

## **TOMOGRAFIA DI SINCROTRONE BASATA SUL PHASE-CONTRAST: UN METODO EMERGENTE PER L'IMAGING DELLA MICROVASCOLARIZZAZIONE NELL'OSSO INGEGNERIZZATO DEI DISTRETTI CRANIO FACCIALI**

Alessandra Giuliani

*Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche e Odontostomatologiche, Sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

La rigenerazione di alcuni distretti ossei craniofacciali è oggi una sfida importante dell'ingegneria tissutale. Infatti, poiché l'ossigeno necessario per la sopravvivenza cellulare è in grado di raggiungere una distanza di diffusione massima di circa 150-200  $\mu\text{m}$  dal vettore di vascolarizzazione originale, una ridotta vascolarizzazione spesso ostacola la sopravvivenza a lungo termine dei tessuti rigenerati. Pertanto, la rapida crescita di nuovi vasi sanguigni, capaci di fornire ossigeno e nutrienti anche alle cellule all'interno degli innesti ossei, è condizione necessaria per la loro funzione a lungo termine nella pratica clinica. Sfortunatamente, progressi significativi in questa direzione sono attualmente ostacolati dalla mancanza di metodi efficaci attraverso cui visualizzare in 3D i siti rigenerati.

A questo proposito, negli ultimi anni sta prendendo campo un metodo innovativo per l'*imaging* 3D e l'analisi della microvascolarizzazione e della microstruttura ossea: si basa sull'uso della tomografia a contrasto di fase di sincrotrone. Questa tecnica è in grado di identificare simultaneamente molteplici caratteristiche del tessuto in un sito osseo cranio-facciale (es. la struttura microvascolare e calcificata del tessuto). Inoltre, supera i limiti intrinseci dell'istologia, che permette solo una caratterizzazione 2D, e di approcci tomografici convenzionali, che non risolvono in modo adeguato la rete di vascolarizzazione quando l'agente di contrasto non riesce a penetrare i microvasi di nuova generazione. Infatti, la tomografia a contrasto di fase, essendo basata sulle differenze di fase tra le onde trasmesse da tessuti diversi, è in grado di discriminare tessuti con coefficienti di assorbimento simili (come i vasi e il tessuto osseo). L'approccio qui esaminato si basa sulle esperienze più recenti applicate alla rigenerazione ossea nella regione craniofacciale.

I difetti ossei del distretto craniofacciale, dovuti a condizioni congenite, malattie e lesioni, costituiscono, al giorno d'oggi, un importante problema clinico, spesso risolto con la sostituzione dei tessuti mediante innesto autologo. Tuttavia, a volte questa procedura non è percorribile per morbilità del sito donatore. In questi casi, i protocolli di ingegneria ossea potrebbero supportare il ripristino della funzione tramite sostituzione dei tessuti danneggiati o malati (1).

La funzione a lungo termine dei biomateriali sostitutivi dell'osso dipende fortemente da un'adeguata vascolarizzazione post-innesto; pertanto la ricerca si è recentemente focalizzata su approcci di ingegneria ossea cranio-facciale che coinvolgano l'angiogenesi (2).

Tuttavia, gli attuali metodi di vascolarizzazione spesso non sono sufficientemente rapidi da permettere un'adeguata fornitura di ossigeno fin dalle prime fasi post-innesto: pertanto, è necessario creare reti microvascolari 3D *in vitro*, cioè prima dell'innesto del biomateriale (3).

Ancora oggi comunque, non possediamo una piena comprensione dei percorsi di vascolarizzazione ossea: ciò è principalmente dovuto all'assenza di tecniche di *imaging* idonee a monitorare questi processi *in vivo*. Oggigiorno d'altra parte sono disponibili nuove e interessanti

modalità di *imaging*. Upputuri *et al.* (4) hanno recentemente classificato gli approcci di *imaging* vascolare in tre gruppi: tecniche non ottiche (raggi X, risonanza magnetica, ultrasuoni e *imaging* a emissione di positroni), tecniche ottiche (coerenza ottica, fluorescenza, ecc) e tecniche ibride (*imaging* fotoacustico).

All'interno del gruppo non ottico, i metodi di *imaging* a raggi X risultano certamente i più interessanti. In particolare, la tomografia ad alta risoluzione (micro-CT) (5, 6) è in grado di fornire una risoluzione molto più elevata ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) di *imaging* rispetto all'ecografia ( $\sim 30 \mu\text{m}$ ) e alla risonanza magnetica ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ), consentendo la visualizzazione e la quantificazione della microvascolarizzazione. Questa procedura è normalmente ottenuta con l'uso di agenti di contrasto, che sono filler radiopachi e radio densi. Recentemente, è stato dimostrato che il micro-CT a media risoluzione ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) è in grado di riprodurre con successo i vasi sanguigni di medie e grandi dimensioni (7). Langer *et al.* (8) hanno eseguito con successo l'*imaging* della microvascolarizzazione con mezzo di contrasto nell'osso di topo e ratto: pur osservando che alcune parti della rete non erano visibili (a causa dell'effetto di volume parziale), una parte molto grande del volume vascolare è stata ricostruita, grazie all'agente di contrasto.

Negli ultimi anni si è diffuso un nuovo metodo per l'*imaging* 3D e l'analisi combinata della microvascolarizzazione e della microstruttura ossea: si basa sull'utilizzo della microtomografia a contrasto di fase di sincrotrone (PhC-micro-CT) e consente, al contrario delle tradizionali tecniche 2D come l'istologia, di identificare in 3D le caratteristiche dei tessuti senza utilizzare agenti di contrasto. A differenza della micro-CT convenzionale in cui il contrasto è dovuto alle differenze di attenuazione dei raggi X all'interno del campione, nel PhC-micro-CT il contrasto si origina dallo sfasamento dei fotoni X che passano attraverso la materia (9, 10). Questa variazione di fase nei tessuti biologici non mineralizzati può essere tre volte superiore rispetto all'attenuazione del fascio (11, 12), e ciò spiega l'elevato contrasto che è stato osservato tramite PhC-micro-CT nello studio di diversi tessuti biologici.

Sono stati studiati almeno tre metodi di *imaging* a contrasto di fase: la *X-ray grating interferometry* (13, 14), la *diffraction enhanced imaging* (15-18) e la *propagation-based imaging* (9, 19, 20).

I primi due metodi sono spesso utilizzabili solo presso le sorgenti di sincrotrone perché richiedono un raggio di raggi X monocromatico e altamente collimato. Infatti, quando si usa la *X-ray grating interferometry* nelle sorgenti di raggi X convenzionali, si verifica una riduzione del flusso importante. A sua volta, questa riduzione del flusso richiederebbe tempi di esposizione più lunghi rispetto ai sincrotroni, ostacolando, di conseguenza, la traduzione del metodo in contesti clinici (21).

Diversamente dalla *X-ray grating interferometry*, la *diffraction enhanced imaging* sfrutta i vantaggi di una risoluzione angolare di  $\mu\text{rad}$  ottenuta mediante il filtraggio di raggi X deflessi per rifrazione. Ciò è reso possibile utilizzando un cristallo analizzatore dopo il campione per selezionare i raggi X rifratti dal campione.

Invece, la *propagation-based imaging* genera contrasto mediante diffrazione di Fresnel o Fraunhofer: il primo si ottiene posizionando il rivelatore e il campione a una distanza moderata.

In pratica, a risoluzioni più basse, l'*imaging* interferometrico a raggi X è l'approccio preferenziale per rivelare strutture poco assorbenti, essendo in grado di percepire anche gradienti di fase più piccoli rispetto ai metodi di *imaging* basati sulla propagazione e sulla diffrazione.

D'altro canto, il metodo di *imaging* basato sulla propagazione è di grande vantaggio nell'*imaging* ad alta risoluzione, perché non sono necessari componenti ottici quando è disponibile una sorgente di raggi X coerente, come nelle strutture di sincrotrone. La possibilità di ottenere alte risoluzioni ha reso l'*imaging* basato sulla propagazione la tecnica di scelta nello studio dell'ultrastruttura e della vascolarizzazione dell'osso umano, con studi preclinici e clinici mirati all'analisi di vasi di medio e piccolo calibro.

Inoltre, l'*imaging* cerebrale è di fondamentale interesse negli studi di plasticità delle malattie cerebrovascolari. Tradizionalmente, nel cervello vengono applicati metodi di micro-CT e microMRI basati sull'assorbimento, utilizzando agenti di contrasto per una migliore visualizzazione della vascolarizzazione. Molto recentemente, il PhC-micro-CT di sincrotrone è stato applicato per visualizzare l'intera microvascolarizzazione del cervello del topo, tramite alta risoluzione ( $\sim 3,7 \mu\text{m}$ ) e senza agenti di contrasto (22). Sono state osservate alterazioni della microcircolazione nel cervello dei topi C57BL/6 ( $n = 14$ ) dopo 14 giorni dall'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media (tMCAO). La PhC-micro-CT ha dimostrato che il rapporto del raggio di ramificazione (post/pre-occlusione) dei piccoli vasi (raggio  $<7,4 \mu\text{m}$ ) nel gruppo trattato era significativamente inferiore rispetto al gruppo *sham*. Questo risultato ha rivelato il ruolo dell'angiogenesi attiva nel recupero cerebrale dopo l'ictus.

In un altro recente studio, Fratini *et al.* (23) hanno dimostrato che la PhC-micro-CT consente la visualizzazione simultanea della rete micro-vascolare tridimensionale e dei sistemi neuronali del midollo spinale *ex-vivo*. Questo esperimento è stato condotto su scale che vanno da millimetri a centinaia di nanometri e senza agenti di contrasto. Sono state ottenute immagini della distribuzione tridimensionale della micro-rete capillare e delle fibre nervose micrometriche, dei fasci di assoni e del neurone, confermando l'efficacia di questa tecnica anche negli studi preclinici di patologie neurodegenerative e lesioni del midollo spinale.

Come già osservato, la micro-CT convenzionale è una tecnica che consente una buona visualizzazione della struttura dell'osso mineralizzato e dei biomateriali, ma non riesce nel tentativo di distinguere i tessuti molli, anche ad alte risoluzioni. Al contrario, si è visto che la PhC-micro-CT, basata sulla propagazione dei fotoni, presenta, ad alta risoluzione, un contrasto più elevato del tessuto molle, chiaramente in grado di discriminare le strutture legamentose, muscolari, neurali e vascolari.

Queste scoperte hanno portato alcuni studiosi ad analizzare la vascolarizzazione 3D del tessuto osseo ingegnerizzato tramite PhC-micro-CT. Infatti un *imaging* dettagliato e una descrizione quantitativa della rete vascolare è di fondamentale interesse al fine di monitorare la relazione tra formazione dell'osso e vascolarizzazione. In questo contesto, la tomografia di fase ha dimostrato di discriminare in modo efficiente i tessuti con coefficienti di assorbimento simili tramite l'uso di un agente di contrasto (8).

Comunque, sebbene un nuovo mezzo a contrasto di fase–le microbolle–sia stato applicato con successo alle applicazioni angiografiche (24), diversi autori concordano che la PhC-micro-CT è in grado di eseguire una visualizzazione 3D dei capillari più piccoli (23) nei topi, senza l'uso di alcun agente di contrasto.

Questo fatto è stato confermato in un altro recente studio (25), in cui è stata utilizzata la PhC-micro-CT di sincrotrone per visualizzare e analizzare le reti 3D micro-vascolari in costrutti basati sull'osso, costituiti da *scaffold* in ceramica porosa caricati con cellule stromali del midollo osseo (BMSC), in un modello ectopico di topo. I campioni seminati e non seminati con BMSC sono stati confrontati, con o senza l'uso di agenti di contrasto. Gli autori hanno ottenuto la distribuzione 3D di entrambe le reti vascolare e la matrice di collagene e hanno ottenuto informazioni quantitative per i diversi campioni, anche per quelli non marcati.

## Esperienze nei distretti craniofacciali

Oggi giorno, l'osso autologo è ancora considerato il materiale di innesto ideale nel distretto craniofacciale (26, 27). Gli innesti autologhi sono vascolarizzati e contengono osteoblasti vitali, matrici organiche e inorganiche e fattori di crescita che consentono il rimodellamento e l'integrazione strutturale con il sito ospite. Tuttavia, vi sono limitazioni significative associate all'uso di innesti autologhi, compresa la disponibilità di tessuto donatore (poiché deve essere

ottenuto intraoralmente), la necessità di ulteriori procedure chirurgiche e, di conseguenza, maggiori tempi e costi operativi (27, 28).

Quando si utilizzano direttamente innesti sintetici e allogenici, solo la periferia dell'innesto viene efficientemente vascolarizzata. Di conseguenza, si verifica frequentemente una zona centrale di necrosi, che si traduce in un guscio di ossificazione in superficie, ma con un basso livello di penetrazione, a causa soprattutto del limitato trasporto di ossigeno (28).

Quindi, una rapida vascolarizzazione degli innesti ossei costituisce un obiettivo clinico di fondamentale importanza. La creazione una vascolarizzazione matura e funzionale non dipende solo dalla migrazione e dalla proliferazione delle cellule endoteliali, ma richiede anche cooperazione e simbiosi tra queste e le cellule perivascolari (28).

Quindi un compito importante è trovare tecniche di *imaging* avanzate che possano verificare e quantificare il processo di mineralizzazione e neovascolarizzazione degli innesti, nelle prime fasi della formazione dell'osso (29).

Le strutture di sincrotrone di terza generazione producono raggi di fotoni X brillanti, con elevate proprietà di coerenza spaziale. È stato dimostrato che sono adatti a diversi studi di ingegneria tissutale, rilevando *in vitro* la matrice extracellulare di recente formazione (30), le prime colonie di cellule endoteliali (31) e le prime fasi di mineralizzazione ossea (32, 33), tramite metodi di *imaging* a raggi X avanzati e basati sul contrasto di fase.

Molto recentemente, alcuni autori (29) hanno dimostrato che le cellule staminali della polpa dentale umana (hDPSC) possono creare un tessuto osseo pronto per essere innestato per l'applicazione clinica. Hanno dimostrato che le hDPSC proliferano *in-vitro*, si differenziano in osteoblasti ed esprimono geni associati a fattori di angiogenesi, come VEGF e PDGFA.

L'*imaging* a contrasto di fase a raggi X basato sul sincrotrone ha dimostrato che, dopo 40 giorni di coltura in terreno standard, le hDPSC formavano osso tessuto (WB), cioè osso fibroso con un basso livello di mineralizzazione. L'analisi di PhC-micro-CT è stata eseguita utilizzando un fascio policromatico, con una distanza da campionario a rivelatore di 150 mm, corrispondente a un *setting* di contrasto di fase su distanza singola. Il potenziale osteogenico del WB fabbricato dopo coltura *in vitro* di hDPSC è stato avallato dai dati quantitativi estratti. Tuttavia, non è stato possibile rilevare alcuna vascolarizzazione utilizzando questa tecnica.

A questo proposito, la tecnica di olografia (*HoloTomography*, HT) ha aggiunto informazioni fondamentali al precedente studio (29). L'approccio olografico differisce dalla PhC-micro-CT basata su una singola distanza in quanto l'acquisizione consiste in scansioni tomografiche a quattro diverse distanze di propagazione, seguite da un diverso algoritmo di ricostruzione. L'analisi HT ha permesso di ottenere una ricostruzione 3D del WB, verificando la presenza di nuovi vasi. Infatti, a causa del loro basso coefficiente di attenuazione, questi nuovi vasi risultano trasparenti nelle ricostruzioni tomografiche convenzionali basate sull'attenuazione. Inoltre, si è visto che il metodo di PhC-micro-CT basato su una singola distanza non è sufficientemente sensibile.

Questo risultato, ottenuto tramite HT, ha confermato con l'*imaging* le deduzioni derivate dal fatto che le hDPSC esprimevano alti livelli di VEGF e PDGF-A. Quest'ultima scoperta è di fondamentale interesse per la fisiologia ossea nei distretti craniofacciali, poiché soddisfa la necessità di neoangiogenesi nel sito ingegnerizzato. Pertanto, questi risultati supportano fortemente la logica che le hDPSC possiedono significative capacità di differenziazione verso l'osteangiogenesi, raggiungendo il *gold standard* di ottenere un osso impiantabile ben vascolarizzato (29).

Inoltre, altri studi (34) hanno dimostrato che le hDPSC si differenziano in osteoblasti e quindi, quando seminate su *scaffold* di collagene di tipo I, contribuiscono efficacemente alla riparazione dei difetti della mandibola umana. In questo contesto, un altro studio (31) ha mostrato, mediante HT di sincrotrone, la stabilità e la qualità dell'osso rigenerato con il metodo suddetto e la qualità

della rete vascolare 3 anni dopo l'innesto. Il tessuto rigenerato nei siti innestati è risultato inaspettatamente essere costituito da osso compatto, quindi strutturalmente diverso e più denso rispetto all'osso alveolare nativo sano dello stesso paziente. Tuttavia, sia nel controllo della mandibola umana sia nelle biopsie mandibolari umane trattate con hDPSC, in accordo con le analisi istologiche, dopo 3 anni l'osso rigenerato risultava ben strutturato e vascolarizzato. Sebbene infatti nel controllo la vascolarizzazione sia risultata più strutturata rispetto alla mandibola umana trattata con hDPSC, densità compatibili con quelle di neo-vasi sono state trovate in diverse aree della biopsia estratta dal sito trattato, confermando *in vivo* che le hDPSC hanno notevoli capacità di differenziazione verso l'osteangiogenesi (31).

In conclusione, mentre la PhC-micro-CT si è dimostrata in grado di visualizzare la rete di vasi in 3D in condizioni *in-vitro* ed *ex-vivo* e senza alcun sezionamento e preparazione del campione, l'uso di sorgenti di raggi X di sincrotrone coerenti e altamente brillanti risulta per ora necessario al fine di raggiungere una qualità dell'immagine superiore e con risoluzione spaziale sub-micrometrica. Infatti, come riportato in letteratura, il rilevamento di microvasi nell'osso ingegnerizzato è stato effettuato principalmente in due modi: mediante micro-CT basata sull'attenuazione, con l'uso di agenti di contrasto o mediante PhC-micro-CT basata sulla propagazione, senza marcatori radiopachi. Tuttavia, l'applicazione dell'ultimo metodo ha richiesto, fino a ora, l'accesso alle strutture di sincrotrone. Questo fatto costituisce una limitazione rilevante per un possibile utilizzo futuro di immagini a contrasto di fase nella pratica clinica, poiché la dose radiogena sarebbe troppo alta per il paziente. Pertanto, al momento si propone il metodo sopra descritto come strumento fondamentale per studi di angiogenesi circoscritti alla ricerca preclinica e negli studi dei siti ossei post-estrattivi dei distretti craniofacciali.

## Bibliografia

1. Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ. Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(1):64-75.
2. Auger FA, Gibot, L, Lacroix D. The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2013;15:17-200.
3. Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhad J, Ring A, *et al.* Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2093-104.
4. Upputuri, PK, Sivasubramanian K, Mark CSK Pramanik M. Recent Developments in vascular imaging techniques in tissue engineering and regenerative medicine. *BioMed Research International* 2015;783983.
5. Barbetta A, Bedini R, Pecci R, Dentini M. Role of X-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48(1):10-18.
6. Arkudas AJ, Beier P, Prymachuk G, Hoereth T, Bleiziffer O, Polykandriotis E, *et al.* Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010;16(6):1503-14.
7. Nebuloni L, Kuhn GA, Vogel J Muller R. A novel *in vivo* vascular imaging approach for hierarchical quantification of vasculature using contrast enhanced micro-computed tomography. *PLoS ONE* 2014; 9(1):e86562.
8. Langer M, Prisby R, Peter Z, Boistel R, Lafage-Proust MH, Peyrin F. Quantitative investigation of bone microvascularization from 3D synchrotron micro-computed tomography in a rat model. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009;1004-7.
9. Snigirev S, Snigireva I, Kohn V, Kuznetsov S, Schelokov I. On the possibilities of X-ray phase contrast micro imaging by coherent high-energy synchrotron radiation. *Rev Sc. Instrum*. 1995; 66:5486-92.

10. Bravin A, Coan P, Suortti P. X-ray phase-contrast imaging: from pre-clinical applications towards clinics. *Phys. Med. Biol* 2013;58(1):R1-R35.
11. Momose A. Demonstration of phase-contrast X-ray computed tomography using an x-ray interferometer. *Nucl Instrum and Methods* 1995;A352:622-28.
12. Lewis RA, Hall CJ, Hufton AP, Evans S, Menk RH, Arfelli F, *et al.* X-ray refraction effects: application to the imaging of biological tissues. *Brit J Radiol* 2003;76(905):301-8.
13. Momose A, Takeda T, Itai Y, Hirano K. Phase-contrast X-ray computed tomography for observing biological soft tissues. *Nat Med* 1996;(2):473-5.
14. Momose A. Phase-sensitive imaging and phase tomography using X-ray interferometers. *Opt Express* 2003;11(19):2303-14.
15. Davis TJ, Gao D, Gureyev TE, Stevenson AW, Wilkins SW. Phase-contrast imaging of weakly absorbing materials using hard X-rays. *Nature* 1995;373:595-98.
16. Ingal, IV, Beliaevskay EA. X-ray plane-wave topography observation of the phase contrast from a non-crystalline object. *J Phys D: Appl. Phys* 1995;28:2314-17.
17. Chapman D, Thomlinson W, Johnston RE, Washburn D, Pisano E, Gmür N, *et al.* Diffraction enhanced X-ray imaging. *Phys Med Biol* 1997;42:2015-25.
18. Chapman D, Pisano E, Thomlinson W, Zhong Z, Johnston RE, Washburn D, *et al.* Medical applications of diffraction enhanced imaging. *Breast Dis* 1998;10(3-4):197-207.
19. Wilkins SW, Gureyev TE, Gao D, Pogany A, Stevenson AW. Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays. *Nature* 1996;384:335-38.
20. Cloetens P, Luding W, Baruchel J, Van Dyck D, Van Landuyt J, Guigay JP, *et al.* Holotomography: quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x rays. *Appl Phys Lett* 1999;75:2912.
21. Nesch I, Fogarty DP, Tzvetkov T, Reinhart B, Walus AC, Khelashvili G, *et al.* The design and application of an in-laboratory diffraction-enhanced x-ray imaging instrument. *Rev Sci Instrum* 2009; 80:093702.
22. Miao P, Wu Z, Li M, Ji Y, Xie B, Lin X, *et al.* Synchrotron radiation X-ray phase-contrast tomography visualizes microvasculature changes in mice brains after ischemic injury. *Neural Plast* 2016; 3258494.
23. Fratini M, Bukreeva I, Campi G, Brun F, Tromba G, Modregger P, *et al.* Simultaneous submicrometric 3D imaging of the micro-vascular network and the neuronal system in a mouse spinal cord. *Sci Rep* 2015;5:8514.
24. Tang R, Xi Y, Chai WM, Wang Y, Guan Y, Yang GY, *et al.* Microbubble-based synchrotron radiation phase contrast imaging: basic study and angiography applications. *Phys Med Biol* 2011;56:3503-12.
25. Bukreeva I, Fratini M, Campi G, Pelliccia D, Spanò R, Tromba G, *et al.* High-resolution X-ray techniques as new tool to investigate the 3D vascularization of engineered-bone tissue. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3:133.
26. Yamanichi N, Itose T, Neiva R, Wang HL. Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: A case series. *Int. J. Periodontics Restorative Dent* 2008;28(2):163-169.
27. Iezzi G, Piatelli A, Giuliani A, Mangano C, Barone A, Manzon L, *et al.* Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of bone grafting materials and membranes during maxillary sinus-lift procedures. Part 2: detailed characteristics of the materials. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18(1):33-44.
28. Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O' Doherty E *et al.* Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8):3311-6.

29. Paino F, La Noce M, Giuliani A, De Rosa A, Mazzoni S, Laino L *et al.* Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering. *Clin Sci (Lond)* 2017;131(8):699-713.
30. Albertini G, Giuliani A, Komlev V, Moroncini F, Pugnali A, Pennesi G *et al.* Organization of extracellular matrix fibers within polyglycolic acid-poly(lactic acid) scaffolds analyzed using X-ray synchrotron-radiation phase-contrast micro computed tomography. *Tissue Eng. Part C Methods* 2009; 15:403-11.
31. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F *et al.* Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line HT revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine* 2013;2:316-24.
32. Manescu A, Giuliani A, Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomedede F *et al.* Osteogenic potential of dual-blocks cultured with periodontal ligament stem cells: in-vitro and synchrotron microtomography study. *J Periodontol Res* 2016;51(1):112-24.
33. Mazzoni S, Mohammadi S, Tromba G, Diomedede F, Piattelli A, Trubiani O *et al.* Role of cortico-cancellous heterologous bone in human periodontal ligament stem cell *xeno-free* culture studied by Synchrotron radiation phase-contrast microtomography. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):364.
34. D'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A *et al.* Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009;18:75-83.