez-Pardo JA, Morales C, Tovar JA. Notochord involvement in experimental esophageal atresia. *Pediatr Surg Int.* 1999;15(3-4):201-5.
- 25- Özdamar S, H Ülger, H Çetin Sorkun. Adriamycin'in notokord yapısı ve yerleşimi üzerine etkisi. *Erciyes Tıp Derg.* 2005;27:70-4.
- 26- Günel E, Madenci H, Avunduk MC. Deneysel özofagus atrezisi modelinde özofagus ile trakea arası destek dokudaki farklılıklar. *Genel Tıp Derg.* 2004;14:39-44.
- 27- Arsic D, Cameron V, Ellmers L, Quan QB, Keenan J, Beasley S. Adriamycin disruption of the Shh-Gli pathway is associated with abnormalities of foregut development. *J Pediatr Surg.* 2004;39(12):1747-53.
- 28- Mortell A, O'Donnell AM, Giles S, Bannigan J, Puri P. Adriamycin induces notochord hypertrophy with conservation of sonic hedgehog expression in abnormal ectopic notochord in the adriamycin rat model. *J Pediatr Surg.* 2004;39(6):859-63.
- 29- Boka S, Pilmane M, Kavak V. Embryology and Anatomy For Health Sciences, Latvia. Riga Stradins University. 2010:45-6.
- 30- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell.* 1993;75(7):1401-16.
- 31- Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, Tickle C. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature.* 1994;371(6498):609-12.
- 32- Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol.* 1995;172(1):126-38.
- 33- Ingham PW. Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* 1998;17(13):3505-11.
- 34- Gerhart J. 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology.* 1999;60(4):226-39.
- 35- Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development.* 2000;127(12):2763-72.
- 36- Bumcrot DA, McMahon AP. Somite differentiation. Sonic signals somites. *Curr Biol.* 1995;5(6):612-4.
- 37- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet.* 1998;20(1):58-61.
- 38- Mandhan P, Beasley S, Hale T, Ellmers L, Roake J, Sullivan M. Sonic hedgehog expression in the development of hindgut in ETU-exposed fetal rats. *Pediatr Surg Int.* 2006;22(1):31-6.
- 39- Spilde T, Bhatia A, Ostlie D, et al. A role for sonic hedgehog signaling in the pathogenesis of human tracheoesophageal fistula. *J Pediatr Surg.* 2003;38(3):465-8.
- 40- Gillick J, Mooney E, Giles S, Bannigan J, Puri P. Notochord anomalies in the adriamycin rat model: A morphologic and molecular basis for the VACTERL association. *J Pediatr Surg.* 2003;38(3):469-73.
- 41- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996;383(6599):407-13.
- 42- Kim PC, Mo R, Hui Cc C. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg.* 2001;36(2):381-4.
- 43- Ioannides AS, Chaudhry B, Henderson DJ, Spitz L, Copp AJ. Dorsoroventral patterning in oesophageal atresia with tracheo-oesophageal fistula: Evidence from a new mouse model. *J Pediatr Surg.* 2002;37(2):185-91.

- 44- Ioannides AS, Henderson DJ, Spitz L, Copp AJ. Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. *J Pediatr Surg.* 2003;38(1):29-36; discussion 29-36.
- 45- Dawrant MJ, Giles S, Bannigan J, Puri P. Adriamycin mouse model: a variable but reproducible model of tracheo-oesophageal malformations. *Pediatr Surg Int.* 2007;23(5):469-72.
- 46- Dawrant MJ, Giles S, Bannigan J, Puri P. Abnormal separation of the respiratory primordium in the adriamycin mouse model of tracheoesophageal malformations. *J Pediatr Surg.* 2007;42(2):375-80.
- 47- Dawrant MJ, Giles S, Bannigan J, Puri P. Adriamycin produces a reproducible teratogenic model of gastrointestinal atresia in the mouse. *Pediatr Surg Int.* 2008;24(6):731-5.
- 48- Dawrant MJ, Giles S, Bannigan J, Puri P. Adriamycin produces a reproducible teratogenic model of vertebral, anal, cardiovascular, tracheal, esophageal, renal, and limb anomalies in the mouse. *J Pediatr Surg.* 2007;42(10):1652-8.
- 49- Qi BQ, Beasley SW. Pathohistological study of adriamycin-induced tracheal agenesis in the fetal rat. *Pediatr Surg Int.* 1999;15(1):17-20.