

血管冻干工艺过程中升华界面移动特性的微CT实验★

吴建青¹, 陶乐仁¹, 刘萌芳¹, 殷 猛²

Micro-CT experimental study concerning movement characteristics of sublimation interface in freeze-drying preservation of the artery

Wu Jian-qing¹, Tao Le-ren¹, Liu Meng-fang¹, Yin Meng²

¹Institute of Cryobiology and Cryomedicine, Shanghai University for Science and Technology, Shanghai 200093, China; ²Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Children Medical Center, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Wu Jian-qing★, Studying for master's degree, Institute of Cryobiology and Cryomedicine, Shanghai University for Science and Technology, Shanghai 200093, China
15900843232@139.com

Received: 2009-08-18
Accepted: 2009-09-10

¹上海理工大学低温生物医学技术研究所, 上海市200093; ²上海第二医科大学附属新华医院上海儿童医学中心心胸外科, 上海市200092

吴建青★, 男, 1985年生, 河南省巩义市人, 汉族, 上海理工大学在读硕士, 主要从事生物材料冷冻干燥保存方面研究。
15900843232@139.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2010)07-01196-04

收稿日期: 2009-08-18
修回日期: 2009-09-10
(20090618006/W·Z)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies demonstrated that freeze-drying had great influence on internal heat transfer, such as pore distribution and void connectivity, however, the mechanisms involved in heat and mass transfer during drying is poorly understood.

OBJECTIVE: Based on the previous studies, micro CT was served as analytical tool, to observe the movement characteristics of sublimation interface in freeze-drying process.

METHODS: With aorta of pig, micro-CT scanning, image reconstruction and the technique of grey value analysis were used to observe and analyze the sublimation process in freeze-drying.

RESULTS AND CONCLUSION: The slope of freeze-drying temperature curve was large at first, causing quick sublimation rate. The grey value of freeze-drying and ice crystal area was very different in second-dimensional cross-sectional reconstructed image. Sublimation interface was clear and sublimation took place simultaneously both in the outer surface and inner surface. The movement of sublimation interface was obvious at this time. Along with the time, the slope of freeze-drying temperature curve became small, leading to slow sublimation rate. The movement of sublimation interface turned unclearly.

For the vertically placed artery, when heated at the bottom, the sublimation takes place both in the outer surface and inner surface at the same time. The sublimation interface slowly approaches to the middle of vessel wall. With time prolonged, resistance for heat and mass transfer in freeze-drying is increased, and the sublimation rate becomes slowly.

Wu JQ, Tao LR, Liu MF, Yin M. Micro-CT experimental study concerning movement characteristics of sublimation interface in freeze-drying preservation of the artery. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7): 1196-1199. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 前期实验发现冻干过程中物料内部的孔隙分部、空隙连通度等对内部传热传质影响较大, 但对于干燥过程热质迁移的机制未阐明。

目的: 在前期实验基础上, 以微CT为分析工具, 尝试对冷冻干燥过程中升华界面移动特性进行实验观察分析, 希望对血管冻干工艺提供参考。

方法: 以新鲜猪主动脉为材料使用微CT扫描仪的扫描成像、图像重构及灰度值分析技术对血管在冻干时升华过程进行观察分析。

结果与结论: 冻干温度曲线斜率初期较大, 升华速率较快, 由血管的二维横截面重构图像中可以看出冻干区与冰晶区的灰度值差别较大, 升华界面明显, 升华是在物料的外表面和内表面同时进行, 界面移动明显。随着时间推移, 温度曲线斜率变小, 升华速率也随之变慢, 界面移动逐渐不明显。对于竖直放置的血管在底部进行加热的干燥过程, 升华是在外表面和内表面同时进行的。升华界面逐渐向血管壁面中心移动。冻干过程随时间推移热质传递阻力增大, 升华速率减慢。

关键词: 冻干; 升华界面移动; 微CT扫描; 图像重构; 血管组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.07.013

吴建青, 陶乐仁, 刘萌芳, 殷猛. 血管冻干工艺过程中升华界面移动特性的微CT实验[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1196-1199. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

血管移植是治疗心血管疾病的一种有效手段^[1-4]。但是新鲜血管供体保存一直是个难题。

作者前期曾对血管冻干保存的方法进行了初步探索。在冻干过程中物料内部的孔隙分布, 空隙连通度等对内部传热传质影响较大^[5-11]。对于干燥过程热质迁移的机制尚未完全阐明, 其研究难度较大^[12-16]。

X射线能够无损的对物料内部结构进行检

测, 所以受到越来越多关注^[17-20]。Pyne等^[21]用X射线衍射技术检测了冷冻干燥保存中的相变情况。Schelenz等^[22]用X射线来探测冻干中的升华过程。马渊等^[23]利用微CT技术研究生物组织冻融前后内部结构变化。

文章以微CT扫描仪为分析工具, 利用X射线技术无损的对升华过程中物料内部结构进行检测, 使用微CT自带的图像重构软件得到物料的二维横截面, 分析图像灰度值的变化^[24-28], 尝试对冷冻干燥过程中升华界面移动特性进行实验观察分析。以期能对血管冻干保存提供理

论指导, 为血管冻干保存工艺优化提供参考。

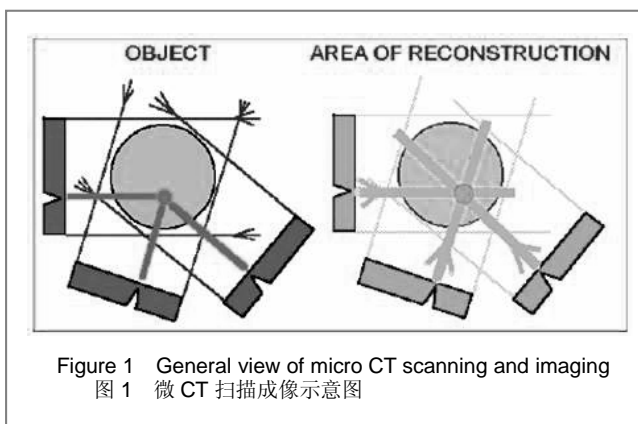
1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2009-02/05在上海理工大学低温生物医学技术研究所完成。

材料:

微CT扫描仪: 实验使用的微型CT扫描仪是比利时生产的Skyscan 1074HR。它利用X射线对物体内部进行断层扫描, 获得相关图像信息, 对物体内部结构和变化等进行分析。见图1, 旋转物体可得到同一高度不同角度的投影, 在任一高度截面进行二维图像重构得到各点灰度值的截面图, 以反映物体内部结构的差异。得到的索引模式的图像中灰度值255代表白色, 0则表示黑色。图像中不同的灰度值表示对X射线吸收的差异, 白色表示X射线吸收最少, 黑色则表示最多。



新鲜猪主动脉取自上海市复新生猪屠宰场。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[29]。

实验方法:

冷冻干燥过程: 实验采用美国 SP Industries 公司生产的Advantage 2.0 Benchtop Freeze Dryer。制冷系统为二级压缩, 预冻过程中搁板温度最低达到 -80°C 。在干燥过程中搁板温度可以在 $-80\sim+60^{\circ}\text{C}$ 之间任意控制, 冷阱温度 $\leq -85^{\circ}\text{C}$, 极限真空度可达到2 Pa。

操作方法: 将新鲜猪血管剪成15 mm每段, 竖直放在玻璃培养皿中, 然后将培养皿放置在冻干机搁板之上, 开始预冻。升华干燥开始每隔1 h取出一个样品, 放入微CT扫描仪中进行检测, 得到投影图, 然后采用tview软件进行二维重构, 每个截面间距取0.12 mm, 得到不同灰度的二维横截面图, 所有截面均取自同一高度(8 mm)便于对比观察。实验中采用相同的明暗度设置, 最高水平0.053, 最低水平0.008。

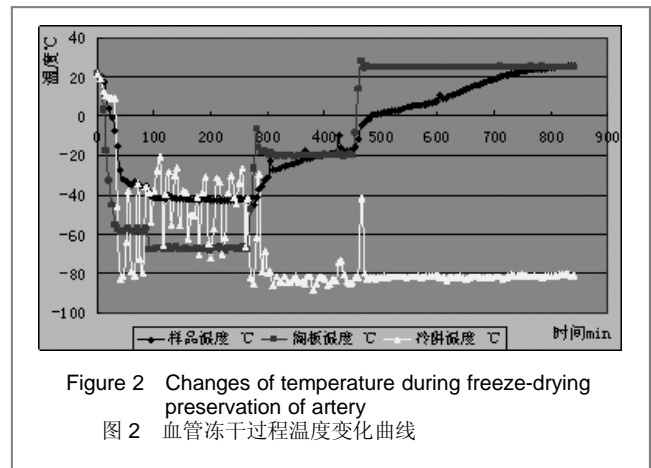
主要观察指标: ①冻干曲线。②微CT二维重构图像。

③升华界面移动特性。

设计、实施、评估者: 实验设计主要由第一和第二作者完成。全体作者参与了实验的实施和结果的分析评估, 操作和分析评估人员均接受过相关专业培训。

2 结果及分析

2.1 冻干曲线 见图2。



由图2可知样品预冻经过约260 min, 温度降至 -42.9°C , 并在此温度附近稳定了60 min, 确定预冻阶段结束。然后开始升华干燥, 此过程持续180 min左右, 时间相对较短, 可能是因为血管的壁很薄(只有1.0~2.0 mm), 而且是中空的结构, 比表面积较大, 样品采用竖直放置, 热量由底部传入, 升华干燥时自由水形成的冰晶转化为气相——水蒸气, 其传质面积大, 阻力小, 从而加快了升华干燥的进行。由于升华干燥过程中冰晶升华需要吸收热量, 因此当样品的温度达到设置的搁板温度并维持不变时, 认为升华干燥结束。二次干燥过程主要除去样品中的结合水, 由于血管外皮和内皮组织阻碍结合水扩散, 传质阻力较大, 所以二次干燥持续时间较长——约390 min。预冻过程中冷阱不需制冷, 无温度控制, 所以其温度起伏波动较大。

2.2 微CT二维重构图像 采用Tview软件对直接扫描获得的图像信息进行二维横截面的重构, 得到样品在不同时刻的横截面灰度图像。黑色代表样品对X射线的吸收, 颜色越深, 表示对X射线的吸收越多。由于冻干区冰晶升华后存在一定的孔隙, 所以对X射线的吸收较少, 呈现出浅灰色。而冰区由于样品比较致密且存在冰晶, 对X射线吸收较多, 所以呈现出较深的灰色, 甚至是黑色。这样就可以直观的从二维横截面灰度图像中看出冰晶区和冻干区, 以及冰晶的边缘——即升华界面。样品在升华干燥开始至冻干结束每隔1 h取样使用微CT扫描分析, 图3所示为样品不同时刻的二维重构图像。

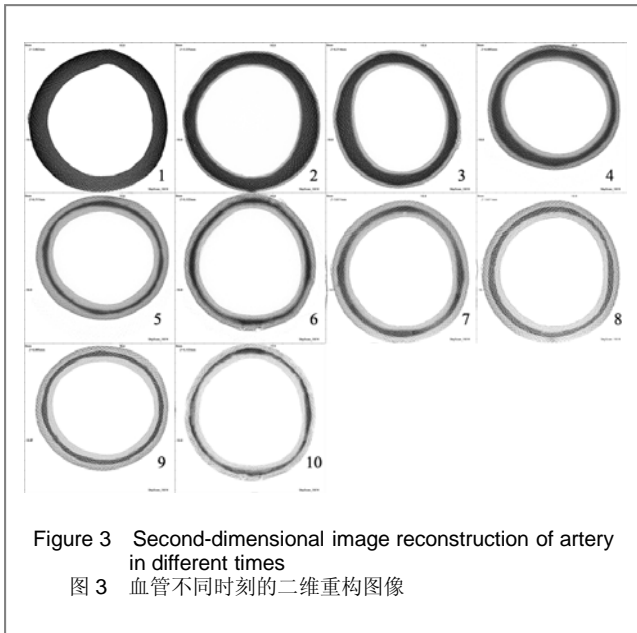


Figure 3 Second-dimensional image reconstruction of artery in different times
图3 血管不同时刻的二维重构图像

2.3 升华界面移动特性 从血管的二维重构图像可以看出冻干区与冰区呈现明显不同的灰度，升华界面也比较清晰。血管是中空的圆柱型物料，这种形状的物料比表面积较大，为升华进行提供了比较大的传质面积，所以刚开始升华干燥进行的比较快，升华界面移动比较明显。物料竖直放置在搁板上加热，升华不仅在物料的外表面进行，同时在内表面也有升华进行，所以从二维重构的横截面图像中可以看到升华界面是从内、外两侧同时向物料壁面中心移动。由于样品的壁较薄(只有1.0~2.0 mm左右)，物料受热比较均匀，冰晶也是很均匀的沿着圆柱表面进行升华，这与重构得到的图像上升华界面移动比较均匀符合。随着时间的推移，干燥层不断变厚，传质阻力增大，升华进行的较慢，界面移动变化较小。

进入二次干燥后，主要去除物料中的结合水分，样品所含水量会进一步降低，所以物料对X射线的吸收会越来越少，反应在二维重构的图像上面：图像中灰度值普遍升高，颜色变浅。在这一过程中样品重构得到的二维横截面图像中始终有一部分的颜色比较深，也即它对X射线的吸收比较多，这可能是血管自身的结构特征造成的。

由于血管本身并不是一种各向均一的材料，就血管的组织结构来说，动脉管壁都有内层、中层和外层组成。内层表面为单层扁平上皮，表面光滑；中层有丰富的环形平滑肌组成；外层系零星弹性纤维和胶原纤维组成^[30-32]。这样由于内层是较薄的内皮细胞层，外层系零星弹性纤维和胶原纤维，它们对X射线的吸收较少。而中层含有的丰富平滑肌对X射线吸收就较多，所以在图像上呈现出中间较深的颜色和内外边缘较浅的颜色。

3 结论

血管的冻干保存是个一个复杂的过程，当冻干开始时热质传递阻力较小，冻干温度曲线斜率初期较大，升华速率较快，由血管的二维横截面重构图像中可以看出冻干区与冰晶区的灰度值差别较大，升华界面明显，升华是在物料的外表面和内表面同时进行，界面移动明显。随着时间推移，干燥层增厚，热质传递阻力增加，温度曲线斜率变小，升华速率也随之变慢，界面移动逐渐不明显。同时由于血管材料性质的各向不均一，干燥后在二维重构图像中部的灰度值较小，颜色较深，与内外边缘部分较浅的颜色区别明显。

血管冻干保存是一种新型的保存方法，文章揭示了冻干保存过程中升华界面的移动特性和热质传递，以期有助于对血管冷冻干燥保存机制的探讨，并对血管冻干保存工艺参数的选择控制和优化提供参考。

4 参考文献

- Wang XT, Weng PG, Huang ZY, et al. Xifei Xueguanbing Zazhi. 2000;19(3):216-219. 王晓谭, 翁品光, 黄志勇, 等. 冻干辐照人脐动脉移植的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2000, 19(3):216-219.
- Xue L, Zhang PH. Zhonghua Shiyian Waikexue. 1998;15(4):341-342. 薛莲, 张培华. 冻干和辐照对同种异体血管免疫原性的影响[J]. 中华试验外科杂志, 1998, 15(4):341-342.
- Zhao S, Luo J, Sai Li Kema Gao WY, et al. Xinjing Yike Daxue Xuebao. 2000;23(4):348-350. 赵胜, 罗军, 赛力克·马高维亚, 等. 冻干与辐照前后人脐静脉同种异体抗原和组织结构的变化[J]. 新疆医科大学学报, 2000, 23(4):348-350.
- Xiang DZ, Zhao Y, Wang XH, et al. Zhongguo Putong Waikexue. 2008;17(6):551-555. 向东洲, 赵渝, 王学虎, 等. 冻干辐照后异体小血管的组织结构、物理性能及抗原性变化[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(6):551-555.
- Hua ZZ. Beijing: Science Press. 2006. 华泽钊. 冷冻干燥新技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- Venkatasubramanian RT, Grassl ED, Barocas VH, et al. Effects of Freezing and Cryopreservation on the Mechanical Properties of Arteries. Ann Biomed Eng. 2006;34(5):823-832.
- Zhao H, Xu QX, Wu YF, et al. Gandan Waikexue. 2008;16(1):32-35. 赵晖, 徐庆祥, 吴亚夫, 等. 复温速率对冷冻保存的同种异体血管结构功能的影响[J]. 肝胆外科杂志, 2008, 16(1):32-35.
- Zhao G, Lei D, Zhang B, et al. Gongcheng Rewuli Xuebao. 2007, 28(Suppl2):52-54. 赵刚, 雷冬, 张保, 等. 降温速率对低温保存动脉粘弹性的影响[J]. 工程热物理学报, 2007, 28(增刊2):52-54.
- Wang PT, Shu ZQ, He LQ, et al. The Structure and Cellular Viability in Cryopreserved Rabbit Carotid Arteries. J. Surg. Res. 2006;131(2):241-251.
- Song, YC. Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: Optimaization of dimethyl sulphoxide concentration and cooling rate. Cryobiology. 1995;32:405-421.
- Zhang B. Anhui Yike Daxue. 2008. 张保. 降温速率对程序化降温低温保存动脉的影响的初步研究[D]. 安徽医科大学, 2008.
- Zhou ZP, Chen L, Ma HS, et al. Beijing Shengwu Yixue Gongcheng. 2007;26(2):43-46. 周振平, 陈雷, 马洪顺, 等. 大鼠自体动、静脉移植的血管黏弹性实验研究[J]. 北京生物医学工程, 2007, 26(2):43-46.
- Hunt CJ. Fractures in cryopreserved arteries. Cryobiology. 1994; 31:506-515.
- Xu HY, Hua ZZ, Lu YN, et al. Diwen Gongcheng. 2000;(1):22-26. 徐红艳, 华泽钊, 鲁亚男, 等. 血管低温保存降温过程对裂纹产生影响的实验研究[J]. 低温工程, 2000, (1):22-26.
- Shi Y, Zheng Y, Yu H, et al. Diwen yu Chaodao. 2006;34(2):23-25. 史英, 曾叶, 虞华, 等. 生物材料低温保存过程及最新进展[J]. 低温与超导, 2006, 34(2):23-25.

- [16] Xi DC,Tao LR,Xiao X,et al. Diwen yu Chaodao. 2006;34(6):471-474.
习德成,陶乐仁,肖鑫,等. 新型生物医药实验用低温冷冻干燥机的研制[J].低温与超导,2006,34(6):471-474.
- [17] Xiao X,Tao LR,Xi DC,et al.Zhongguo Yixue Wulixue Zazhi. 2007;24(1):45-48.
肖鑫,陶乐仁,习德成,等. 冻干红细胞干燥过程及冻干样品的微CT实验分析[J].中国医学物理学杂志,2007,24(1):45-48.
- [18] Wu D,Peng XF.Rekexue yu Jishu.2006;5(2):37-42.
吴迪,彭晓峰.多孔介质浸湿过程水分迁移的微CT分析[J].热科学与技术,2006,5(2):37-42.
- [19] Zhang Y,Peng XF.Gongcheng Rewuli Xuebao. 2005;26(5):41-44.
张扬,彭晓峰.多孔材料内部结构的微CT扫描仪分析[J].工程热物理学报,2005,26(5):41-44.
- [20] Xiao X,Tao RL,Xi DC,et al.Diwen yu Chaodao. 2007;(01) .29-33.
肖鑫,陶乐仁,徐振立,等. 冷冻干燥中升华过程界面的微CT观察及气固相变分析[J].低温与超导,2007,35(1):29-33.
- [21] Pyne A, Chatterjee K, Suryanarayanan R.Crystalline to Amorphous Transition of Disodium Hydrogen Phosphate during Primary Drying. Pharmaceutical research.2003;20(5): 802-803.
- [22] Schelenz G, Engel J, Rupprecht H. Sublimation During Lyophilization Detected by Temperature Profile and X-ray Technique. International Journal of Pharmaceutics. 1995;113(2), 133-140
- [23] Ma Y,Wu HL,Peng XF.Yingyong Jichu yu Gongcheng Kexue Xuebao. 2004;12(1):55-60.
马渊,吴海玲,彭晓峰.生物组织冻融特性的初步实验研究[J].应用基础与工程科学学报,2004,12(1):55-60.
- [24] Li P,Zhang YA,Wang BH,et al.Dongbei Daxue Xuebao.2006;27(1):57-61.
李平,张延安,汪秉宏,等.灰度阈值对图像分形特征参数提取的分析[J].东北大学学报:自然科学版,2006,27(1):57-61.
- [25] Wang Y,Guo XJ,Yu XJ,et al.Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao. 2008;23(6):35-39.
汪毅,郭显久,于晓静,等.基于二值化的数学形态学生物图像边缘检测算法[J].大连水产学院学报,2008,23(6):35-39.
- [26] Zhang WJ, Pan XL.Keji Zixun. 2006,(14):61-64.
张文娟,潘晓岚.基于灰度直方图的阈值分割算法分析与比较[J].科技资讯,2006,(14):61-64.
- [27] Guo J,Wang GK.Jijing Shifan Zhuanke Xuexiao Xuebao. 2005;26(3):73-76.
郭娟,王广阔.灰度图像的最佳阈值分割算法[J].济宁师范专科学校学报,2005,26(3):73-76.
- [28] Tian Y,Wan ZY.Weijisuanji Xinxi. 2007;23(24):38-43.
谭优,王泽勇.图像阈值分割算法实用技术研究及比较[J].微计算机信息,2007,23(24):38-43.
- [29] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2006-09-30.
- [30] Chu Y,Xu XL,Wang HY.Dianzi Xianwei Xuebao. 2006;25(6):52-55.
褚雁,徐新林,王红月.扫描电镜血管内皮细胞硝酸银染色方法的改良[J].电子显微学报,2006,25(6):52-55.
- [31] Xu HY.Shanghai:Shanghai Ligong Daxue. 2000.
徐红艳.主动脉血管组织低温保存与低温断裂的初步研究[D].上海:上海理工大学,2000.
- [32] Sun L,Chi YF,Lin MS,et al.Zhongguo Bijiao Yixue Zazhi. 2008;18(8):43-46.
孙龙,池一凡,林明山,等.猪主动脉脱细胞血管基质制备[J].中国比较医学杂志,2008,18(8):43-46.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 本文实验过程及结果与任何团体、组织没有任何利益冲突。

课题价值: 文献关于血管冻干方面的研究大多是将冻干作为一种免疫处理方法来降低血管移植的抗原性,提高组织适应性,而对血管冻干保存方面的研究较少,实际的冷冻干燥是一个传热传质的复杂过程,过程中温度、压力等参数的控制对冻干血管的品质影响很大。文章采用微CT扫描技术旨在揭示冻干保存过程中升华界面的移动和热质传递特性,希望对血管冻干保存工艺提供参考。

选题设计与构思: 实验采用单一样本观察,观察猪主动脉在冻干不同时刻的温度变化和升华界面的移动特征,这样有利于分析血管冻干模型,进而计算冻干过程中的热质传递,从而选择合适的血管冻干保存工艺参数。

方法创新: 利用微CT扫描仪为分析工具,利用X射线技术无损的对升华过程中物料内部结构进行检测,使用微CT自带的图像重构软件得到物料的二维横截面,分析图像灰度值的变化,尝试对冷冻干燥过程中升华界面移动特性进行实验观察分析,可能对血管冻干保存提供理论指导,为血管冻干保存工艺优化提供参考。研究内容具有较好的创新型。

倚或不足: 实验仅选择猪主动脉进行观察,覆盖面较窄。猪主动脉和人动脉血管还是有一定区别,因此实验结果可能会对人动脉血管的保存有一定的偏差。此外实验采用的加热方式为竖直放置,对其他加热方式可能有不同。实验后期如能将样品进行动物实验检测可能会取得更好结果。