

# EEN MESPUNT MEER

D. Tibboel

Rede EUR

1993

005

MEDISCHE BIBLIOTHEEK EUR



019600 0025 2852

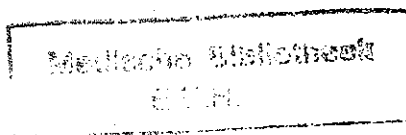
*Erasmus*

Erasmus Universiteit Rotterdam

Rede Erik 1993: 005

**EEN MESPUNT MEER**

Rede uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van  
bijzonder hoogleraar in de  
Experimentele Kinderchirurgie  
vanwege de Stichting Sophia Wetenschappelijk Onderzoek  
aan de Erasmus Universiteit Rotterdam  
donderdag 18 november 1993  
door D.Tibboel





Meneer de rector magnificus,

Leden van het college van bestuur en het bestuur en de wetenschappelijke adviesraad van de Stichting Sophia Wetenschappelijk onderzoek,

Geachte toehoorders,

### Inleiding

In Nederland worden per jaar ongeveer 200.000 kinderen geboren waarvan 4%, dit is circa 8.000 kinderen, een aangeboren afwijking of erfelijke ziekte heeft. Er zijn op dit moment ruim vijfduizend verschillende ziekten bekend waarvan de erfelijkheid volgens de klassieke wetten van Mendel verloopt. Het proces om het menselijk genoom te ontrafelen is in volle gang en daarbij volgen nieuw ontdekte genen elkaar in snel tempo op die<sup>1)</sup> een rol spelen tijdens de normale ontwikkeling of <sup>2)</sup> verband hebben met ziekten. In het laatste geval betreft het veelal genmutaties. Van 122 ziekten (2% van het totaal) is op dit moment het afwijkende gen geïdentificeerd. Naast stofwisselingsziekten zoals cystic fibrosis, vallen onder deze groep ook bepaalde vormen van spierdystrofie, zoals de ziekte van Duchenne<sup>1)</sup> en een aantal tumoren die op de kinderleeftijd voorkomen zoals het retinoblastoom en neurofibromatosis. Ook bepaalde vormen van mentale retardatie waaronder bijv. het zogenaamde fragile X, waarnaar binnen onze faculteit baanbrekend onderzoek is verricht<sup>2)</sup>, behoren tot deze groep ziekten. Identificatie van het afwijkende gen dat ten grondslag ligt aan een ziekte biedt de mogelijkheid voor prenatale diagnostiek met behulp van de vlokcentest vroeg in de zwangerschap of diagnostiek via identificatie van foetale cellen in het bloed van de zwangere vrouw.<sup>3)</sup> Op deze wijze kan de frequentie van voorkomen tot vrijwel nul worden teruggebracht zoals op Cyprus met thalassemie. De verwachting is dat in de komende jaren vele nieuwe "ziektegenen" ontdekt zullen worden hetgeen de deur naar gen-therapie opent.

In geval van bijv. cystic fibrosis is deze verwachting inmiddels omgezet in klinische toepassing; hoewel de resultaten nog dienen te worden afgewacht.<sup>4-6)</sup>

### Aangeboren anatomische afwijkingen.

Zijn voor aangeboren anatomische afwijkingen dezelfde perspectieven binnen handbereik? De inzichten in de oorzaken van aangeboren anatomische afwijkingen zijn nog zeer onvolledig, hoewel ook op dit gebied vooruitgang is geboekt. Ik denk hierbij aan de recente ontdekking van een afwijking op chromosoom 10 bij bepaalde vormen van de ziekte van Hirschsprung<sup>7-9)</sup> en van afwijkingen op chromosoom 22 bij de diGeorge sequentie, een aandoening waarbij aangeboren afwijkingen van het hoofd-hals gebied gepaard gaan met afwijkingen van de bijnieren, de thymus en soms met hartafwijkingen.

Bij patiënten met het syndroom van Waardenburg die veelal herkend kunnen worden door pigmentafwijkingen, doofheid en het soms voorkomen van een stoornis in de zenuwvoorziening van de darm zijn eveneens afwijkingen in bepaalde genen vastgesteld<sup>10)</sup> die inmiddels bekend staan als de homeobox genen<sup>11)</sup>.

Deze genen spelen tijdens de normale embryonale ontwikkeling, een belangrijke rol bij het bepalen van de vorm van het lichaam en de segmentatie en komen zowel voor bij het fruitvliegje *Drosophila* als bij de mens<sup>(11,12)</sup>.

Helaas moeten wij op dit moment in 90% van de gevallen de ouders meedelen dat wij de oorzaak van de aangeboren afwijking bij hun kind niet kennen. Om onze onwetendheid te maskeren gebruiken wij dan termen als multifactorieel een eufemisme voor ik weet het niet.

De variabiliteit van aangeboren anatomische afwijkingen is zeer groot. De afwijking kan beperkt zijn tot een abnormale vorm van de oren of een extra teen maar er kunnen ook bij één kind zeer ernstige, niet met het leven verenigbare, afwijkingen enkelvoudig of meervoudig voorkomen. Bij ongeveer 4500 kinderen per jaar is de afwijking zo ernstig, dat opname in een ziekenhuis en behandeling soms al in de eerste dagen na de geboorte noodzakelijk is. Veelal betreft het hier uitwendig zichtbare ernstige afwijkingen, zoals een verhemelte- en lipspleet, defecten van de buikwand of een open rug. Bij deze categorie kinderen is de diagnose relatief eenvoudig te stellen. Veel moeilijker is het echter bij die kinderen die ogenschijnlijk normaal ter wereld komen, maar die in de eerste dagen tot weken na de geboorte specifieke ziekteverschijnselen vertonen, zoals onvoldoende groei, excessief transpireren tijdens de voeding, koorts, ondertemperatuur of langdurige geelzucht. Ook bij deze kinderen kan er sprake zijn van een ernstige aangeboren afwijking, van bijv. het hart, de urinewegen of de galwegen. Vooral wanneer het kind ogenschijnlijk normaal is bij de geboorte, is na de blijdschap over het vermeend gezonde kind de teleurstelling bij de ouders bijzonder groot en komen veel schuldgevoelens t.o.v. het aangedane kind naar voren. Wij als medici dienen ons te realiseren dat de geboorte van zo een kind leidt tot een rouwproces bij de ouders vanwege het verlies van het verwachte gezonde kind.

#### Veranderingen in de zorg.

De vraag rijst, wat de betekenis van patiënten met aangeboren afwijkingen is binnen de gezondheidszorg. Een onderzoek naar de zuigelingensterfte in Nederland gepubliceerd in 1992 toont aan dat ongeveer één derde van de sterfgevallen gedurende het eerste levensjaar veroorzaakt wordt door aangeboren afwijkingen; zij vormen daarmee de belangrijkste doodsoorzaak<sup>(13)</sup>. In 1989 betrof dit 407 kinderen. Geschat wordt dat de sterfte ten gevolge van aangeboren afwijkingen bij een gemiddelde levensverwachting van 75 jaar in Nederland per jaar leidt tot een verlies van 40.000 levensjaren. Daarmee nemen aangeboren afwijkingen in de rangorde van afwijkingen die het aantal verloren levensjaren bepaalt, na o.a. ongevallen en kanker de 5e plaats in.

U zult zich afvragen of er dan geen vooruitgang is geboekt in de behandeling van kinderen met aangeboren afwijkingen. In de afgelopen decennia is door de verbeterde diagnostiek en behandelingsmogelijkheden op het gebied van de kinderchirurgie, en de kinderanesthesiologie en door het beschikbaar komen van gespecialiseerde afdelingen voor neonatale intensive care, de mortaliteit van het merendeel der ernstige aangeboren afwijkingen sterk gereduceerd en bedraagt

ongeveer 5-10%. Deze mortaliteit wordt in belangrijke mate bepaald door vroeggeboorte en het gelijktijdig voorkomen van aangeboren afwijkingen in andere organen<sup>(14)</sup>. Ik denk hierbij aan het voorkomen van aangeboren hartafwijkingen bij kinderen met een afsluiting van de slokdarm of een grote navelbreuk.

Technisch is vrijwel alles mogelijk en steeds nieuwe therapieën worden aan ons arsenaal toegevoegd zoals de zogenaamde Norwood operatie bij het onderontwikkeld linker hart<sup>(15)</sup>, het intermitterend spoelen van de buikholte bij bepaalde aanlegstoornissen van de nier, zoals de dubbelzijdige nierdysplasie in afwachting van een niertransplantatie op de leeftijd van 1 à 2 jaar en het gebruik van een kunstlong, de zogenaamde extra-corporele membraan oxygenatie (ECMO) waarbij het bloed buiten het lichaam van zuurstof wordt voorzien bijv. bij pasgeborenen met zeer ernstige ademhalingsproblemen.

Gelukkig kunnen veel kinderen na operatieve correctie van de aangeboren afwijking een normaal leven leiden zowel in psycho-sociaal als somatisch opzicht.

Echter, in de afgelopen 10 jaar is ons gebleken dat aangeboren afwijkingen weliswaar gecorrigeerd kunnen worden maar dat bij een niet onaanzienlijk aantal patiënten ernstige somatische of psychosociale restverschijnselen op de lange termijn optreden of zelfs afhankelijkheid van medisch-technische voorzieningen. Deze restverschijnselen zijn van grote betekenis voor de kwaliteit van het leven in de adolescentie- en volwassen periode<sup>(16-18)</sup>.

Er bestaat dan ook dringend behoefte aan onderzoek dat de gevolgen op de lange termijn in ogenschouw neemt. In dit verband wil ik graag wijzen op het lopend onderzoek van de afdelingen kindercardiologie en kinderpsychiatrie van ons ziekenhuis naar de late somatische en psychosociale gevolgen van de behandeling van aangeboren hartafwijkingen. Binnenkort zal vanuit onze afdeling in samenwerking met de afdeling kinderpsychiatrie, medische psychologie en het instituut voor medical technology assessment een soortgelijk onderzoek starten bij kinderen van 8-12 jaar die als pasgeborenen zijn behandeld aan een afsluiting van de slokdarm, dunne darm of anus of aan een defect van de buikwand.

#### De noodzaak van registratie.

Aangezien ernstige aangeboren afwijkingen<sup>1)</sup> weinig voorkomen, <sup>2)</sup> grote variabiliteit vertonen en <sup>3)</sup> complexe diagnostiek en behandeling vereisen is bundeling van krachten noodzakelijk. Dit kan niet los gezien worden van het feit dat tot op heden nog geen landelijke registratie van aangeboren afwijkingen bestaat. In tegenstelling tot de Scandinavische landen wordt ook in andere landen slechts ongeveer 10% van alle geboortes met dit specifieke doel geregistreerd. In onze drie noordelijke provincies worden reeds 10 jaar lang aangeboren afwijkingen geregistreerd in het kader van Eurocat<sup>(19-21)</sup>. In de regio zuid-west Nederland is onlangs een begin gemaakt met deze registratie. Naast Eurocat zijn ook andere registratie systemen bekend, waarbij onder meer aangeboren afwijkingen worden geregistreerd, zoals de Landelijke Verloskunde Registratie, Landelijke Neonatale

Registratie en de Stichting Perinatale Epidemiologie Nederland. Alleen indien in ons land goed epidemiologisch onderzoek van aangeboren en erfelijke afwijkingen plaatsvindt, een complexe zaak in verband met de kostbare meetinstrumenten, kan registratie leiden tot een juiste inschatting van de betekenis van aangeboren afwijkingen voor de bevolking en tot het opsporen van de oorzaken. Op deze wijze kunnen strategieën ontwikkeld worden die leiden tot preventie<sup>(22-24)</sup>.

Voor aangeboren afwijkingen geldt zeker: Voorkomen is beter dan genezen. Zowel Peters als Lindhout noemde dit aspect eerder in hun inaugurele rede uitgesproken in 1990 en 1991 te Utrecht en Rotterdam<sup>(25,26)</sup>.

#### Centrumvorming.

Naast bundeling van krachten ten aanzien van registratie is voor de individuele patiënt herkenbaarheid van centra voor de diagnostiek en behandeling van aangeboren afwijkingen van groot belang. Door de Gezondheidsraad zijn een aantal rapporten uitgebracht over de concentratie van de Kinderchirurgie in 1989<sup>(27)</sup> en zeer recentelijk een rapport over de hartchirurgie en interventie cardiologie voor kinderen<sup>(28)</sup> en het planningsbesluit neurochirurgie en kinderneurochirurgie. In beide rapporten wordt gepleit voor concentratie binnen 3 à 4 centra. Deze visie is helaas nog niet doorgedrongen tot het bestuur van de N.V.K. Licht kan de indruk gewekt worden dat naar een monopolie positie gezocht wordt. Dat is geenszins de bedoeling, het gaat veeleer om het creëren van een hoge standaard van behandeling waarbij de interdisciplinaire benadering van het kind centraal staat. Hiervoor dienen deze centra naast gekwalificeerd personeel de beschikking te hebben over speciale diagnostische faciliteiten, en over de mogelijkheid ingewikkelde operatieve procedures uit te voeren. Deze centra zijn tevens verantwoordelijk voor het opstellen van richtlijnen voor de langdurige follow-up in samenspraak met de in de regio werkzame kinderartsen en andere specialisten<sup>(29)</sup>. Een belangrijk aspect hierbij is een goede overdracht aan de volwassen specialisten die in toenemende mate met onze patiënten geconfronteerd zullen worden i.v.m. de restverschijnselen op lange termijn.

Een hoge standaard van behandeling biedt de mogelijkheid voor een gedegen evaluatie van de behandelingsresultaten en vormt tevens de basis voor het verrichten van wetenschappelijk onderzoek. Het is daarbij van groot belang dat naast de heelkundige en intern-kindergeneeskundige zorg ook andere disciplines op een hoog niveau functioneren waarbij met name de kinderpatholoog en de klinisch geneticus genoemd dienen te worden. De ontwikkelingen binnen de kinderpathologie in Nederland stemmen tot grote bezorgdheid, nu de enige leerstoel kinderpathologie is vervallen in ons land. Gelukkig lijkt door de recente ontwikkeling t.a.v. de kinderpathologie in Rotterdam het tij enigszins te keren. Nog te vaak echter is heden ten dage door het ontbreken van een volgens standaard protocol uitgevoerde kinderobductie een goed erfelijkheidsadvies onmogelijk<sup>(30,31,32)</sup>. Gelukkig wordt vanuit de Vereniging Werkgroep "Kinderpathologie der Lage Landen" hieraan de nodige aandacht besteed.

Het consulteren van de klinisch geneticus is mijns inziens een even wezenlijk onderdeel van de behandeling van een kind met een aangeboren afwijking, als het verrichten van laboratorium onderzoek en een operatieve ingreep. Slechts via deze weg is het mogelijk om de inzichten te vergroten in het ontstaan van aangeboren afwijkingen omdat bij een goede interactie tussen de klinicus als behandelaar en de klinisch geneticus nieuwe aspecten aan het licht kunnen komen waardoor bij de veelheid aan afwijkingen en de grote variabiliteit bepaalde patronen herkend kunnen worden. Ik denk hierbij aan het voorkomen van 1 afwijking bij verschillende leden van één gezin of één familie; in verschillende generaties of de mogelijkheid verschillende afwijkingen in 1 familie terug te brengen tot 1 pathogenetische factor.

In de voornoemde centra dienen klinisch genetici opgenomen te worden in de staf en een integrale taak te vervullen binnen de dagelijkse patiëntenzorg, en niet op afstand en op afroep op consultatieve wijze werkzaam te zijn.

Recent onderzoek in onze eigen kliniek heeft bijv. aangetoond dat het betrekken van een klinisch geneticus bij elk kind opgenomen met een afwijking, het vaststellen van geassocieerde afwijkingen bij patiënten met een stoornis van de zenuwvoorziening van de darm, de ziekte van Hirschsprung, heeft verviervoudigd<sup>(33)</sup>.

Het handhaven en verbeteren van de kwaliteit van de zorg rond het kind met aangeboren afwijkingen is naast de opleiding, ervaring en handvaardigheid van de behandelend specialisten in belangrijke mate afhankelijk van de nieuwsgierigheid van de clinici.

Zij dienen niet alleen het vermogen te bezitten om de ingewikkelde problematiek te overdenken maar ook de tijd te krijgen heldere vraagstellingen te formuleren die de basis vormen voor patientgebonden of fundamenteel wetenschappelijk onderzoek<sup>(34)</sup>.

### **De wetenschappelijke vraagstelling.**

Wij als clinici kunnen niet voorbijgaan aan de vragen die elk ouderpaar zal stellen indien de zorg voor hun kind met een aangeboren afwijking aan hem of haar wordt toevertrouwd. Die vragen luiden: 1) blijft ons kind in leven ? 2) wat zijn de behandelingsmogelijkheden en wat is de te verwachten kwaliteit van leven ? 3) wat is de oorzaak en wat zijn de herhalingsrisico's ?

Op de eerste vraag is vrijwel altijd een duidelijk antwoord te geven. Dit geldt evenzeer voor de behandelingsmogelijkheden maar minder duidelijk is een antwoord over de te verwachten kwaliteit van het leven. Dit wordt in belangrijke mate bepaald door het ontbreken van objectieve scoringssystemen om de gezondheidstoestand van het kind in de verschillende levensfasen te bepalen.

Een antwoord op de laatste vraag moeten wij tot op heden bijna altijd schuldig blijven.

Mijns inziens kan diegene die regelmatig geconfronteerd wordt met kinderen met aangeboren afwijkingen, in wetenschappelijk opzicht geen andere keuze maken dan onderzoek te doen naar de oorzaak (etiologie), en de ontwikkeling van de afwijkingen tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling (de pathogenese) van aangeboren afwijkingen. In het recent verschenen rapport van de Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde getiteld "Kindergeneeskunde in Nederland. Een



nota over de geneeskundige zorg anno 1992 met aanbevelingen voor beleid in de naaste toekomst<sup>(35)</sup>, wordt terecht opgemerkt dat het onderzoek zich vooral dient te richten op het verwerven van inzicht in de ontstaansmechanismen van ziekten met preventie als uiteindelijk doel. In dit rapport wordt onderzoek naar de oorzaken van aangeboren afwijkingen expliciet genoemd. Binnen het Sophia Kinderziekenhuis wil ik in dit verband de kinderchirurgische groep noemen. In deze groep zijn alle heekkundige specialismen en de kinderanesthesiologie vertegenwoordigd. Zij hebben een zeer belangrijk aandeel in de behandeling van aangeboren anatomische afwijkingen. De interdisciplinaire behandeling van patienten met aangeboren anatomische afwijkingen op de intensive care kinderchirurgie van ons ziekenhuis kan m.i. als model fungeren voor een structuur waarin de expertise van de kinderchirurg, kinderarts en kinderanesthesioloog, en een vast staflid klinisch geneticus, gedetacheerd op de IC op dagelijkse basis ten goede aan het kind komt. Dit biedt een unieke gelegenheid om een wezenlijke bijdrage te leveren aan het onderzoek naar de etiologie en pathogenese van aangeboren afwijkingen. De obstetricus met ruime ervaring in prenatale echo diagnostiek kan eveneens een belangrijke rol vervullen om de natuurlijke historie van een anatomische afwijking tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling te vervolgen<sup>(36-38)</sup>.

#### Teratologie.

Is de bestudering van aangeboren afwijkingen dan een nieuw veld van onderzoek binnen de medische wetenschap ? Absoluut niet. Van oudsher zijn in de laboratoria voor anatomie en embryologie gedetailleerde beschrijvingen te vinden van kinderen met ernstige aangeboren afwijkingen.

Zo ontwikkelde zich langzamerhand het vakgebied van de teratologie: de studie van door omgevingsfactoren geïnduceerde aangeboren afwijkingen. Deze omgevingsfactoren kunnen zowel een geneesmiddel als een chemische stof zijn, een infectieziekte, ik denk daarbij aan rode hond of een ziekte bij de moeder, zoals diabetes mellitus. Tengevolge van deze invloeden, zogenaamde teratogene effecten, kan het embryo of de zich ontwikkelende foetus overlijden, kan ernstige groeivertraging optreden of kunnen één of meerdere aangeboren afwijkingen ontstaan<sup>(39-41)</sup>.

Het gebruiken van de juiste nomenclatuur in relatie met de pathogenese van de aangeboren afwijking is hierbij van groot belang<sup>(42)</sup>.

Reeds vele jaren is bekend dat in bepaalde perioden van de ontwikkeling het embryo gevoelig is voor de inwerking van teratogenen. Ook zijn er grote genetische verschillen in gevoeligheid, hetgeen betekent dat experimenten bij dieren niet zonder meer vertaald kunnen worden naar de mens. Tenslotte is er t.a.v. teratogene effecten een duidelijke wisselwerking tussen dosis en respons.

Heden ten dage zijn uitgebreide catalogi beschikbaar van teratogene agentia, die bij een groot scala van proefdieren en soms ook bij de mens aangeboren afwijkingen veroorzaken. Af en toe worden wij opgeschrikt door onbedoelde teratogene exposities. Onlangs nog hebben de media uitgebreid aandacht besteed aan het verband tussen het gebruik van vitamine A derivaten bij acne vulgaris van de moeder tijdens de zwangerschap en het ontstaan van afwijkingen van het gelaat en het uitstroomgebied van het hart bij het kind<sup>(43)</sup>.

## Het wetenschappelijk onderzoek in de kinderchirurgie.

Op het moment dat vele anatomisch-embryologische laboratoria in een identiteitscrisis raakten t.a.v. hun wetenschappelijk onderzoek, kwam de kinderchirurgie tot ontwikkeling. De kinderchirurgen van het eerste uur verkegen hun naamsbekendheid vooral door snel dalende sterftecijfers bij de behandeling van kinderen met ernstige aangeboren afwijkingen. Op deze wijze ontwikkelden zich na de tweede wereldoorlog de eerste centra voor kinderchirurgie in Liverpool onder leiding van Rickham, en de kinderanesthesioloog Jackson Rees; alsmede in Boston en in Melbourne. In Duitsland leidde Rehbein vele kinderchirurgen op, terwijl in ons eigen land bijv. in Amsterdam door Harrestein en in Rotterdam door Vervat de basis van de kinderchirurgie gelegd werd.

Het valt deze pioniers niet te verwijten dat zij niet veel aandacht besteedden aan het experimentele onderzoek naar de pathogenese van aangeboren afwijkingen. Immers, zij beschikten slechts over zeer beperkte middelen om het kind met een ernstige aangeboren afwijking in leven te houden. Toen de kinderchirurg het laboratorium opzocht waren de experimenten aanvankelijk gericht op verbetering van de operatieve procedure zelf zoals die van Louw in Kaapstad met betrekking tot de afsluiting van de dunne darm, de zogenaamde dunne darm atresie, en die van Swenson in de Verenigde Staten t.a.v. de ziekte van Hirschsprung.

Na deze eerste groep kinderchirurgen die experimenteel werk verrichtte toonde een volgende generatie kinderchirurgen duidelijke belangstelling voor de ontwikkelingsbiologie. Met name de kinderchirurg Judah Folkman in Boston, die al jaren onderzoek doet naar de tumor angiogenesis factor, heeft het belang van wetenschappelijk onderzoek voor de kinderchirurgie duidelijk gemaakt. Wellicht is het deze verbreding in het denken van de kinderchirurg, die Molenaar reeds in 1977 er toe bracht meer te zien in het eerste kippe-embryo met een darmatresie, dat hij destijds onder ogen kreeg.

Deze atresie was opgewekt door verstoring van de bloedvoorziening van de darm halverwege de ontwikkeling van het embryo en verstoorde grote gelijkenis met de afwijking die bij de mens voorkomt. De titel van onze eerste gezamenlijke publikatie beloofde wat voor de kinderchirurgie<sup>(44)</sup>. De gut feelings van Molenaar toen, hebben geleid tot een geheel nieuwe onderzoekslijn binnen de kinderchirurgie, die sinds 1984 in de voorwaardelijke financiering is opgenomen in het cluster "aangeboren en erfelijke afwijkingen" van onze faculteit en inmiddels zijn plaats heeft gevonden binnen het Medisch Genetisch Centrum Zuid-West Nederland.

Het wetenschappelijk onderzoek in de Kinderchirurgie dat de basis vormt voor de acceptatie van dit deel van de geneeskunde als zelfstandig vakgebied, kan op 2 verschillende wijzen worden uitgevoerd. In de eerste plaats in de vorm van grote operatieve ingrepen bij proefdieren zoals honden en varkens die gericht zijn op directe toepassing bij de mens. Ik denk hierbij aan onderzoek in het verleden verricht door de kinderchirurgen Bax en Madern in Rotterdam t.a.v. de auxillaire levertransplantatie en de inductie van een defect in het middenrif bij het ongebooren schaap door Hey in Amsterdam. Gebruikmakend van de vaardigheden van de chirurg heeft Heineman in Rotterdam, rond de problematiek van het zogenaamde korte darm syndroom, een onderzoekslijn opgezet bij honden en later bij ratten. Bij deze experimenten werden segmenten dunne darm, tot 90% van de totale lengte

verwijderd en werden tevens transplantaties verricht om het proces van aanpassing van de darm en de groei te kunnen vervolgen. Gelukkig blijft het hier niet bij en vinden op dit moment uitgebreide electrofysiologische en biochemische studies plaats die zullen uitmonden in basaal onderzoek naar regulatie van groei van de darm. Ik ben verheugd dat wij dit samenwerkingsverband kunnen continueren.

De technieken die wij aanvankelijk gebruikten bij onze experimenten passen waarschijnlijk dan ook het beste bij wat u verwachtte voordat U naar deze openbare les kwam.

Een mespunt meer; experimentele kinderchirurgie, betekent dat manuele hoogstandjes met klein instrumentarium in een klein organisme? Soms wel, omdat zij een absolute voorwaarde zijn voor de ontwikkeling van onze modellen voor aangeboren afsluitingen van de dunne darm, de zogenaamde darmatresieën, defecten van de buikwand, de zogenaamde gastroschisis en in een latere fase voor een aantal aspecten van het onderzoek dat zich richt op de normale en abnormale ontwikkeling van de zenuwvoorziening van de darm, als model voor de ziekte van Hirschsprung.

Bij dit onderzoek worden door Marjo Peeters in ons laboratorium, delen van de neurale lijst bij kipeembryo's van 2 dagen oud verwijderd en vinden transplantaties plaats.

Na chirurgische inductie van een aangeboren afwijking wordt momenteel naast biochemische analyse van bepaalde celbestanddelen een uitgebreid scala aan histologische technieken gebruikt zoals licht en elektronen microscopie, fluorescentie microscopie en recent confocale lasermicroscopie om 3-dimensionale beelden te verkrijgen.

Het kipe-embryo bleek hierbij een verrassend goed diermodel dat hedentendage navolging heeft gevonden over de hele wereld.

Een logische voortzetting van het onderzoek die niet aan ons laboratorium is voorbijgegaan is de stap naar genetische modellen voor aangeboren anatomische afwijkingen zoals bijv. muizemodellen met een erfelijke vorm van de ziekte van Hirschsprung die grote gelijkenis vertoont met sommige uitingsvormen van deze ziekte bij de mens.

Dit deel van het onderzoek heeft zich onder leiding van Carel Meijers inmiddels ontwikkeld in de richting van de ontwikkelingsbiologie/genetica waarbij migratie van cellen uit de neurale lijst en het proces van segmentatie tijdens de embryonale ontwikkeling centraal staan.

Hoewel chirurgische vaardigheid niet weg te denken valt is het doel van deze modelsystemen meer kennis te verkrijgen van de normale ontwikkeling.

De processen die ten grondslag liggen aan de normale ontwikkeling verlopen binnen de evolutie volgens dezelfde principes, met andere woorden, genen betrokken bij het ontstaan van regionale verschillen zoals de vorming van het achterlijf en de extremiteiten is niet wezenlijk verschillend bij invertebraten en de mens. Slechts indien wij een beter begrip hebben van deze processen, dan zullen wij meer begrijpen van de etiologie en pathogenese van aangeboren afwijkingen.

Ik denk hierbij aan stoornissen van processen die zich tijdens de normale embryonale ontwikkeling voordoen<sup>(45-64)</sup> zoals:

- \* Celdeling en celdood
- \* Cel-cel contact en cel-substraat contact (adhesie).
- \* Segmentatie van het embryo
- \* Migratie van cellen
- \* Differentiatie onder invloed van bijv. groeifactoren en hormonen.

#### Het hernia diafragmatica onderzoek.

Het onderzoek dat wij op dit moment verrichten rond het probleem van de hernia diafragmatica wil ik gaarne als voorbeeld nemen om U mee te nemen in ons denkproces en U onze wegen te laten zien tussen teratologie en ontwikkelingsbiologie.

In Nederland worden per jaar ongeveer 60 kinderen geboren met een hernia diafragmatica.

Deze kinderen hebben een gat in het middenrif als gevolg waarvan de buikorganen grotendeels de borstholte vullen. De long is onderontwikkeld vooral aan de aangedane zijde, meestal links. Hierdoor ontstaan zeer ernstige ademhalingsproblemen bij de pasgeborene die kunstmatige beademing noodzakelijk maakt. De kans om te overlijden is bij kinderen die binnen 6 uur na de geboorte ademhalingsproblemen vertonen  $\pm$  40%.

Wereldwijd worden pogingen ondernomen om nieuwe therapievormen toe te passen waaronder het opereren van het nog ongeboorne kind; toepassing van kunstlongbehandeling en nieuwe medicijnen om de bij veel van deze kinderen sterk verhoogde longvaatweerstand te verlagen of de longontplooiing te verbeteren. Helaas ontbreken fundamentele inzichten m.b.t. de determinanten die de longontwikkeling bepalen.

De kunst is nu deze zeer ingewikkelde klinische problematiek te vertalen in een heldere vraagstelling die een goede experimentele benadering mogelijk maakt. Van groot belang is hierbij het juiste modelsysteem te kiezen. Voor de experimentele benadering kozen wij ratten die in een stadium waarin de longknop ontstaat als afscheiding van de voordarm een herbicide kregen toegediend, namelijk Nitrofen. De primaire organen waarop deze stof invloed heeft, m.a.w. het teratogene effect was vanuit de literatuur bekend evenals de tijdsspanne waarin het maximale teratogene effect kan worden bereikt.

De volgende specifieke doelstelling werd geformuleerd:

Analyse van de morfologische en functionele veranderingen van de long en het middenrif in verschillende stadia van de ontwikkeling en identificatie van de factoren die een rol spelen bij de ontwikkeling van de long bepalen.

Na toediening van Nitrofen aan moederratten op de 11e dag van de zwangerschap werd bij hun jongen een beeld waargenomen overeenkomstig het klinisch beeld van de mens, namelijk ernstige ademhalingsproblemen, waarvoor beademing noodzakelijk is. Bij 40-70% van de rattefoeten bleek

een defect in het middenrif te bestaan. De lever en darmlijzen bevinden zich in de borstholte, in direct contact met de long.

De vraag of bij de ratten met een hernia diafragmatica sprake was van onderontwikkeling van de long kon inmiddels bevestigd worden op basis van bepalingen van de long-lichaamsgewicht ratio, het aantal longblaasjes in aanleg en het eiwit en DNA gehalte. De vraag of de onderontwikkeling van de long ook gepaard gaat met een vertraagde rijping of differentiatie van de longblaasjes en de cellen die de longblaasjes bekleden, de zogenaamde alveolaire type II cellen, kon eveneens positief worden beantwoord.

Hiervoor vond kleuring plaats met een fluorescerend gemaakt antilichaam gericht tegen het zogenaamde surfactant proteïne A, dat aanwezig is in de alveolaire type II cellen en verantwoordelijk is voor de ontplooiing van de long.

In de klassieke opvatting is de onderontwikkeling van de long bij hernia diaphragmatica het gevolg van compressie door darmlijzen omdat deze zich voor de geboorte in de borstholte bevinden en de groei van de long belemmeren. Na bestudering van het normale sluitingsproces van het primitieve middenrif, bleek dat darmlijzen geen rol spelen in de pathogenese van de onderontwikkeling van de long. Tot laat in de ontwikkeling werd alleen de lever in de borstholte gevonden, terwijl bij aanwezigheid van darmlijzen in de borstholte geen tekenen van compressie worden waargenomen. Wel is er sprake van competitie voor ruimte binnen het embryo door de verschillende organen die zich rond het middenrif ontwikkelen. Studies bij embryo's in stadia waarin de longknop voor het eerst kan worden onderscheiden hebben inmiddels aangetoond dat er remming van de groei van de longknop optreedt. In hoeverre geprogrammeerde celdood (apoptose), een wezenlijk onderdeel tijdens de normale organogenese en van belang bij het ontstaan van sommige aangeboren afwijkingen, in dit modelsysteem overmatig optreedt of dat er sprake is van een verminderde delingsactiviteit wordt op dit moment onderzocht op weefselcoupes na inbouw van specifieke labels. Hiervoor maken wij gebruik van een speciaal embryokweekstelsel, de zogenaamde whole embryo culture, waarbij de ontwikkeling van dag 9 - 12 kan worden bestudeerd.

Gezien de stereochemische configuratie van Nitrofen, die veel op schildklierhormoon lijkt, en het feit dat wij inmiddels hebben aangetoond dat Nitrofen schildklierhormoon van zijn receptor verdringt, werd voor de ontstaanswijze van hernia diafragmatica de invloed van schildklierhormoon tijdens verschillende fases van de ontwikkeling van de long en het middenrif onderzocht. Van schildklierhormoon is bekend dat het één van de belangrijkste groeifactoren is voor de long. Met behulp van zogenaamde in situ hybridisatie kan de localisatie van een gen produkt in weefselcoupes zichtbaar gemaakt worden, zodat de ontwikkeling zowel tijdens normale als abnormale morphogenese kan worden gevolgd.

Inmiddels hebben wij met behulp van specifieke probes aangetoond dat de in de kern aanwezige receptoren voor het schildklierhormoon, de nucleaire T3 receptor in een vroeg stadium tot expressie gebracht worden in de longknop en op het middenrif.

Naast schildklierhormoon zijn polypeptide groeifactoren eveneens van groot belang voor de longontwikkeling. Met name transforming growth factor  $\beta$  en de insulin-like growth factors dienen

genoemd te worden. De expressie van de verschillende vormen van de insulin-like growth factors en hun bindende eiwitten in relatie met schildklierhormoon worden in de normale en abnormale long worden momenteel op het niveau van het messenger DNA en middel in situ hybridisatie onderzocht.

Een nieuwe dimensie in het ontwikkelings-biologisch onderzoek is de mogelijkheid vreemd DNA, bijv. van andere diersoorten of virussen, of afwijkende genen in cellen of in het zich ontwikkelend organisme in te brengen. De mogelijkheid om via genetische manipulatie modellen van ziekten te construeren, beperkt zich niet tot in vitro technieken. Indien in vitro een gen wordt geïntroduceerd in embryonale stamcellen, is daarmee de mogelijkheid gecreeerd dat gen tot expressie te brengen in een volwassen dier door introductie van dergelijke gemanipuleerde cellen in een embryo van dezelfde soort als waarvan de stamcel afkomstig is. Een aantal nakomelingen dragen vervolgens het afwijkende gen. In dat geval spreekt men van een zogenaamd transgeen dier<sup>(55,56)</sup>. De cellen met het afwijkende gen kunnen vervolgens in het zich ontwikkelend embryo vervolgd worden door opname van specifieke stoffen, als bijv. retinoïnezuur of gebruikmakend van een zogen. reporter gen als  $\beta$ -galactosidase. Deze technieken bieden tevens de mogelijkheid om via zogenaamde homologe recombinatie een normaal gen uit te schakelen. Men spreekt dan van een knock-out mutant. Deze technieken bieden ongekende mogelijkheden voor de toekomst om het inzicht in de genen die betrokken zijn bij de verschillende stadia van de embryonale ontwikkeling, zowel voor het embryo als geheel als voor specifieke organen, nader te identificeren.

Gebruik makend van deze techniek zal een transgene muis, de zogenaamde thyreosensor muis, worden gebruikt om de invloed van schildklierhormoon op de vroege longontwikkeling te bestuderen. Deze experimenten zullen 1 februari a.s. van start gaan.

## Dankwoord.

Het moge U duidelijk zijn dat dit onderzoek niet het werk is van 1 persoon, maar gebaseerd is op een goede samenwerking, zowel binnen onze faculteit, met de afdelingen celbiologie, experimentele anesthesiologie, pathologie en biochemie, en afdelingen van andere Universiteiten zoals de afdeling longziekten van de Universiteit van Leiden, de afdeling anatomie van de Universiteit van Amsterdam en het laboratorium voor Veterinaire Biochemie van de Diergeneeskundige Faculteit te Utrecht alsmede de unit teratologie van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieuhygiene.

De Stichting Sophia Wetenschappelijk Onderzoek ben ik bijzonder dankbaar voor het instellen van de leerstoel en mijn benoeming tot Bijzonder Hoogleraar in de Experimentele Kinderchirurgie.

I am particularly grateful to the members of the scientific board of the Sophia Foundation for reviewing my grant proposals and the opportunity to continue my research activities. I am pleased to welcome you all today on this special occasion.

De leden van het college van Bestuur, de Rector Magnificus en de medische faculteit, wil ik danken voor de goedkeuring die zij aan deze benoeming hebben verleend.

Ada, Marije, Sander, Jeroen en Mark. Het feit dat de toga van deze Universiteit dezelfde kleuren heeft als de vlag van Texel, heeft voor ons allemaal een bijzondere betekenis.

Hooggeleerde Molenaar, beste Jan. Deze rede wil ik graag aan jou opdragen en je danken voor de enorme vrijheid in denken en handelen die je mij de afgelopen 15 jaar hebt gegeven. Een andere titel dan "Een Mespunt Meer" zou ondenkbaar zijn. Een mespunt meer is karakteristiek vóór jou en ván jou.

Hooggeleerde Galjaard, beste Hans.

Ik ben er trots op dat ik mij één van jouw leerlingen mag noemen. Ons onderzoek was zonder jouw steun nooit uitgegroeid tot het model Molenaar, inmiddels een begrip binnen onze faculteit.

Hooggeleerde Visser, beste Henk.

Eén van jouw oud-assistenten als hoogleraar Experimentele Kinderchirurgie. Voor ons beiden een bijzondere dag.

Dr. van der Kamp en Provoost, beste Arthur en Bram.

Onderzoek bloeit bij persoonlijke vriendschap en de wijze waarop jullie beiden op geheel eigen wijze hieraan vorm hebben gegeven in de afgelopen 13 jaar is voor mij van heel bijzondere betekenis.

Dr.Gaillard, Beste Hans,

Jouw persoonlijke inleiding in de kinderpathologie heeft mij geleerd dat er een groot verschil bestaat tussen kijken en zien.

Dr.Meijers, beste Carel.

De voortgang van het onderzoek is voor een belangrijk deel gebaseerd op jouw aanwezigheid op het laboratorium voor celbiologie.

Mijn collega's van de afdeling kinderheekunde hebben mij altijd de ruimte gelaten als ik "even"naar het laboratorium was. Met name Frans Hazebroek heeft vanaf het eerste moment mijn positie als kinderarts tussen de chirurgen gesteund.

De dagelijkse zorg voor de patienten op de IC kan ik met een gerust hart aan de verpleging overlaten.

De rust die Cock en Heleen creerden heeft het Machteld en Marjan mogelijk gemaakt een extra dimensie aan onze afdeling in de zin van verpleegkundig onderzoek toe te voegen.

Pa en Moe, jullie hebben de basis gelegd, ik ben blij dat jullie hier vandaag kunnen zijn.



## **Synthese.**

Het feit dat de experimentele kinderchirurgie zich beweegt in het veld van de experimentele embryologie, teratologie, ontwikkelingsbiologie en genetica, dwingt ons ten einde onze kennis te vermeerderen de mens veelal tijdelijk te verlaten.

Eenzijds dienen wij op de hoogte te zijn van de regulatie van ontwikkeling en groei, verkregen bij andere organismen, zoals muizen, spoelwormen en vliegen om een bijdrage te kunnen leveren aan een beter begrip over ontstaansmechanismen van aangeboren afwijkingen<sup>(57,58)</sup>.

Anderszijds moeten wij niet uit het oog verliezen dat de vooruitgang die geboekt wordt op moleculair niveau vervolgens geïntegreerd dient te worden in concepten van een hoger niveau; namelijk het functioneren van het organisme als geheel.

Het uiteindelijke doel van onze gezamenlijke inspanningen is het kind met een aangeboren afwijking een normaal leven te laten leiden door optimale vormen van behandeling aan te bieden en kennis te hebben van de processen die de normale en abnormale ontwikkeling bepalen.

Ik dank U voor uw aandacht.

## References

1. Slater CR. Muscular dystrophy, The missing link in DMD ? (1987) *Nature* 330:693-694.
2. Verkerk AJMH et al. Identification of a gene (SMR-1) containing a CCG repeat coincidence with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome (1991) *Cell* 65:905-914.
3. D'Alton ME, DeCherney AH. Prenatal Diagnosis. (1993) *N Eng J Med* 328:114-120.
4. Tizzano EF, Buchwald M. Cystic fibrosis: Beyond the gene to therapy. (1992) *J Pediatr* 120:337-349.
5. Coutelle C, Caplen N, et al. Gene therapy for cystic fibrosis. (1993) *Arch Dis Childh* 68:437-443.
6. Davies K, Williamson B. Gene therapy begins. Rapid progress likely. (1993) *Br Med J* 306:1625-1626.
7. Passarge E. Wither polygenic inheritance Mapping Hirschsprung disease. (1993) *Nature Genet* 4:325-326.
8. Lyonnet S, Bolino A. et al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10 (1993) *Nature Genet* 4:346-350.
9. Angrist M, Kauffman E. et al. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10 (1993) *Nature Genet* 4:351-356.
10. Tassabehji M, Read AP. et al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene (1992) *Nature* 355:635.
11. De Robertis EM, Oliver G, Wright CVE. Homeobox genes and the Vertebrate Body Plan (1990) *Scien Am*, July;26-32.
12. Chisaka O, Musci TS, Capecchi MR. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox-1.6 (1992) *Nature* 355:516-520.
13. Mackenbach JP. De Nederlandse zuigelingensterfte in de jaren tachtig. (1992) *Ned Tijdschr Geneesk* 136:1140-1147.
14. Hazebroek FWJ, Tibboel D, Leendertse-Verloop K, et al. Evaluation of mortality in surgical neonates over a 10 year period: nonpreventable permissible and preventable death (1991) *J Pediatr Surg* 26:1058-1063.
15. Starnes VA, Griffin ML. et al. Current approach to hypoplastic left heart syndrome. Palliation, transplantation, or both? (1992) *J Thorac Cardiovasc Surg* 104:189-195.
16. Ludman L, Spitz L, Lansdown R. Intellectual Development at 3 years of age of children who underwent major neonatal surgery (1993) *J Pediatr Surg* 28:130-134.
17. Stark J. Do we really correct heart defects ? (1989) *J Thorac Cardiovasc Surg* 97:1-9.
18. Murphy JG, Gersh BJ. et al. Long-term outcome in patients undergoing surgical repair of tetralogy of Fallot (1993) *N Eng J Med* 329:593-599.
19. Cornel MC, Walle de HEK. et al. Prevalenties bij de geboorte van meer dan 30 aangeboren afwijkingen in Noord-Nederland (1991) *Ned Tijdschr Geneesk* 135:2032-2036.
20. Cornel MC, Walle de HEK, Kate ten LP. Ten years of experience with registration of congenital anomalies in the Northern Netherlands by EUROCAT (1992) *T Soc Gezondheidsz* 70:637-644.
21. Cornel MC. Registration and Prevention of congenital anomalies (1993) *Academisch Ziekenhuis Groningen, Proefschrift*.
22. Congenital Malformations Worldwide. A report from the international Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (1991) Elsevier, Amsterdam.
23. Czeizel AE, Intody Z, Modell B. What proportion of congenital abnormalities can be prevented? (1993) *BMJ* 306:499-503.
24. Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation (1993) *BMJ* 306:1645-1648.
25. Peters PWJ. Suggesties voor een baby (1990) Inaugurele rede. VSOP, Baarn.
26. Lindhout, D. Erfelijkheid, milieu en aangeboren afwijkingen (1991) Inaugurele rede. VSOP.
27. Gezondheidsraad. Chirurgie bij de kinderen. De noodzaak van concentratie. Advies uitgebracht aan de Minister en Staatssecretaris van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur (no.1989/07) 's-Gravenhage: Gezondheidsraad, 1989.
28. Gezondheidsraad. Hartchirurgie en interventiecardiologie voor kinderen. (1993) Advies uitgebracht aan de Minister en de Staatssecretaris van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur. 's Gravenhage: Gezondheidsraad.

29. Carey JC. Health supervision and anticipatory guidance for children with genetic disorders (including specific recommendations for Trisomy 21, Trisomy 18, and neurofibromatosis I) (1992) In: *Ped Clin N Am Med Genet* 1 39;25-53.
30. Wigglesworth JS. Quality of perinatal autopsy (1991) *Br J Obstet Gynaecol* 98;617-623.
31. Rushton DI. West Midlands perinatal mortality survey, 1987. An audit of 300 perinatal autopsies (1991) *Br J Obstet Gynaecol* 98;624-627.
32. Hartwig NG. Pathoembryology: Developmental processes and congenital malformations (1992) *Academisch Ziekenhuis Leiden, Proefschrift*.
33. Dommelen van M. et al. Patterns of malformation and dysmorphism associated with Hirschsprung disease: evaluation of 214 patients (1993) *Ingezonden voor publikatie*.
34. Arias IM. Training basic scientists to bridge the gap between basic science and its application to human disease (1988) *N Eng J Med* 321;972-974.
35. Dooren LJ, Jongkamp-Draaisma L, Vaandrager GJ.(1992) *Kindergeneeskunde in Nederland. Een nota over de kindergeneeskundige zorg in Nederland anno 1992 met aanbevelingen voor beleid in de naaste toekomst. Ned Ver voor Kindergeneeskunde, Utrecht*.
36. Soothill PW, Ajayi R, Gibbs J. et al. Effect of a fetal surveillance unit on admission of antenatal patients to hospital (1991) *BMJ* 303;269-271.
37. Ewigman BG, Crane JP. et al. Effect of prenatal ultrasound screening on perinatal outcome (1993) *N Eng J Med* 329;821-875.
38. Allan LD. Cardiac Ultrasound Scanning (1991) In Drife JO, Donnai D.:*Antenatal Diagnosis of Fetal Abnormalities*. Springer-Verlag, London.
39. Lindhout D. Teratology (1991) *Curr Op Pediatr* 3;300-306.
40. Lindhout D, Ormzigt JGC. Pregnancy and the Risk of Teratogenicity (1992) *Epilepsia* 33;S41-S48.
41. Nau H, Hauck RS, Ehlers K. Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects in Mouse and Human: Aspects of Chirality, Alternative Drug Development, Pharmacokinetics and Possible Mechanisms (1991) *Pharmacol Toxicol* 69;310-321.
42. Spranger J, Benirschke K, Hall JG. et al. Errors of morphogenesis: Concepts and terms (1982) *J Pediatr* 100;160-165.
43. Lammer EJ, Chen CT, Hoar RM. et al. Retinoic acid embryopathy (1985) *N Eng J Med* 313;837-843.
44. Tibboel D, Molenaar JC, Nie van CJ. New perspectives in fetal surgery: the chicken embryo (1979) *J Ped Surg* 14;438-440.
45. Fineman RM, Schoenwolf GC. Animal model: Dysmorphogenesis and Death in a Chicken Embryo Model (1987) *Am J Med Genet* 27;543-552.
46. Sulik KK, Cook CS, Webster WS. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death (1988) *Development* 103 Supp 213-232.
47. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death (1992) *Nature* 356;397-400.
48. Robertson M. Retinoic acid receptor: Towards a biochemistry of morphogenesis (1987) *Nature* 330;420-421.
49. Rusolahti E, Pierschbacher MD. New Perspectives in Cell Adhesion RGD and Integrins (1987) *Science* 118;491-494.
50. Abbott NJ. Developmental neurobiology: The milieu is the message (1988) *Nature* 332;490-491.
51. Slack JMW. Embryology. We have a morphogen! (1987) *Nature* 327;553-554.
52. Holland PWH, Hogan BLM. Expression of homeo box genes during mouse development: a review (1988) *Genes & Development* 2;773-782.
53. Waterfield MD. Growth Factors (1989) *Br Med Bul* 45;nr.2. Churchill Livingstone; Edinburgh.
54. Zhang X, Hoffmann B. et al. Retinoid X receptor is an auxillary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors (1992) *Nature* 355;441-446.
55. Kapur RP, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice (1992) *Development* 116;167-175.
56. Gossen JA. Development of Transgenic Mouse Models for Studying Gene Mutations in Vivo (1993) *Academisch Ziekenhuis Leiden, Proefschrift*.
57. *Editorial Developmental Biology: impact on medicine* (1992) *Lancet* 340;760-761.
58. Gordon JI. Understanding Gastrointestinal Epithelial Cell Biology: Lessons From Mice with Help from Worms and Flies (1993) *Gastroenterology* 104;315-324.