

УДК 616.71-089.844:57.086.13

I.I. Irsan*, С.П.П. Ісма, І. Віваюна, Е. Норахмаваті,
В.П. Сукмаджая, Р.А.Х. Пандіанган, М. Абдух

Вживання клітин кісткової тканини після заморожування в рідкому азоті: чи грає роль час?

UDC 616.71-089.844:57.086.13

I.I. Irsan*, S. P. P. Isma, I. Vivayuna, E. Norahmawati,
W. P. Sukmajaya, R. A. H. Pandiangan, M. Abduh

Bone Cells Survival After Liquid Nitrogen Freezing: Does Time Play a Role?

Ключові слова: кістковий трансплантат, рідкий азот, остеоцит, остеобласт, остеокласт.

Key words: bone graft; liquid nitrogen; osteocyte; osteoblast; osteoclast.

Кісткова пластика – поширена процедура, спрямована на заміщення кісткового дефекту, який виник у результаті перелому, незрощення або резекції пухлини. У кістковій пластичці доступні для використання різні матеріали: від аутологічної кістки, алотрансплантата до ксенотрансплантата (бичачі кістки, корали, зуб акули) [5].

Аутоотрансплантат залишається золотим стандартом, але його використання ускладнене через обмежену доступність і ураженість донорської ділянки, тому часто застосовують алотрансплантат. Однак і його використання може викликати певні ускладнення, зокрема передачу інфекційних захворювань та імунну відповідь [6].

Одним зі способів зниження імуногенності алотрансплантата є зменшення вмісту живих клітин у трансплантаті, з цією метою для заморожування може застосовуватися рідкий азот. Така процедура спрямована на збереження структури кісткової тканини і зниження її здатності викликати імунну реакцію [8]. Більш того, низька температура також використовується для зберігання кісткової тканини в банках кісткових тканин для подальшої трансплантації в ортопедії [2].

За даними авторів на сьогодні відсутні дослідження щодо оцінки життєздатності остеогенних клітин і остеокластів у девіталізованій кістковій тканині після заморожування в рідкому азоті.

Bone grafting is a common procedure aiming to restore a bone defect resulting from fracture, non-union, or tumor resection. There are various materials available to use in bone grafting, ranging from autologous bone, allograft, or xenograft (bovine bones, corals, shark tooth) [5].

Autograft remains the gold standard, but its use is complicated by the limited availability and the morbidity to the donor site; thus, the use of allograft is often required. Allograft, however, still poses some possible complications, including the transmission of infectious disease and immunogenic response [6].

One way to reduce the immunogenicity of the allograft is by lowering the content of living cells in the graft; liquid nitrogen (LN2) freezing may be useful for this purpose. The aim of this procedure is to preserve the structural bone tissue and reduce its capacity to induce immunogenic reaction [8]. Moreover, low temperature is also useful to store bone tissue for grafting purposes in the orthopaedic bone banks [2].

To the authors' knowledge, there is currently no study evaluating the viability of osteogenic cells and osteoclast in the devitalized bone tissue after LN2 freezing technique. Thus, this study aims to evaluate the effect of LN2 freezing on osteoblast, osteocyte, and osteoclast cell count in rat bones.

This experimental study was conducted in the Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang,

Університет Бравіджая, Лікарня загального профілю доктора Сайфул Анвара, Маланг, Східна Ява, Індонезія

Brawijaya University, Saiful Anwar General Hospital, Malang, East Java, Indonesia

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Дж.Л. Джакса Агунг Супрапто, 2, м. Маланг, Східна Ява, Індонезія 65111;
тел.: (+62 816) 429-70-26
електронна пошта: istan_irmansyah@yahoo.com

***To whom correspondence should be addressed:**

2, Jl. Jaksas Agung Suprpto, Malang, East Java, Indonesia 65111;
tel.: +62 816 429 7026
e-mail: istan_irmansyah@yahoo.com

Надійшла 15.08.2019

Прийнята до друку 08.02.2021

Received August, 15, 2019

Accepted February, 08, 2021

© 2021 I.I. Irsan, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Мета роботи – оцінка впливу заморожування в рідкому азоті на кількість остеобластів, остеоцитів і остеокластів у кістках щурів.

Експериментальне дослідження проводилося на базі медичного факультету Університету Бравіджая (м. Маланг, Індонезія) з лютого по березень 2019 року. Взяті у тварин зразки обробляли в Лабораторії паразитології медичного факультету Університету Бравіджая. Кількість остеоцитів, остеобластів і остеокластів визначали в Лабораторії патології медичного факультету Університету Бравіджая.

Експерименти дозволені експертною радою на підставі рішення Етичної комісії з університету Бравіджая (етичний дозвіл № 69 / EC / KEPK-PPDS / 02/2019).

Дослідження виконували на 24 щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) лінії Вістар. Тримісячний вік тварин і маса 180–200 г були критеріями включення до експерименту, з дослідів виключали тварин із будь-якими порушеннями здоров'я, зокрема пов'язаними з вадами кісток. Критерієм вибування з експерименту була смерть щурів у період акліматизації.

Щурів утримували в контрольованих умовах з 12-годинним циклом світло/темрява за температури 23,6°C на стандартній дієті з вільним доступом до води. Через сім діб тварин виводили з експерименту декапітацією і витягували стегнові кістки.

Зразки кісток поділяли на п'ять груп: контрольна група ($n = 4$), група F1 (1-хвилинне заморожування в рідкому азоті, $n = 5$), група F2 (2-хвилинне заморожування в рідкому азоті, $n = 5$), група F3 (4-хвилинне заморожування в рідкому азоті, $n = 5$) і група F4 (8-хвилинне заморожування в рідкому азоті, $n = 5$). Рідкий азот отримували в фармакологічному відділенні лікарні загального профілю доктора Сайфула Анвара (м. Маланг, Індонезія). Одержані зразки кісток занурювали в рідкий азот на фіксований час. Після цього їх діставали та розморожували протягом 20 хв за кімнатної температури.

Стегнові кістки спочатку обробляли 10%-м формальдегідом, а потім декальцинованим 5%-м розчином азотної кислоти протягом семи діб. Після цього зразки зневоднювали послідовним проведенням через спирт із різними концентраціями (70, 80, 90, 95, 99 і 100%) протягом години з використанням кожного розчину. Потім зневоднені зразки очищали шляхом двократного занурення в розчин ксилолу на 30 хв. Наступним етапом було укладення в парафіновий блок і нарізання за допомогою мікротома. Отриманий препарат забарвлювали гематоксилін-еозином. Потім досліджували під світловим мікроскопом (збільшення $\times 400$) за допомогою мікроскопа «Olympus BX-51» («Olympus», Франція). Зображення отримували за допомогою ка-

Indonesia from February–March 2019. The animal samples were handled in the Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. The quantitation of osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts was conducted in the Laboratory of Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya.

The study had been reviewed and accepted by the Institutional Review Board of Brawijaya University, with ethical clearance number of №69/EC/KEPK-PPDS/02/2019.

The animals used in this study were 24 male Wistar strain rats (*Rattus norvegicus*). The inclusion criteria were: three months age and 180–200g weight. The exclusion criteria were any health disorders, in particular associated with bones. The dropout criteria were death during the acclimatization period.

The animals were maintained in a controlled condition of a 12-h light/dark cycle at the temperature of 23.6°C; they were fed a standard chow diet with water ad libitum. The animals were sacrificed by decapitation after seven days and their femurs were extracted.

Then the bone samples were divided into five groups: one control group ($n = 4$), group F1 (1-minute freezing in LN2, $n = 5$), group F2 (2 minutes freezing in LN2, $n = 5$), group F3 (4 minutes freezing in LN2, $n = 5$), and group F4 (8 minutes freezing in LN2, $n = 5$). The LN2 was acquired from the Pharmacological Department of Saiful Anwar General Hospital. The acquired bone sample were plunged into the LN2 for the designated period. Thereafter the samples were retrieved and thawed for 20 minutes at room temperature.

The femurs were treated with 10% formaldehyde then decalcified with 5% nitric acid solution for seven days. The samples then were dehydrated with serial treatments of alcohol with different concentrations (70, 80, 90, 95, 99, and 100%) for one hour using each solution. The dehydrated samples were then cleared using the Xylol solution for 2×30 minutes. The next process was embedding to the paraffin block and slicing with a microtome. The resulting preparation was dyed using hematoxylin & eosin (HE) dye. They were examined under light microscopy ($400\times$ magnification) using Olympus BX-51 microscope (Olympus, France). The images were captured using Olympus XC10 camera. The quantitative counting was done within ten high power field (HPF, diameter: 0.096 mm^2); the final quantitative results were the average number of cells/HPF.

The normality of the data was analyzed using the Kolmogorov-Smirnoff test, and the homogeneity was tested using Levene's test. One-way ANOVA was used to compare the difference of cell count means among all groups. The posthoc test was conducted using the Tukey test to conduct all possible pair-wise comparisons between the groups. All statistical analysis



мери «Olympus XC10» («Olympus», Франція). Кількісний підрахунок проводився в десяти полях зору з великим збільшенням (ПЗВЗ), діаметр: 0,096 мм²); остаточної кількісні результати представляли середню кількість клітин/ПЗВЗ.

Розподіл на нормальність даних аналізували за допомогою тесту Колмогорова-Смирнова, а однорідність – за тестом Льюені. Однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA використовували для порівняння різниці середніх значень кількості клітин у всіх групах. Ретроспективний аналіз здійснювали за допомогою діапазонного тесту Тьюкі для проведення усіх можливих парних порівнянь між групами. Статистичну обробку проводили з використанням статистичного пакета програм «SPSS версії 21.0» («IBM Statistics», США).

Однофакторний тест ANOVA показав статистично значущу відмінність між усіма групами ($p = 0,03$). Однак згідно з результатами ретроспективного тесту кількість остеоцитів у контрольній групі значуще відрізнялася тільки від груп F1 ($p = 0,033$) і F3 ($p = 0,034$).

Після заморожування в рідкому азоті спостерігалось дозозалежне зниження кількості остеобластів. Найменшу кількість остеобластів фіксували в групі F4, у якій відзначали зниження кількості остеобластів на 95,9% після 8-хвилинного заморожування в рідкому азоті порівняно з контрольною групою (таблиця). Відзначали майже 11-кратне зниження кількості остеобластів порівняно з групами F2 та F4. Більш того, результати всіх можливих парних порівнянь кількості остеобластів були статистично значущими ($p < 0,05$).

Найменша кількість остеокластів спостерігалась також при 8-хвилинному заморожуванні (таблиця). Зменшення кількості остеокластів було не таким значним, як зменшення остеобластів. Кількість остеокластів у групі F4 знижувалась приблизно до 26% порівняно з контрольною групою. Не було значних відмінностей між кількістю остеокластів у контрольній групі та групах F2 і F3. Кількість остеокластів у групі F4 була значно нижчою порівняно з контролем ($p < 0,001$)

Вживання різних типів клітин кісткової тканини після занурення у рідкий азот
Survival of different types of bone cells after plunging into liquid nitrogen

Клітини Cell	Групи Group	n	Середнє ± стандартне відхилення (клітина/ПЗВЗ) Mean ± SD (cell/HPF)
Остеоцит Osteocyte	Контроль Control	4	371 ± 13
	F1	5	323 ± 38**
	F2	5	338 ± 26*
	F3	5	323 ± 19**
	F4	5	331 ± 34*
Остеобласт Osteoblast	C	4	44 ± 2
	F1	5	19 ± 0**
	F2	5	13 ± 1** &
	F3	5	4 ± 1** & §
	F4	5	1 ± 0** & § ^
Остеокласт Osteoclast	C	4	13 ± 2
	F1	5	9 ± 2*
	F2	5	9 ± 1*
	F3	5	8 ± 1**
	F4	5	4 ± 1** & § ^

Примітки: розбіжності значущі ($p < 0,05$) відносно контрольної групи (однофакторний аналіз ANOVA) (*), контрольної групи (тест Тьюкі) (#), групи F1 (тест Тьюкі) (§), групи F2 (тест Тьюкі) (&), групи F3 (тест Тьюкі) (^); ПЗВЗ – поле зору з великим збільшенням.

Notes: differences are significant ($p < 0.05$) compared to control (one way ANOVA test) (*), compared to control (Tukey test) (#), compared to the group F1 (Tukey test) (§), compared to the group F2 (Tukey test) (&), compared to the group F3 (Tukey test) (^); HPF – high power field.

was conducted using SPSS version 21.0 (IBM Statistics, USA).

One-way ANOVA test showed there was a statistically significant difference among all groups ($p = 0.03$). However, post-hoc test showed that the osteocyte number in the control group was only significantly different compared to the group F1 ($p = 0.033$) and group F3 ($p = 0.034$).

There was a dose-dependent decline of osteoblast number with LN2 freezing. The lowest osteoblast count was observed in group F4, in which there was a 95.9% reduction of osteoblast number after 8-minutes of LN2 freezing compared to the control group (Table). There was an almost 11-fold reduction of the osteoblast number when compared to groups F2 and F4. Moreover, the results of all possible pair-wise compa-

та групами F1 ($p = 0,001$), F2 ($p < 0,001$) і F3 ($p = 0,003$).

Результат цього дослідження показав, що процедура заморожування викликала зменшення кількості клітин остеоцитів, остеобластів і остеокластів у всіх групах. Однак різниця в кількості остеоцитів була мінімальною, і ретроспективний тест показав значні відмінності тільки в кількості остеоцитів між контрольною групою і групою F1 та між контрольною групою і групою F3.

К. Suto та співавт. [10] показали, що остеоцити стійкі до пошкоджень, пов'язаних із утворенням кристалів льоду після декількох циклів заморожування-відтавання. Було висловлено припущення, що кістковий матрикс забезпечує певну ступінь захисту від висококонцентрованих фізіологічних розчинів і кристалів льоду, які утворюються в процесі заморожування-відтавання. Цей опір може пояснити, чому заморожування менше впливає на кількість остеоцитів незалежно від використовуваного часу. Автори також продемонстрували, що циклічне заморожування-відтавання призводить до руйнування як цитоплазматичної, так і ядерної мембран клітин остеобластів [10]. У даному експерименті кількість остеобластів зменшилася до 1 кл/ПЗВЗ після 8 хв заморожування в рідкому азоті. За чутливістю остеобластів до впливу низьких температур можна зрозуміти, чому кількість остеобластів поступово зменшувалася після тривалого періоду заморожування. Кількість остеокластів також була пропорційно обернена до тривалості заморожування. Однак зниження кількості остеокластів було не таким істотним порівняно з остеобластами. S.J. Yu та співавт. [11] виявили, що остеокласт може зберігати життєздатність і свої характеристики після заморожування-відтавання.

D.W. Han та співавт. [7] встановили аналогічне різке зниження кількості остеобластів після процедури заморожування-відтавання. Пошкодження клітин було пов'язане зі збільшенням вмісту активних форм кисню (АФК) у відталих клітинах. Кількість остеокластів була нижче, ніж у нашому дослідженні, що свідчить про більш високу стійкість остеокластів до низької температури порівняно з остеобластами. У роботі T.S. Agidigbi та C. Kim [1] показано, що АФК є важливими сигнальними молекулами остеокластів. Ми припускаємо, що внаслідок цього може спостерігатися різна чутливість остеобластів і остеокластів до утворення АФК, викликаних заморожуванням-розморожуванням. Проте чіткий молекулярний механізм, який є основою сприйнятливості та стійкості цих клітин до заморожування, вимагає уточнення.

Результати цього дослідження показують, що заморожування в рідкому азоті не призвело до повного

ризиків остеобласт count were statistically significant ($p < 0.05$).

The lowest osteoclast count was also observed in the case of 8-minute-long freezing (see the Table). The reduction of the osteoclast number was not as much as the reduction of osteoblast. There was about a 26% reduction in the number of osteoclasts in the group with 8 minutes of freezing compared to the control group. There were no significant differences between the osteoclast number of the control group and the groups F2 and F3. The osteoclast number after 8-minutes freezing was significantly lower compared to control ($p < 0.001$), groups F1 ($p = 0.001$), F2 ($p < 0.001$), and F3 ($p = 0.003$).

The result of this study showed that the freezing procedure caused a reduction of the osteocyte, osteoblast, and osteoclast cell counts in all groups. However, the difference in the osteocyte number was minimal, and the posthoc test only showed a significant osteocyte count difference between control group and the group F1; and between control group and the group F3.

K. Suto *et al.* [10] demonstrated that osteocytes are resistant to the damages associated to ice crystal formation after several freeze-thaw cycles. It was suggested that the bone matrix provides a certain degree of protection against high concentrated salines and ice crystal formed during the freeze-thaw process. This resistance may explain why the number of osteocytes is less affected by the freezing irrespectively of the times used. The authors also demonstrated that the cycled freeze-thawing resulted in disruption of both cytoplasmic and nuclear membranes of osteoblast cells [10]. In the present experiment, the osteoblast count was reduced down to 1 cell/HPF after 8 minutes of LN2 freezing. Osteoblast's sensitivity to low temperature exposure may explain why the number of osteoblasts progressively decreased after applying longer period of freezing. The number of osteoclasts observed in this study was also inversely proportionate to the freezing duration. However, the reduction of osteoclast number was not so drastic as compared to osteoblasts. S.J. Yu *et al.* [11] found that osteoclast can retain viability and its characteristics after freeze-thawing.

D.W. Han *et al.* [7] found similar dramatic decline in osteoblast number following the freeze-thawing procedure. The cell injury was associated with increasing of reactive oxygen species (ROS) content in thawed cells. The reduction in the osteoclast number was lower like in our study, suggesting the higher resistance of osteoclast to the low temperature compared to osteoblast. T.S. Agidigbi and C. Kim [1] showed that ROS are essential signalling molecules in the osteoclast. We suppose this may explain the different



руйнування кісткових клітин, особливо остеоцитів. Цей факт може бути проблемою під час зниження імуногенності трансплантата. Отримані результати узгоджуються з висновками L.F. Coutinho та співавт. [4], які вказували на те, що кісткові трансплантати, що зберігаються в трьох бразильських кісткових банках, все ще містять клітини, ДНК і неушкоджені кровоносні судини. Навпаки, теоретично присутність цих клітин може бути бажаною, якщо мова йде про ремоделювання кістки, оскільки аутологічний остеоцит може відновлювати пошкоджені каналці та утворювати зв'язок із остеоцитами на іншому фрагменті кістки. Більш того, сигнальні молекули апоптотичного остеоциту викликають рекрутинг остеокластів, що сприяє ремоделюванню кістки. T.G. Baboolal та співавт. [3] прийшли до висновку, що кріоконсервованій алотрансплантат містить остеоцити і стовбурові клітини мезенхімальних клітин, при цьому не викликає імуногенну відповідь після трансплантації. Однак, наскільки нам відомо, на сьогодні відсутні роботи щодо порівняння ступеня остеointegraції та імунної відповіді залежно від клітинного утримання матеріалу алотрансплантата [3, 9], тому це потребує подальших ґрунтовних досліджень.

Під час проведення дослідження автори зіткнулися з деякими обмеженнями. У даній роботі тривалість заморожування становила максимум 8 хв. У наступних експериментах необхідно досліджувати використання більш тривалих або ближчих до практичного застосування періодів часу (зокрема 20-хвилинну тривалість – час, необхідний для підготовки матеріалу до кісткової пластики).

Таким чином, можна зробити висновок, що заморожування в рідкому азоті здебільшого знижує кількість остеоцитів, остеобластів і остеокластів. Найменша різниця спостерігається в кількості остеоцитів, а найбільша – в кількості остеобластів.

Література

1. Agidigbi TS, Kim C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 22 [Cited 2019 Oct 9];20(14):3576. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3576>
2. Ang CY, Loh DST, Chaw HW, et al. Simple novel bone bank storage: the Singapore General Hospital experience. *Biopreserv Biobank*. 2012;10(6):526–8.
3. Baboolal TG, Boxall SA, El-Sherbiny YM, et al. Multipotential stromal cell abundance in cellular bone allograft: comparison

sensitivity of osteoblast and osteoclast to the ROS formation induced by the freeze-thawing procedure. The exact molecular mechanism behind the susceptibility and resistance of these cells to freezing is nevertheless to be clarified.

The findings of this study suggest that the LN2 freezing procedure did not completely eradicate the bone cells, especially the osteocytes. This could be a problem in reducing the immunogenicity of a graft. This result is in line with the findings by L.F. Coutinho *et al.* [4], which reported that bone grafts stored in three Brazilian bone banks still contain cells, DNA, and intact blood vessels. On the contrary, the presence of these cells could theoretically be desirable if applied in the bone remodeling procedure, because the autologous osteocyte can repair the disrupted canaliculi and form a connection with osteocytes on the other bone fragment. Moreover, the apoptotic osteocyte still has the ability to recruit osteoclast, instigating the bone remodelling process. T.G. Baboolal *et al.* [3] concluded that cryopreserved allograft retains osteocytes and mesenchymal cell stem cell without inducing immunogenic response. However, to our knowledge, there is currently no study comparing the degree of osteointegration and immunogenic response in relation to the cellular content of an allograft material [3, 9]. Ensuing studies are needed to further elaborate this.

This study still had some limitations. The freezing duration in this study was limited to a maximum of 8 minutes. Future studies should design a more extended timeframe or one more closely resembling the practical application, *e. g.* using the duration of 20 minutes like the one used in bone recycling procedure.

In conclusion, LN2 freezing generally decreases the number of osteocytes, osteoblast, and osteoclast. The least difference was observed in osteocyte number and the greatest difference was observed in osteoblast number.

References

1. Agidigbi TS, Kim C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 22 [Cited 2019 Oct 9];20(14):3576. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3576>
2. Ang CY, Loh DST, Chaw HW, et al. Simple novel bone bank storage: the Singapore General Hospital experience. *Biopreserv Biobank*. 2012;10(6):526–8.



- with fresh age-matched iliac crest bone and bone marrow aspirate. *Regen Med.* 2014;9(5):593–607.
4. Coutinho LF, Batista J, Brito É, et al. Presence of cells in fresh-frozen allogeneic bone grafts from different tissue banks. *Braz Dent J.* 2017;28(2):152–7.
 5. Diaz-Rodriguez P, López-Álvarez M, Serra J, et al. Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration. *Mar Drugs* [Internet]. 2019 Aug 15 [cited 2019 Oct 9];17(8):471. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/8/471>
 6. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, et al. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allotransplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(6):885–901.
 7. Han DW, Hak HK, Mi HL, et al. Protection of osteoblastic cells from freeze/thaw cycle-induced oxidative stress by green tea polyphenol. *Biotechnol Lett.* 2005;27(9):655–60.
 8. Rasch A, Naujokat H, Wang F, et al. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PloS ONE* [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2019 Oct 8];14(6):e0218404. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0218404>
 9. Shah FA, Palmquist A. Evidence that osteocytes in autogenous bone fragments can repair disrupted canalicular networks and connect with osteocytes in de novo formed bone on the fragment surface. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(3):321–7.
 10. Suto K, Urabe K, Naruse K, et al. Repeated freeze-thaw cycles reduce the survival rate of osteocytes in bone-tendon constructs without affecting the mechanical properties of tendons. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):71–80.
 11. Yu SJ, Wu CL, Jin HT, et al. [Subculture, cryopreservation and recovery of osteoclasts]. *Zhongguo Gu Shang.* 2017;30(5):463–9. Chinese.
 3. Baboolal TG, Boxall SA, El-Sherbiny YM, et al. Multipotential stromal cell abundance in cellular bone allograft: comparison with fresh age-matched iliac crest bone and bone marrow aspirate. *Regen Med.* 2014;9(5):593–607.
 4. Coutinho LF, Batista J, Brito É, et al. Presence of cells in fresh-frozen allogeneic bone grafts from different tissue banks. *Braz Dent J.* 2017;28(2):152–7.
 5. Diaz-Rodriguez P, López-Álvarez M, Serra J, et al. Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration. *Mar Drugs* [Internet]. 2019 Aug 15 [cited 2019 Oct 9];17(8):471. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/8/471>
 6. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, et al. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allotransplantation. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(6):885–901.
 7. Han DW, Hak HK, Mi HL, et al. Protection of osteoblastic cells from freeze/thaw cycle-induced oxidative stress by green tea polyphenol. *Biotechnol Lett.* 2005;27(9):655–60.
 8. Rasch A, Naujokat H, Wang F, et al. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PloS ONE* [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2019 Oct 8];14(6):e0218404. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0218404>
 9. Shah FA, Palmquist A. Evidence that osteocytes in autogenous bone fragments can repair disrupted canalicular networks and connect with osteocytes in de novo formed bone on the fragment surface. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(3):321–7.
 10. Suto K, Urabe K, Naruse K, et al. Repeated freeze-thaw cycles reduce the survival rate of osteocytes in bone-tendon constructs without affecting the mechanical properties of tendons. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):71–80.
 11. Yu SJ, Wu CL, Jin HT, et al. [Subculture, cryopreservation and recovery of osteoclasts]. *Zhongguo Gu Shang.* 2017;30(5):463–9. Chinese.

