

# Đánh giá hàm lượng nước và khả năng tái hấp thu nước của xương đông khô sau xử lý đông khô tại Đơn vị Bảo quản Tế bào và Mô, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

Nguyễn Phạm Phước Toàn<sup>1,2</sup>, Nguyễn Phan Quỳnh Anh<sup>1,2</sup>, Trần Anh Hùng<sup>1,2</sup>,  
Võ Thị Hạnh Thảo<sup>1,2</sup>, Lê Nghi Thành Nhân<sup>3,4</sup>, Nguyễn Phương Thảo Tiên<sup>1,2\*</sup>

(1) Bộ môn Mô Phôi, Giải phẫu bệnh và Pháp Y, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Đơn vị Bảo quản Tế bào và Mô, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

(3) Bộ môn Ngoại, Trường Đại học Y - Dược Huế, Đại học Huế

(4) Khoa Ngoại Chấn thương Chính hình, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Xương đông khô được xem như là một vật liệu tiềm năng trong việc ghép xương để điều trị các khuyết tật nha chu và tương lai hướng đến các điều trị các khuyết hổng lớn trong chấn thương chỉnh hình và cột sống. Những nghiên cứu ngoài nước đã tiến hành nghiên cứu so sánh hiệu quả tái tạo xương giữa xương đông khô với các loại xương khác cũng như các loại vật liệu ghép khác nhau và đã cho thấy hiệu quả vượt trội trong việc tái tạo xương sau quá trình ghép của xương đông khô. Tại Việt Nam, hiện vẫn còn rất ít công trình nghiên cứu về chất lượng xương đông khô. Nghiên cứu nhằm đánh giá hàm lượng nước và khả năng tái hấp thu nước của xương đông khô sau các khoảng thời gian bảo quản. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện trên 30 chỏm xương đùi của các bệnh nhân hiến tặng sau phẫu thuật thay chỏm tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. Mỗi chỏm xương đùi được chia thành các xương xấp nhỏ có kích thước 10 x 10 x 10 mm. Chia nhóm, tiến hành đông khô trong 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ và bảo quản ở nhiệt độ phòng tại Đơn vị Bảo quản Tế bào và Mô, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế. Rã đông sau 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng và cho tái hấp thu nước trong các khoảng thời gian 5 phút, 10 phút, 20 phút. **Kết quả:** Kết quả cho thấy 100% các khối xương xấp sau khi được xử lý đông khô đều đạt được phần trăm hàm lượng nước dưới 6% sau 3 giờ. Không có sự khác biệt về hàm lượng nước trong xương đông khô sau các khoảng thời gian bảo quản 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng. Hàm lượng nước trong xương đông khô đạt xấp xỉ hàm lượng nước trong xương ban đầu (xương tươi) sau thời gian tái hấp thu nước 10 phút. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm xương đông khô được tái hấp thu nước 10 phút và nhóm được tái hấp thu 20 phút. **Kết luận:** Hàm lượng nước trong các khối xương xấp có kích thước 10 x 10 x 10 mm đạt dưới 6% sau 3 giờ đông khô. Sau đông khô, xương có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng và thời gian xương đông khô tái hấp thu nước 10 phút là tối ưu để đảm bảo chất lượng của khối xương ghép.

**Từ khóa:** xương đông khô, hàm lượng nước, tái hấp thu nước.

## Abstract

# Evaluate the water content and rehydration of freeze-dried bone after freeze-drying process at Cell and Tissue Cryopreservation Unit, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

Nguyen Pham Phuoc Toan<sup>1,2</sup>, Nguyen Phan Quynh Anh<sup>1,2</sup>, Tran Anh Hung<sup>1,2</sup>,  
Vo Thi Hanh Thao<sup>1,2</sup>, Le Nghi Thanh Nhan<sup>3,4</sup>, Nguyen Phuong Thao Tien<sup>1,2\*</sup>

(1) Dept. of Histology, Embryology, Pathology and Forensic Medicine,  
Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Cells and Tissue Cryopreservation Unit, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

(3) Department of Surgery, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(4) Department of Orthopedics and Trauma Surgery, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital

**Background:** Freeze-dried bone is considered as a potential material in the treatment of periodontal defects and the future is directed towards the treatment of major defects in orthopedic and spine trauma. Studies abroad have conducted studies comparing the efficiency of bone regeneration between freeze-dried

Tác giả liên hệ: Nguyễn Phương Thảo Tiên - Email: npttien@huemed-univ.edu.vn  
Ngày nhận bài: 25/8/2023; Ngày đồng ý đăng: 15/10/2023; Ngày xuất bản: 4/11/2023

bone with other types of bone as well as different types of graft materials and have shown outstanding efficiency in bone regeneration after surgery. In Vietnam, there are still very few studies on freeze-dried bone quality. **Objectives:** Evaluate the water content and rehydration of freeze-dried bones after storage. **Materials and methods:** Study on 30 femoral heads of donor patients after bone replacement surgery at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. Each femoral head was divided into small bones cubes 10 x 10 x 10 mm. Divided into groups, freeze-dried for 2 hours, 3 hours, 4 hours and room temperature storage at the Cell and Tissue Cryopreservation Unit, Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. Defrosting bones cubes after 3 months, 6 months, 9 months and rehydration in 5 minutes, 10 minutes and 15 minutes. **Result:** The results showed that 100% of samples after freeze-drying had the percentage of water content below 6% after 3 hours. There was no difference in water content of freeze-dried bone after periods of 3 months, 6 months and 9 months storage. The water content in freeze-dried bone reached approximately the water content in the original bone (fresh bone) after 10 minutes rehydration. There was no statistically significant difference in rehydration time between the freeze-dried bone in 10 minutes group and 20 minutes group. **Conclusions:** The water content in bone cubes 10 x10 x10 mm reached less than 6% after 3 hours of freeze-drying. After freeze-drying, bone can be preserved at room temperature and rehydration in 10 minutes was optimal to ensure the quality of the bone graft.

**Keyword:** Freeze-dried bone, water content, rehydration.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xương đông khô là xương được khử nước trong môi trường chân không ở nhiệt độ thấp. Trong hai thập kỷ qua, xương đông khô được sử dụng phổ biến trong phẫu thuật hàm mặt và chấn thương chỉnh hình. Hiệu quả của xương đông khô đã được chứng minh trong việc tái tạo xương trong các điều trị khuyết hổng xương [1]. Hiện nay, xương đông khô tiếp tục được sử dụng rộng rãi trong các lĩnh vực điều trị khuyết hổng xương vùng mặt, phẫu thuật chấn thương chỉnh hình trong ngoại khoa, phẫu thuật cột sống...[2]. Xương đông khô có nhiều ưu điểm vượt trội hơn các loại xương khác như dễ dàng bảo quản, lưu trữ lâu hơn, không có tính kích thích nơi nhận (hạn chế thải ghép), hạn chế nhiễm trùng, và vẫn đảm bảo chất lượng xương sau xử lý, đặc biệt có thể đáp ứng được nhu cầu ghép xương rất lớn trong điều trị, nhất là những khuyết hổng xương lớn.

Nước đóng một vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến tính chất vật lý và sinh học của mô. Do đó việc giảm hàm lượng nước trong mô có thể thay đổi cấu trúc và mật độ của mô. Quá trình đông khô xương, cũng như tái hấp thu nước trong thời gian phù hợp sẽ không ảnh hưởng đáng kể đến tính chất cơ học cũng như cấu trúc vi thể của xương [3].

Xương đông khô được xem như là một vật liệu tiềm năng trong điều trị các khuyết hổng xương. Việc đánh giá chất lượng xương sau đông khô rất quan trọng, góp phần đảm bảo sự thành công trong quá trình điều trị. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định thời gian đông khô, bảo quản và tái hấp thu nước tối ưu để đảm bảo chất lượng mảnh xương đông khô ghép đồng loại.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Cỡ mẫu: 140 khối xương xốp khối xương xốp hình lập phương có kích thước 10 x 10 x 10mm (thể tích 1cm<sup>3</sup>) được cưa ra từ 30 chỏm xương đùi của các bệnh nhân hiến tặng sau phẫu thuật thay khớp háng tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế, bao gồm:

- Mục tiêu 1: n= 50 khối xương

- Mục tiêu 2: n= 90 khối xương

- Thời gian nghiên cứu: từ 07/2021 đến 07/2022

### - Tiêu chuẩn chọn bệnh:

Chỏm xương đùi hiến tặng của các bệnh nhân sau phẫu thuật thay khớp háng, đáp ứng tiêu chuẩn lấy mô của Hiệp Hội Ngân hàng Mô Hoa Kỳ (AATB), có các xét nghiệm HIV, HbsAg âm tính và đồng ý tham gia nghiên cứu

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm

### 2.2.2. Tiến hành nghiên cứu:

- Nghiên cứu được tiến hành tại Đơn vị Bảo quản Tế bào và Mô, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế.

- Thu thập các chỏm xương đùi của các bệnh nhân sau phẫu thuật thay khớp háng.

- Tiến hành loại bỏ sụn và mô liên kết phần chỏm xương đùi. Mỗi chỏm xương đùi được cưa thành các khối xương xốp nhỏ hình lập phương, mỗi khối có kích thước 10 x 10 x 10 mm (thể tích 1 cm<sup>3</sup>). Rửa khối xương xốp trong oxy già 10% để làm sạch xương và tẩy mỡ. Rửa lại nhiều lần bằng nước muối sinh lý trong máy rửa siêu âm ở nhiệt độ 37°C [4].

- Mục tiêu 1 (n = 50)

- Lấy 50 khối xương chia thành 4 nhóm, gồm 1 nhóm chứng (xương tươi) (n = 5) không đông khô và 3 nhóm còn lại (mỗi nhóm có n = 15) được đông khô bằng máy đông khô chuyên dụng SCANVAC Coolsafe TM (Đan Mạch) ở nhiệt độ -56°C, áp suất 0.05 mBar trong 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ, theo thứ tự.

- Tiến hành đo hàm lượng nước bằng máy đo hàm ẩm AND MX-50 của Nhật Bản ở 100°C dựa trên phương pháp trọng lượng (gravimetric method) ở nhóm chứng và các nhóm còn lại sau các khoảng thời gian đông khô [5].



Hình 1: Các khối xương xốp thể tích 1cm<sup>3</sup>

\* Mục tiêu 2 (n = 90)

- Lấy 90 khối xương còn lại, đông khô bằng máy đông khô chuyên dụng SCANVAC Coolsafe TM ở nhiệt độ -56°C, áp suất 0,05 mBar trong 3 giờ. Sau thời gian đông khô, 90 khối xương được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm (n = 30) được bảo quản ở nhiệt độ phòng sau các khoảng thời gian 3 tháng, 6 tháng và 9 tháng, theo thứ tự.

- Sau các khoảng thời gian bảo quản, nhóm bảo quản 3 tháng sẽ được chia thành 4 nhóm, gồm 1 nhóm chứng (n = 6) không ngâm vào dung dịch NaCl 0,9% và 3 nhóm còn lại (n = 8), lần lượt mỗi nhóm được ngâm vào dung dịch NaCl 0,9% trong các khoảng thời gian 5 phút, 10 phút, 20 phút [3].

- Tiến hành đo hàm lượng nước bằng máy đo hàm ẩm AND MX-50 của Nhật Bản ở 100°C dựa trên phương pháp trọng lượng (gravimetric method) ở nhóm chứng và các nhóm còn lại.

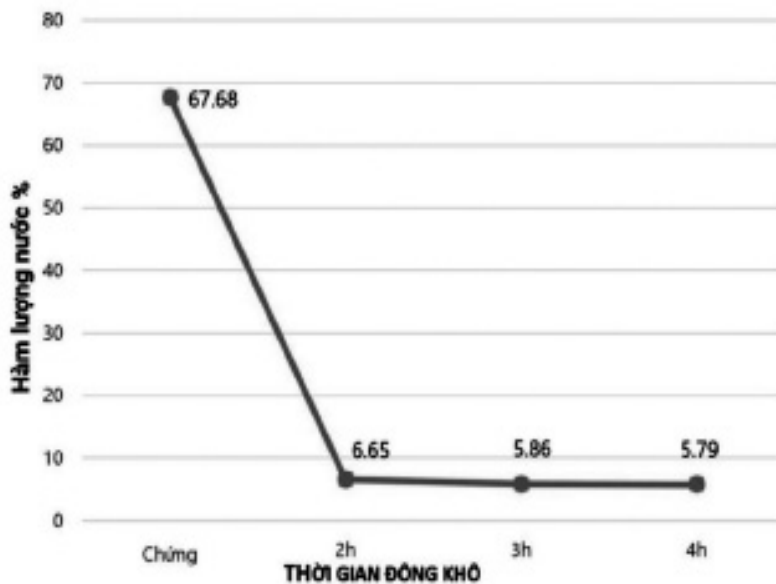
- Thực nghiệm lặp lại tương tự với nhóm xương đông khô sau thời gian bảo quản 6 tháng và 9 tháng.

### 2.2.2 Phân tích số liệu

- Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Đánh giá lượng nước có trong xương sau các khoảng thời gian đông khô



**Biểu đồ 1.** Hàm lượng nước trung bình có trong 1cm<sup>3</sup> xương qua các khoảng thời gian đông khô

Kết quả cho thấy hàm lượng nước trong khối xương 1cm<sup>3</sup> ban đầu (chứng- xương tươi) là 67,68%. Sau thời gian đông khô 3 giờ, hàm lượng nước trung bình trong các khối xương giảm còn 5,68%. Ở nhóm xương đông khô kéo dài trong 4 giờ, hàm lượng nước trong khối xương tiếp tục giảm nhưng không đáng kể (5,86% vs 5,79%).

### 3.2. Đánh giá sự tái hấp thu nước của xương đông khô sau các khoảng thời gian bảo quản

**Bảng 1.** Hàm lượng nước trung bình có trong 1cm<sup>3</sup> xương sau các thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản	Hàm lượng nước ( $\bar{X} \pm SD$ )	P
0 tháng (Nhóm chứng)	5,86 ± 0,10	
3 tháng	5,81 ± 0,15	> 0,05
6 tháng	5,83 ± 0,09	> 0,05
9 tháng	5,89 ± 0,12	> 0,05

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng nước trong các khối xương đông khô thay đổi không đáng kể sau thời gian bảo quản 3 tháng, 6 tháng và 9 tháng so với trước bảo quản. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 2.** Hàm lượng nước trung bình có trong 1cm<sup>3</sup> xương sau thời gian tái hấp thu nước

Nhóm	Thời gian tái hấp thu	0 phút		5 phút		10 phút		20 phút	
		Hàm lượng nước (xương tươi) ( $\bar{X} \pm SD$ )	P	Hàm lượng nước ( $\bar{X} \pm SD$ )	P	Hàm lượng nước ( $\bar{X} \pm SD$ )	P	Hàm lượng nước ( $\bar{X} \pm SD$ )	P
Bảo quản 3 tháng				50,02 ± 0,18	< 0,05	67,49 ± 0,14	> 0,05	67,51 ± 0,16	> 0,05
Bảo quản 6 tháng		67,68 ± 0,12		50,16 ± 0,11	< 0,05	67,40 ± 0,13	> 0,05	67,09 ± 0,21	> 0,05
Bảo quản 9 tháng				51,23 ± 0,13	< 0,05	67,39 ± 0,25	> 0,05	67,42 ± 0,20	> 0,05

Kết quả nghiên cứu cho thấy: ở nhóm xương đông khô bảo quản 3 tháng, tái hấp thu nước trong 5 phút, các khối xương đạt được hàm lượng nước thấp hơn rất nhiều so với hàm lượng nước có trong xương ban đầu (xương tươi), 50,02% vs 67,68%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Xương đông khô được tái hấp thu nước trong 10 phút đạt được hàm lượng nước như ban đầu (xương tươi), 67,49% vs 67,68%. Hàm lượng nước trong xương không có sự khác biệt đáng kể so với nhóm xương đông khô được tái hấp thu trong 20 phút ( $p > 0,05$ ). Nghiên cứu cũng cho thấy các kết quả tương tự về hàm lượng nước trong xương đông khô ở nhóm xương bảo quản 6 tháng và 9 tháng.

#### 4. BÀN LUẬN

Nước đóng một vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến tính chất vật lý và sinh học của mô. Do đó việc giảm hàm lượng nước trong mô có thể thay đổi cấu trúc và mật độ của mô. Đông khô là phương pháp khử nước để làm khô mô trong môi trường đông lạnh. Nhiệt độ thấp làm giảm thiểu những phản ứng không mong muốn thường xảy ra trong các quy trình khử nước khác và mẫu đông lạnh được sấy khô trong chân không bởi sự thăng hoa của nước [6].

Xương đông khô là xương được làm khô bằng phương pháp khử nước trong môi trường đông lạnh, giúp loại bỏ nước mà không có hoặc có ảnh hưởng tối thiểu đến độ bền và độ uốn của xương [3], [5]. Theo Hiệp hội ngân hàng mô Mỹ (AATB), tiêu chuẩn hàm lượng nước trong xương phải giảm dưới 6% nhằm mục đích bảo quản lâu dài [7]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, lượng nước trong khối xương 1cm<sup>3</sup> ban đầu là 67,68%. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng sau các khoảng thời gian đông khô, lượng nước trong xương giảm nhiều nhất là trong vòng 2 giờ đầu

tiên (6,65% vs 67,68%). Sau thời gian 3 giờ, lượng nước trung bình còn lại trong xương là 5,86%. Theo Elin Törnquist, hầu hết lượng nước thực sự đã bị mất trong 3 giờ đầu tiên và chỉ ra rằng việc sấy khô trong 3 giờ không ảnh hưởng đáng kể đến tính chất cơ học của xương [3]. Trong khi theo nghiên cứu của Ariffin AA, xương xốp chỉ cần 1,75 đến 2,0 giờ đông khô để giảm hàm lượng nước dưới 6% [5]. Sự khác biệt này có thể phụ thuộc vào kích thước và cấu trúc của xương [5].

Quá trình tái hấp nước có thể làm cải thiện đáng kể các đặc tính cơ sinh học, cụ thể là độ bền và độ uốn của xương [8],[9]. Trong nghiên cứu này, hàm lượng nước trong các khối xương đông khô tăng lên và đạt được xấp xỉ hàm lượng nước ban đầu sau thời gian tái hấp thu 10 phút. Không có sự thay đổi đáng kể nào về hàm lượng nước được tái hấp thu sau 10 phút, và 20 phút ( $p > 0,05$ ). Đồng thời theo Andreas Pabst, các đặc tính cơ sinh học, đặc biệt là độ bền và độ uốn của xương có thể được cải thiện đáng kể nếu xương được tái hấp nước trước phẫu thuật, bằng

cách ngâm trong dung dịch nước muối sinh lý trong 10 phút [8], [9]. Các nghiên cứu của Adrian Kasaj và Marco C Bottino cũng cho thấy rằng có những thay đổi lớn về đặc tính cơ sinh học của mảnh ghép khi thời gian tái hấp thu nước tăng lên, điều này cũng được xác nhận về mặt cấu trúc bằng các phân tích hóa lý. Do đó, thời gian tái hấp nước 10 phút không chỉ đảm bảo tính chất cơ sinh học của xương tốt hơn mà quan trọng nhất là tạo ra vật liệu xương ghép có các đặc tính gần giống với mô xương tự nhiên [8],[10]. Các bác sĩ lâm sàng khi sử dụng xương đông khô để ghép cần phải nắm rõ thời gian tái hấp thu nước theo phác đồ của nhà sản xuất để tránh việc thay đổi đáng kể về các đặc tính cơ học và hóa lý. Như vậy, việc ngâm xương đông khô trong dung dịch NaCl 0,9% trong 10 phút trước khi ghép vừa đảm bảo hàm lượng nước trong xương vừa đảm bảo các đặc tính cơ sinh học của mô xương.

Mô ghép đồng loại đông lạnh phải được bảo quản ở nhiệt độ cực thấp để duy trì khả năng tồn tại của chúng. Nhiệt độ đông lạnh cực thấp từ -20°C đến -39°C thường cho phép thời hạn sử dụng của mô ghép là 6 tháng, trong khi -40°C đến -86°C cho phép thời hạn sử dụng lâu hơn, lên đến 5 năm [7]. Các loại mô khác nhau sẽ có những phương pháp bảo quản khác nhau và có thể sử dụng chất bảo quản hoặc không. Mục đích của việc sử dụng chất bảo quản lạnh

là để ngăn tế bào chết trong quá trình đông lạnh và rã đông. Tuy nhiên, đối với xương đông khô chỉ cần bảo quản ở nhiệt độ phòng, không cần thiết bị hiện đại nào, không cần thêm dung dịch bảo quản phức tạp. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, hàm lượng nước trong xương đông khô không có sự thay đổi đáng kể khi bảo quản ở các khoảng thời gian lâu hơn (3 tháng, 6 tháng, 9 tháng). Theo Hướng dẫn của Trung tâm Cấy ghép Quốc gia Ý, xương đông khô được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong thời gian tối đa là 5 năm. Do đó, xương đông khô ngày càng được sử dụng rộng rãi do sự hiệu quả và tính tiện lợi của nó [11].

## 5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu thực nghiệm 140 khối xương xốp hình lập phương có kích thước 10 x 10 x 10 mm tại Đơn vị Bảo quản Tế bào và Mô, Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược Huế, chúng tôi nhận thấy:

- 100% mẫu xương sau khi được xử lý đông khô trong 3 giờ đều đạt được phần trăm hàm lượng nước dưới 6%.

- Ở cả 3 nhóm xương đông khô được bảo quản ở nhiệt độ phòng sau 3, 6, 9 tháng, hàm lượng nước trong xương thay đổi không đáng kể. Thời gian để xương đông khô tái hấp thu nước tối ưu là 10 phút để đảm bảo hàm lượng nước trong xương như ban đầu (xương tươi).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bodner L. Effect of decalcified freeze-dried bone allograft on the healing of jaw defects after cyst enucleation. *J Oral Maxillofac Surg.*1996;54(11):1282-6.
2. Caltran M, Savornin C, Le Couteur P, Jouan P, Deroche P, Vinceneux JF, et al. Use of freeze-dried bone allografts in revision total hip arthroplasty. *Eur J Orthop Surg Traumatol.*2002;12(4):186-91.
3. N.T.Chuyên (2016). Biến đổi cấu trúc và khả năng dung nạp sau ghép đồng loại xương tươi, đông khô và bảo quản lạnh sâu trên thực nghiệm. [Luận văn thạc sĩ]. Trường Đại học Y Hà Nội.2016,5-31.
4. Ariffin AA, Chan HH, Yusof N, Mohd S, Ramalingam S, Ng WM, Mansor A. Establishing freeze drying process for cortical and cancellous bone allograft cubes. *Original Jummec.*2019;10(2):125-80.
5. Pabst A, Ackermann M, Thiem D, Kämmerer P. Influence of Different Rehydration Protocols on Biomechanical Properties of Allogeneic Cortical Bone Plates: A Combined in-vitro/in-vivo Study. *J Investig Surg.*2021;34(10):1158-64.
6. Iturria M, Rodríguez Emmenegger C, Viegas R, Zeballos J, Wodowoz O, Álvarez I, et al. Basic design of lyophilization protocol for human bone tissues. *Latin*

*American Applied Research.*2010;11(3):184-90.

7. American Association of Tissue Banks (AATB). Standards for Tissue Banking 14th. 2016;2012-3. Available from: <http://www.aatb.org/AATB-Standards-for-Tissue-Banking>.

8. Kasaj A, Levin L, Stratul SI, Götz H, Schlee M, Rütters CB, et al. The influence of various rehydration protocols on biomechanical properties of different acellular tissue matrices. *Clin Oral Investig.* 2016;20(6):1303-15.

9. Pabst A, Ackermann M, Thiem D, Kämmerer P. Influence of Different Rehydration Protocols on Biomechanical Properties of Allogeneic Cortical Bone Plates: A Combined in-vitro/in-vivo Study. *J Investig Surg.* 2021;34(10):1158-64.

10. Bottino MC, Jose M V., Thomas V, Dean DR, Janowski GM. Freeze-dried acellular dermal matrix graft: Effects of rehydration on physical, chemical, and mechanical properties. *Dent Mater.* 2009;25(9):1109-15.

11. Tissues Banks in Italy. [27 January 2020]. Available online: <http://www.trapianti.salute.gov.it/trapianti/dettaglioContenutiCnt.sp?lingua=italiano&area=cnt&menu=chiSiamo&sottomenu=rete&id=237>.