

ARTICOLE ORIGINALE

RECONSTRUCȚIA CHIRURGICALĂ EXPERIMENTALĂ A DEFECTELOR DIAFRAGMATICE PRIN UTILIZAREA GREFELOR BIOLOGICE DECELULARIZATE. REZULTATE PRELIMINARE. PRELIMINARY RESULTS IN EVALUATION OF DECELLULAR BIOLOGICAL MATERIALS USED IN EXPERIMENTAL SURGICAL RECONSTRUCTION OF DIAPHRAGMATIC DEFECTS

Eremia Victor¹, Babuci Stanislav^{3,4}, Petrovici Vergil⁴, Negru Ion⁴, Nacu Viorel³, Cobzac Vitalie³

¹ *Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*

² *Laboratorul Inginerii Tisulare și Culturi celulare*

³ *Laboratorul Infecției chirurgicale la copii*

⁴ *IMSP Institutul Mamei și al Copilului*

Rezumat

În pofida unor avantaje ale materialelor sintetice în reconstrucția defectelor diafragmatice, sunt descrise mai multe complicații postoperatorii severe care impun necesitatea utilizării ca alternativă a materialelor de origine biologică.

Scopul studiului a fost evaluarea eficacității pericardului și peritoneului porcin comparativ cu peritoneul bovin în reconstrucția defectelor diafragmatice majore.

Lotul de studiu include 6 porci cu greutatea de 10 kg, supuși intervenției chirurgicale sub anestezie generală și sacrificați peste 90 de zile de la operație conform cerințelor în vigoare, studiul fiind aprobat de Comisia de Bioetică. Animalele au fost supuse laparotomiei subcostale stângi cu reconstrucția defectului diafragmatic, creat chirurgical, cu grefe decelularizate de pericard porcin (lotul 1 - 2 animale) și peritoneu porcin (lotul 2 - 2 animale) și grefe de peritoneu bovin prezervat în formaldehidă (lotul 3 - 2 animale).

Rezultatele. La a 90-a zi postoperator animalele din lotul 1 și 3 erau vii. Examenul radiologic efectuat la 15 zile postoperator a stabilit o configurație normală a neohemidiafragmului creat. La a 60-a zi postoperator, în lotul 1 a fost documentată eventrația neohemidiafragmului, pe când în lotul 3 configurația normală a neohemidiafragmului s-a păstrat. În lotul 2 la a 15-a zi postoperator a fost observată o eventrație neînsemnată a neohemidiafragmului. Ulterior, ambele animale ale acestui lot au decedat subit la a 54-a și a 60-a zi postoperator, la necropsie fiind determinată dehiscența grefei cu dezvoltarea herniei diafragmatice complicată prin strangulare.

Datele investigațiilor morfopatologice au pus în evidență diferite aspecte de regenerare și remodelare ale acestor materiale biologice.

Rezultatele prealabile ale acestui studiu experimental ne permit de a conchide că grefele decelularizate de pericard și peritoneu porcin, utilizate în reconstrucția chirurgicală a diafragmului, au o biorezistență redusă, care poate contribui la dezvoltarea unor complicații grave, comparativ cu grefele de peritoneu bovin prezervat în formaldehidă. Aceste date sugerează necesitatea unor studii suplimentare pe termen lung, care ar avea ca scop obținerea unor rezultate mai durabile.

Abstract

Despite some advantages of synthetic materials in the reconstruction of diaphragmatic defects, several severe postoperative complications are described, which require the use of biological materials as an alternative.

The purpose of the study was to evaluate the efficacy of porcine pericardium and peritoneum as compared to bovine peritoneum in the reconstruction of major diaphragmatic defects.

The study group included 6 pigs weighing 10 kg, subjected to surgery under general anesthesia and sacrificed 90 days after surgery according to the requirements in force. The study was approved by the Bioethics Committee. The animals were subjected to the left subcostal laparotomy with the reconstruction of surgically created diaphragmatic defect with decellularized porcine pericardial grafts (group 1 - 2 animals) and porcine peritoneal grafts (group 2 - 2 animals) as well as bovine peritoneal grafts preserved in formaldehyde (group 3 - 2 animals).

Results. On the 90th day after surgery, the animals in lots 1 and 3 were alive. The X-ray examination performed 15 days postoperatively determined a normal configuration of the created neo-hemidiaphragm. On the 60th day after surgery, the neo-hemidiaphragm eventration was found in lot 1, while in group 3 the normal neo-hemidiaphragm configuration was preserved. In group 2 on the 15th postoperative day, an insignificant neo-hemidiaphragm eventration was observed. Subsequently, both animals in this group died suddenly on the 54th and 60th postoperative days. The necropsy determined graft dehiscence with the development of diaphragmatic hernia complicated by strangulation.

The morphopathological investigation data highlighted various aspects of regeneration and remodeling of the above mentioned biological materials.

The preliminary results of the experimental study allowed us to conclude that decellularized porcine pericardial and peritoneal grafts used in surgical reconstruction of the diaphragm have a low bioresistance which can contribute to the development of serious complications, compared to bovine peritoneal grafts preserved in formaldehyde. These data suggest the need for further long-term studies to achieve more sustainable outcomes.

Diafragma reprezintă un organ critic în susținerea vieții prin menținerea activității respiratorii normale și oferirea unei bariere între cavitățile toracică și abdominală, fiind considerat de unii autori ca al doilea cel mai important mușchi după inimă. Dezvoltarea anormală a diafragmului reprezintă o amenințare care pune viața în pericol [23,27].

În pofida progreselor semnificative obținute în terapia intensivă neonatală și noile modalități de tratament, majoritatea studiilor multicentrice indică o rată de supraviețuire de aproximativ 65% - 80%, acest indice fiind mult mai mic în formele bilaterale [4,19].

În cazurile unor defecte diafragmatice de dimensiuni majore mai mulți autori indică la utilizarea grefelor protetice, existând o controversă ce se referă la tipul de material: biologic sau sintetic, rezorbabil sau nerezorbabil, aceste calități influențând în mod direct rezultatele tratamentului. În acest scop, în literatura de specialitate au fost propuse mai multe tipuri de materiale biologice fără a fi identificat materialul ideal [26].

Scopul studiului a fost evaluarea comparativă a eficacității alogrefelor decelularizate de pericard și peritoneu porc și a xenogrefelor de peritoneu bovin prezervate în formaldehidă în reconstrucția defectelor diafragmatice majore în model experimental.

Materiale și metode. Lotul de studiu include 6 porci de rasă Landrace cu vârsta de 4 săptămâni și greutatea de 9,8 -10,2 kg, supuși intervenției chirurgicale sub anestezie generală și sacrificate peste 90 de zile de la operație conform cerințelor în vigoare, studiul fiind aprobat de Comisia de Etică în Cercetare. Animalele au fost supuse laparotomiei subcostale stângi cu modelarea chirurgicală a unui defect circular de 5 cm în diametru în hemidiafragma stâng, ulterior acesta fiind închis cu grefe decelularizate de pericard porc (lotul 1 - 2 animale) și peritoneu porc (lotul 2 - 2 animale) și grefe de peritoneu bovin prezervat în formaldehidă (lotul 3 - 2 animale) (fig. 1).

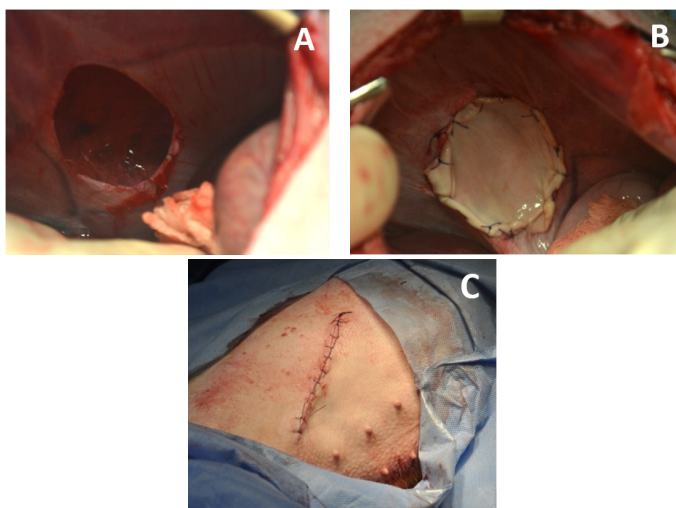


Fig. 1. Aspectul macroscopic al modelării chirurgicale și plastia cu greță biologică decelularizată a unui defect diafragmatic în experiment pe animale (explicații în text). A – aspectul intraoperator al defectului diafragmatic creat chirurgical; B – aspectul intraoperator al închiderii defectului diafragmatic cu greță biologică; C – plaga postoperatorie suturată

Rezultate și discuții. La a 90-a zi postoperator animalele din lotul 1 și 3 erau vii, animalele lotului 2 au decedat la 54-a și a 60-a zi postoperator din cauza recurenței defectului diafragmatic complicată cu strangulare.

Examenul radiologic, efectuat la 15 zile postoperator, în lotul 1 și 3 a stabilit o configurație normală a neohemidiafragmului creat (A, C). În lotul 2 radiografia toracică a pus în evidență o poziție ascensionată a hemidiafragmului stâng (B) (fig. 2).

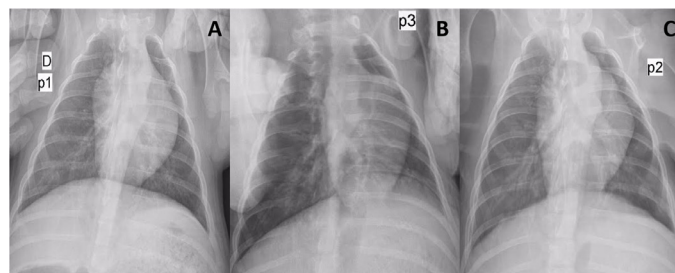


Fig. 2. Radiografie toracică a animalelor de laborator efectuată la 2 săptămâni postoperator: A – lotul 1, B – lotul 2, C – lotul 3 (explicații în text).

La a 60-a zi postoperator, în lotul 1 a fost documentată eventrația neohemidiafragmului, pe când în lotul 3 configurația normală a neohemidiafragmului s-a păstrat (fig. 3).

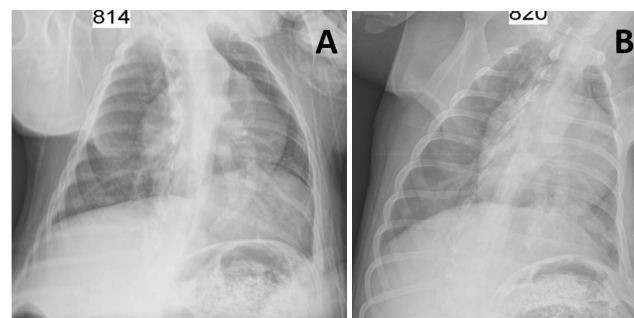


Fig. 3. Radiografie toracică a animalelor de laborator efectuată la 60 de zile postoperator: A – eventrația hemidiafragmului stâng (lotul 1); B – configurație normală a hemidiafragmului stâng (lotul 3)

La 90 de zile postoperator conform examenului radiologic observăm prezența eventrației hemidiafragmului stâng, fără progresare în lotul 1, iar în lotul 2 s-a dezvoltat eventrație de dimensiuni majore a hemidiafragmului stâng (fig. 4).

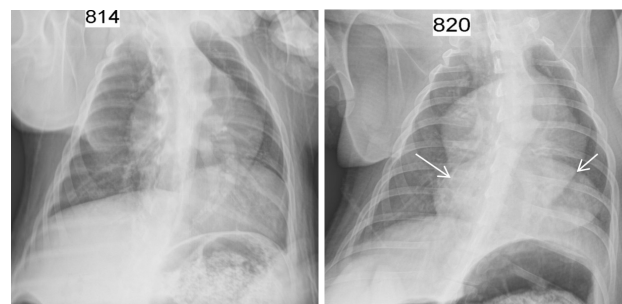


Fig. 4. Radiografie toracică a animalelor de laborator efectuată la 3 luni postoperator: A – prezența eventrației hemidiafragmului stâng, fără progresare (lotul 1); B – dezvoltarea eventrației de dimensiuni majore a hemidiafragmului stâng (lotul 3)

Datele investigațiilor morfopatologice au pus în evidență diferite aspecte de regenerare și remodelare ale acestor materiale biologice.

În cadrul lotului 2 s-a detectat prezența persistenței defectului aplicat în lipsa grefei de implant, totuși la marginile defectului fiind prezente țesuturi neoformate, circumscrise de valul plăcii sau liniei de suprapunere. Elementul tisular neoformat relevând

o rețea vasculară bine conturată (fig. 5).

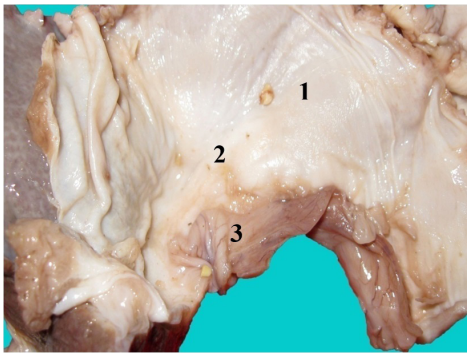


Fig. 5. Hemidiafragm cu defect persistent: 1 – zona fibro-musculară; 2 – frontiere de plagă; 3 – țesutul neoformat. Piesă anatomo-chirurgicală

La nivelul plăcii neoformate, de asemenea, în aria ei, se atestau prezența micilor granuloame cu celule polinucleare gigante (fig. 6). În zona peritoneală s-a atestat prezența ectaziilor vasculare limfatice, mai frecvent la limita sau în apropierea țesutului neoformat. Țesutul celulo-adipos fiind mai edemat (fig. 7), musculatura păstrând un aspect compact fără particularități.

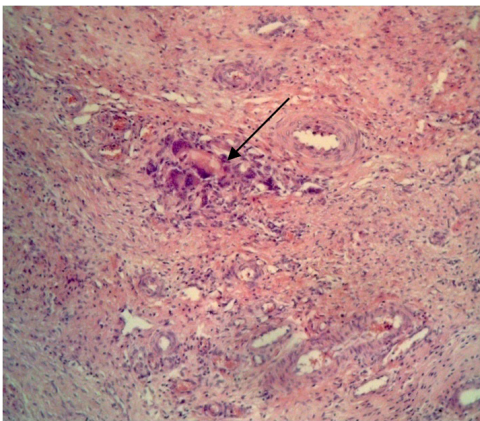


Fig. 6. Granuloame cu simplaste polinucleare gigantocelulare pe parcursul plăcii conjunctiv-vasculare neoformate. x200. Color. H-E

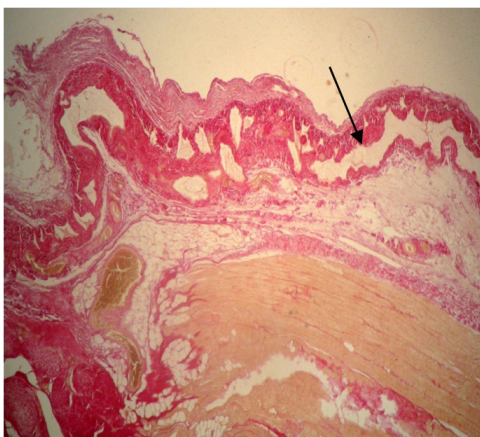


Fig. 7. Ectazie vasculară limfatică la nivelul peritoneal. x75. Color. H-E

Macroscopic în lotul I regiunea tendinoasă a hemidiafragmului supus reconstrucției cu pericard porcine decelularizat era subțire, transparentă și semitransparentă microgranulată sau în platouri spre zona prejoncțională albicioasă intransparentă. În segmentul adiacent s-au atestat joncțiuni fibro-musculare, aderențe cu prezența unei structuri

sangvinolente (fig. 8).

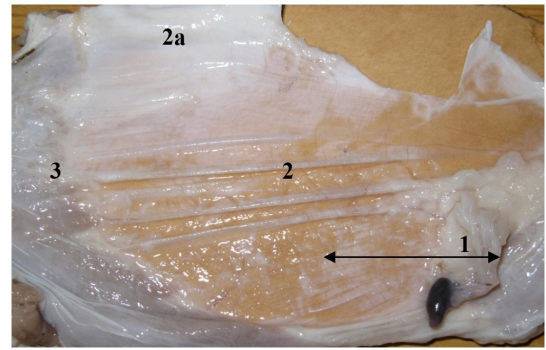


Fig. 8. Lotul 1. Aspect macroscopic al piesei anatomochirurgicale (suprafața peritoneală): 1 – zona cu aglomerări aderențiale la limită cu joncțiunea fibro-musculară; 2 – zona centrală fibroasă; 2a – zona fibroasă mult mai îngroșată; 3 – Joncțiunea fibro-musculară

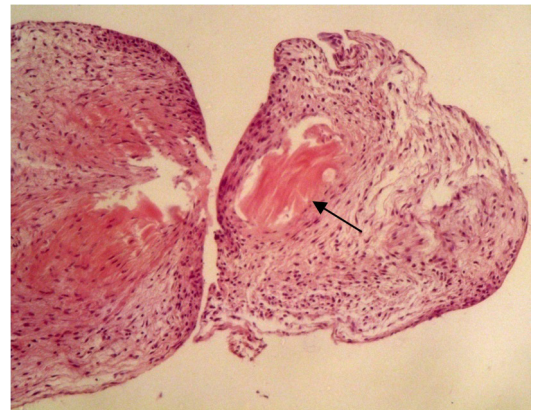


Fig. 9. Țesut aderențial cu incluziuni de material corespunzător greșii decelularizate x150. Color. H-E

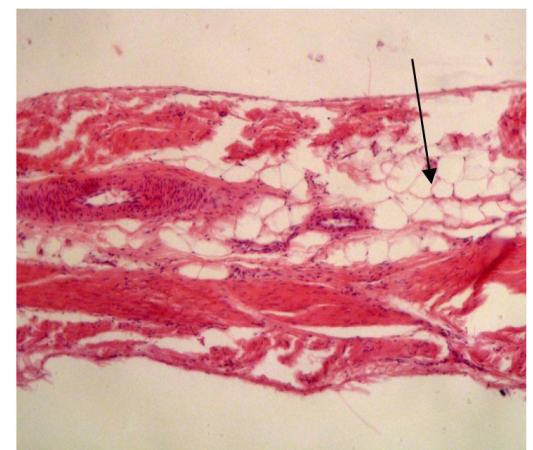


Fig. 10. Placa tendoniană cu abundență de țesut adipos. x150. Color. H-E

În probele din joncțiunea tendonian-musculară, lipsite de aspecte aderențiale, s-a relevat o structură la limita normei, totuși, fiind predominantă de țesutul celulo-adipos, placa tendoniană adiacentă, de asemenea, comparativ cu cea centrală, fiind mai bogată în țesut celulo-adipos (fig. 9,10).

Pe diverse arii, în aria aderențelor, au fost atestate structuri angiomatoase, care s-au marcat ca noduli vasculari angiomatoși, inclusiv în aspect de polip angiomatos, cu vase varicoase secundare cu hemoragie recentă în stromă (fig. 11). Aspectele nodulare fibro-vasculare s-au atestat și în zona perifocală a

aderențelor.

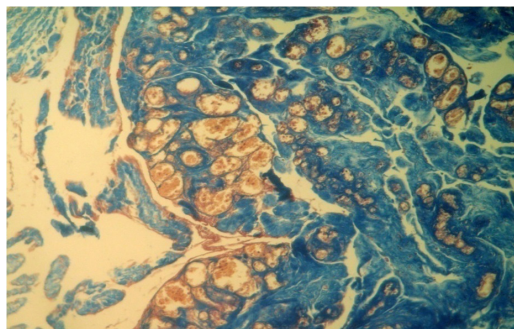


Fig. 11. Conglomerat de aderențe cu rețea vasculară varicoasă angiomatoasă. x 200. Color. după Mason

În lotul 3 cu utilizarea grefei de implant – peritoneu bovin nedecelularizat. Piesa anatomico-chirurgicală a hemidiafragmului supus plastiei, comparativ cu hemidiafragmul din lotul 1, a fost cu mult îngroșată. Suprafața peritoneală a fost cu un aspect catifelat mată-sidefie, zona tendoniană aspectual fiind divizată macroscopic incert în două părți inegale divizate printr-o punte fibro-musculară. Placa tendoniană a relevat o structură fibrilar-fasciculară bine determinată, diferențiată cu o vascularizare corespunzătoare normei. Suprafața peritoneală a fost marcată printr-un strat de țesut conjunctiv neformat mai îngroșat, deosebit de cel preexistent (fig. 12).

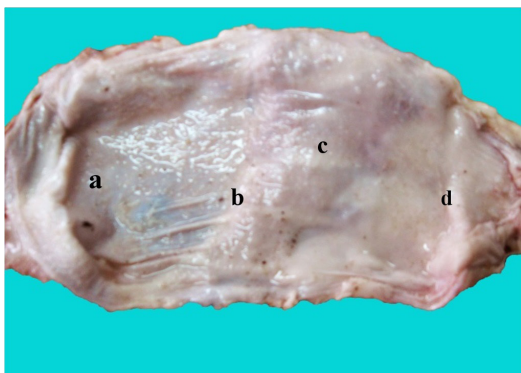


Fig. 12. Piesă anatomico-chirurgicală, suprafața peritoneală a hemidiafragmului: a, b – zonă tendoniană semitransparentă; c – platou fibro-muscular; d – zonă îngroșată intranșantă. x 150. Color. H-E

Examinarea probelor histologice din zonele fibro-musculare au relevat o structură mai mult sau mai puțin cu particularități la limita normei. Segmentul tendonian adiacent, de asemenea, a relevat o structură bine diferențiată, cu prezența microaderențelor la suprafață.

Deși herniile diafragmatice sunt malformații rar întâlnite în structura morbidității copilului [13,20], ele constituie unele din cele mai frecvente patologii chirurgicale ale diafragmului, reprezentând totodată o problemă gravă în chirurgia pediatrică, care creează o mortalitate apreciabilă de 46 – 90% [6,28,30] și circa 3% din mortalitatea neonatală. Aceste malformații grave dețin o incidență de 1 caz la 2300 – 4000 de nașteri [8].

Utilizarea materialelor biologice în repararea defectelor diafragmatice congenitale și dobândite se limitează la serii mici și rapoarte de caz [1]. Janes R.M. (1931) propunea utilizarea grefei autologe de fascia lata în tratamentul herniei diafragmatice posttraumatice, iar în 1968 a fost raportată utilizarea acestei grefe în tratamentul chirurgical al herniei hiatale prin abord

transtoracic, această metodă rămânând actuală și în prezent [3], inclusiv în tratamentul herniei diafragmatice congenitale recurente [24]. Sunt raportate cazuri unice de utilizare a grevelor de dura mater umană, fascia lata și a peritoneului bovin în defectele diafragmatice [2,10,15,21].

Actualmente se depun eforturi considerabile în elaborarea unor modalități alternative de închidere, atât a defectelor diafragmatice congenitale, cât și a celor dobândite [7,22]. Progresele înregistrate în biologia celulelor stem și în ingineria tisulară au determinat crearea mai multor țesuturi bio-ingineresti, care pot fi încorporate în țesuturile-gazdă prin regenerarea țesuturilor naturale, având proprietatea de a crește odată cu pacientul [5,11]. Procesul de decelularizare permite eliminarea celulelor rezistente din țesuturile donatoare cu ajutorul unor tehnologii speciale, în așa mod obținându-se o matrice tridimensională extracelulară cu păstrarea arhitecturii și compoziției biochimice native, inclusiv cu menținerea rețelelor microvasculare, care pot fi recelularizate cu celule noi progenitoare sau compozite. Reducerea drastică a cantității de ADN, epuizarea celulară semnificativă cu păstrarea mai multor proprietăți ale țesutului tratat este un rezultat crucial în metodele de decelularizare, având ca scop evitarea oricărei respingeri imune a grefei [14,23].

Țesutul pericardial a fost folosit de zeci de ani pentru construcția bioprotezei, în special pentru repararea leziunilor cardiace [16]. Pericardul provenit de la animale a fost testat pentru construirea bioprotezelor și au fost obținute rezultate bune prin utilizarea pericardului bovin și porcine [18]. Biomaterialele derivate din pericardul bovin au fost utilizate pe scară largă pentru o varietate de aplicații cardiovasculare, inclusiv pliante cu valvă cardiacă, închidere pericardică, conducte vasculare și plasturi pentru intervenții chirurgicale cardiovasculare și alte intervenții chirurgicale. Deși materialele pericardice tratate cu glutaraldehidă au obținut succese clinice, persistă riscul dezvoltării unor complicații care se datorează unei anumite combinații de degradare, calcificare sau suprainfecția țesutului [9].

Peritoneul porcine este un țesut adecvat pentru producerea membranelor, care va fi utilizat în regenerarea țesuturilor ghidate și regenerarea osoasă ghidată, deoarece structura constă în principal din collagen [17].

Colagenul a fost utilizat în mare măsură în producția de biomateriale și ca vehicul pentru biocompatibilitatea sa și răspunsul imunologic minim. Utilizarea acestei surse abundente, asociată procesării corespunzătoare a acestor țesuturi, poate reprezenta o sursă semnificativă de noi materiale, care pot fi utilizate în ingineria tisulară sau în tehnicile de regenerare [12].

Membrana derivată din colagenul porcine, implantată în țesutul subcutanat al șoarecilor, prezintă o integrare excelentă a țesuturilor, urmată de o vascularizare rapidă până la sfârșitul unei luni, când apare o biodegradare completă, cu o reacție discretă la un corp străin. Această degradare rapidă poate fi explicată prin faptul că această membrană are pori care favorizează degradarea acesteia, deoarece ele îmbunătățesc interacțiunea cu țesutul [25].

Concluzii

1. Grefele decelularizate crioprezervate de peritoneu porcine, utilizate în reconstrucția chirurgicală a defectelor diafragmatice, au o biorezistență redusă cu deteriorarea proprietăților mecanice după perioade scurte de timp, fapt ce determină

dezvoltarea unor complicații grave, comparativ cu grefele de peritoneu bovin prezervat în formaldehidă și pericard porcine decelularizat.

2. Grefele decelularizate crioprezervate de pericard porcine par a avea proprietăți mecanice acceptabile și o biocompatibilitate tisulară superioară față de xenogrefele de peritoneu bovin.

3. Grefele de peritoneu bovin prezervat în formaldehidă

după anumite perioade de timp sunt supuse biodegradării cu pierderea proprietăților biomecanice, totodată determinând dezvoltarea unui proces inflamator regional marcant.

4. Aceste date sugerează necesitatea unor studii suplimentare pe termen lung, care ar avea ca scop perfectarea metodelor de prelucrare a acestor materiale biologice și obținerea unor rezultate mai durabile.

Bibliografie

- Al-Nouri O., Hartman B., Freedman R., Thomas C., Esposito T. Diaphragmatic rupture: Is management with biological mesh feasible? *Int. J. Surg. Case Rep.* 2012. 3:349-53.
- Barlas M., Yagmurlu A., Bingol-Kologlu M., Atasay B. Use of bovine pericardium for congenital absence of left diaphragm. *J. Ankara Med. Sch.* 2003. 25(2):99-102.
- Bjelovic M., Babic T., Spica B., Gunjic D., Veselinovic M., Bascarevi V. The use of autologous fascia lata graft in the laparoscopic reinforcement of large hiatal defect: initial observations of the surgical technique. *BMC Surgery.* 2015. 15:22.
- Borden S., Heiwegen K., van Rooij I., Scharbatke H., Lally P. et al. Bilateral congenital diaphragmatic hernia: prognostic evaluation of a large international cohort. *J. Pediatr. Surg.* 2017. 52:1475-9.
- De Coppi P., Deprest J. Regenerative medicine solutions in congenital diaphragmatic hernia. *Semin. Pediatr. Surg.* 2017. 26:171-7.
- Downard C., Jaksic T., Garza J. et al. Analysis of an improved survival rate for congenital diaphragmatic hernia. *J. of Pediatric Surgery.* 2003. 38: 729-732.
- Gander J.W., Fisher J.C., Gross E.R., Reichstein A.R., Cowles R.A. et al. Early recurrence of congenital diaphragmatic hernia is higher after thoracoscopic than open repair: a single institutional study. *J. Pediatr. Surg.* 2011. 46:1303-8.
- Gheorghiu Natalia, Eva Gudumac. Opțiuni diagnostice și terapeutice în hernia diafragmatică strangulată la copii. // *Anale științifice ACPU.* 2002. P.7
- Hilbert S.L., Ferrans V. J., McAllister H.A., and Cooley D. A., "Ionescu-Shiley bovine pericardial bio- prostheses: Histological and ultrastructural studies," *Am. Pathol.*, 140, 1195-1204 (1992).
- Hutson J.M., Azmy A.F. Preserved dura and pericardium for closure of large abdominal wall and diaphragmatic defects in children. *Ann. Royal Coll. Surg. Engl.* 1985. 67:107-8
- Jawaid W.B., Qasem E., Jones M.O., Shaw N.J., Losty P.D.. Outcomes following prosthetic patch repair in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Br. J. Surg.* 2013. 100:1833-7.
- Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2003;27(5):354-66.
- Leung J., Coakley F., Hricak H. et al. Prenatal MR Imaging of Congenital Diaphragmatic Hernia. *AJR* 2000. 174:1607-1612.
- Liao G.P., Choi Y., Vojnits K., Xue H., Aroom K. et al. Tissue engineering to repair diaphragmatic defect in a rat model. *Stem Cells Int.* 2017. Art. ID 1764523. 12 pag. <https://doi.org/10.1155/2017/1764523>.
- Loff S., Wirth H., Jester I., et al. Implantation of a cone-shaped double-fixed patch increases abdominal space and prevents recurrence of large defects in congenital diaphragmatic hernia. *J. Pediatr. Surg.* 2005. 40:1701-5.
- Olmos Z.R., Jasso V.R., Sotres V.A., Cedillo L.I., Arreola R.J.L., Gaxiola G.M. (1997) Utilidad del pericardio bovino tratado con glutaraldeido en las resecciones pulmonares no anatómicas en perros. *Ver Inst Nal Enf Resp Mex* 10:155-159.
- Paolantonio M, Scarano A, Di Placido G, Tumini V, D'Archivio D, Piattelli A. Periodontal healing in humans using anorganic bovine bone and bovine peritoneum-derived collagen membrane: a clinical and histologic case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21(5):505-15.23. Piccoli M., Urbani L., Alvarez-Fallas M.E., Franzin C., Dedja A. et al. Improvement of diaphragmatic performance through orthotopic application of decellularized extracellular matrix patch. *Biomaterials.* 2016. 74:245-55.
- Pires A.C., Saporito W.F., Leao L.E.V. (1997) Pericardio bovino utilizado como remendo no sistema cardiovascular. *Ver Bras Cir Cardivasc* 12:176-187.
- Puligandla P.S., Grabowski J., Austin M., Hedrick H., Renaud E. et al. Management of congenital diaphragmatic hernia: A systematic review from the APSA outcomes and evidence based practice committee. *J. Pediatr. Surg.* 2015. 50:1958-70.
- Rakotoarisoa B., Andriason F., Rakotovoao T. et al. A propos d'un cas traité d'une hernie diaphragmatique congénitale droite chez un nourrisson malgache. *Medicine d'Afrique Noire.* 2001. 48 (7) : 329 – 331.4
- Ricci K.B., Higgins R., Daniels V.C., Kilic A. Bovine pericardial reconstruction of the diaphragm after heart transplant. *Exp. Clin. Transplant.* 2014. 12(3):277-8.
- Shieh H.F., Graham C.D., Brazzo J.A., Zurakowski D., Fauza D.O. Comparisons of human amniotic mesenchymal stem cell viability in FDA-approved collagen-based scaffolds: Implications for engineered diaphragmatic replacement. *J. Pediatr. Surg.* 2017. 52:1010-3
- Solli P, Bertolaccini L, Brandolini J, Pardolesi A. Reconstructive techniques after diaphragm resection and use of the diaphragmatic flap in thoracic surgery. *Shanghai Chest.* 2017. 1:21. doi: 10.21037/shc.2017.08.04
- Sugiyama A., Fukumoto K., Fukuzawa H., Watanabe K., Mitsunaga M., Park S., Urushihara N. Free fascia lata repair for a second recurrent congenital diaphragmatic hernia. *J. Pediatr. Surg.* 2011. 46(9):1838-41.
- Unsal B, Kurtis B, Ozcan G, Ozdemir A, Karaöz E. An investigation of resorption and tissue reaction after subcutaneous implantation of collagen based membrane materials in rats. *J Marmara Univ Dent Fac.* 1997;2(4):609-15.
- Zani A., Zani-Ruttenstock E., Pierro A. Advances in the surgical approach to congenital diaphragmatic hernia. *Semin. Fetal & Neonat. Med.* 2014. 19:364-9.
- Zhao W., Ju Y.M., Christ G., Atala A., Too J.L., Lee S.J. Diaphragmatic muscle reconstruction with an aligned electrospun poly(ε-caprolactone)/collagen hybrid scaffold. *Biomaterials.* 2013. 34:8235-40.
- Иванов С.Л. Врожденная диафрагмальная грыжа. Интенсивная терапия. 2005. №2. www.ICJ.ru. 29. Исаков Ю.Ф., Степанов Э.А., Красовская Т.В. Абдоминальная хирургия у детей. *М.Мед.* 1988. С.60 – 83.
- Степанов Э.А., Красовская Т.В., Кучеров Ю.И. и др. Оптимальные сроки оперативного вмешательства при диафрагмальных грыжах. *Дет.хир.* 2002. №2. С.28 – 30.