

소폐동맥 내피세포를 이용한 인조혈액접촉표면의 혈액 적합성

김원곤* · 광영태** · 유세영*

=Abstract=

Blood Compatibility of Artificial Blood-Contacting Surface Seeded with Cultured Bovine Endothelial Cells

Won Gon Kim, M.D.*, Young Tae Kwak, M.D.**, Sae Young Yoo, M.D.*

Synthetic and biosynthetic vascular grafts of small diameter have long been considered to be prone to thrombosis, ultimately leading to the complete graft occlusion. Endothelial cell seeding onto synthetic blood-contacting surfaces has been suggested to be an ideal means to solve this problem. This study described a culture method of bovine endothelial cells and evaluated blood-compatibility and seeding efficiency of cultured endothelial cells.

Bovine pulmonary artery endothelial cells were harvested enzymatically and grown to confluence on polystyrene culture flask surfaces using established techniques. The identification of endothelial cells was made through the demonstration of expression of factor VIII R:Ag by immunofluorescent technique. To quantitate the effect of improvement in blood-compatibility of viable endothelial cells, endothelial monolayers were exposed to blood containing ¹¹¹In-oxine labeled platelets. Viable endothelial monolayers retained less labeled platelets than control surfaces. The Indium-labeled endothelial cells were seeded onto three different blood-contacting surfaces of Dacron vascular graft immobilized in specially equipped wells and incubated for specific time intervals (t = 15, 30, 60, 120 minutes). Longer incubation times showed improved cell adherence in collagen-coated and fibrin-coated Dacron vascular graft groups. However in untreated Dacron grafts, no direct relationship was observed between incubation time and endothelial cell seeding efficiency. This may be due to leakage of endothelial cells through porosity of Dacron grafts in this in-vitro experimental condition.

(Korean J Thoracic Cardiovas Surg 1993;26:80-5)

Key words : Endothelial cell seeding, Vascular graft.

서 론

인조혈관은 폐쇄성 동맥질환환자의 수술에 있어 필수적인 도구중의 하나이다. 그러나 이러한 인조혈관도 대동맥 등 큰 혈관을 대체할 목적으로 사용될 때는 비교적 안정된 임상경과를 보이지만, 이른바 소구경 (small-diameter)인조

혈관의 경우에는 아직까지 만족스럽지 못한 임상경과를 보이고 있다. 여러가지 연구결과를 종합하면 내경 4mm 이하의 인조혈관을 사용할 경우 수술후의 장단기 개방율 (patency rate)이 현저히 감소하는 것으로 되어있다¹⁾. 소구경 인조혈관의 개방율을 떨어뜨리는 가장 큰 요인중의 하나가 인조혈관의 내면이 혈액과 접촉하면서 생기는 혈전 (thrombus)의 발생이다²⁾.

한편 혈관내피세포는 혈관벽의 가장 내면을 싸고있는 단층의 세포군으로 우리 몸의 자가혈관에서 정상적으로 혈전의 생성을 억제하는 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 내피세포의 항혈전성에 착안하여 1970년 대말부터 소구경 인조혈관의 내면에 인위적인 파종 (seeding)과정을 거쳐 내피세포층을 만들어주면 인조혈액접촉

* 경희대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Kyung Hee University

** 인제대 상계백병원 흉부외과

** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery Inje University Sanggye Paik Hospital

표면의 항혈전성을 높이는데 결정적인 작용을 할 것이라는 의견이 제시되었다³⁾. 이후 여러 측면에서 인조혈액접촉 표에다 내피세포를 파종하는 방법 및 그 효과에 관한 연구가 세계적으로 활발히 진행되어 오고있다. 그러나 내피세포파종에 의한 인조혈관의 혈액적합성 개선에 관한 연구는 그 학문적인 중요성에도 불구하고 아직까지 국내에서는 이에 관한 연구활동이 매우 미미한 실정이다. 본 연구의 목적은 일차적으로 내피세포의 배양법 및 혈액적합성 실험분석방법을 정립하고, 이에 따라 내피세포파종에 의한 인조혈관의 항혈전성 개선을 실험적으로 증명하면서 궁극적으로는 실제 임상적용에 대한 기초를 만드는데 그 목적이 있다.

대상 및 방법

1. 소의 폐동맥을 이용한 혈관내피세포의 채취 및 배양법

소정의 방법에 따라 서울시 보건환경연구원의 협조하에 도축장에서 신선한 상태의 소폐동맥을 얻었다. 이때 혈관 내부는 무균상태를 유지해주었으며, 절제한 폐동맥은 얼음상자에 담아 즉시 세포배양실로 운반하였다. 배양실에서 폐동맥을 충분히 세척한 후에 collagenase (Worthington Biomedical Company, 192 unit/mg) 용액을 주입하고, 섭씨 37도의 물통에서 20분간 항온배양(incubation)하였다. 항온배양후 분리된 내피세포를 포함한 collagenase 용액을 주사기로 흡입채취하였다. 채취된 내피세포 부유액(endothelial cell suspension)을 원심분리튜브에 조직배양액과 함께 넣고 섭씨 20도에서 1200 RPM (350g)으로 12분간 원심분리시켰다. 상청액(supernatant)을 제거한후 내피세포 펠리트(pellet)에 조직배양액을 혼합하여 펠리트를 재부유(resuspension)시켰다. 재부유액을 4cc씩 polystyrene 세포배양 플라스크에 옮기고, 섭씨 37도, 90% 습도, 그리고 5% 이산화탄소의 조건에서 항온배양 하였다.

계대배양(subculture)은 먼저 통상 배양 4~6일후에 세포가 완전히 confluence를 이룬 것을 역상대조현미경(inverted contrast microscopy)으로 확인한뒤 소정의 세척과정을 거쳐 trypsin/EDTA 용액을 배양플라스크에 첨가하고 섭씨 37도에서 10분간 항온 배양하였다. 그런뒤에 플라스크내의 혼합용액을 채취한뒤 이를 완전배양액과 혼합하고 섭씨 20도에서 1200 RPM으로 10분간 원심분리시켰다. 튜브내의 상청액을 제거하고 남아있는 펠리트는 3ml의 완전 배양액으로 재부유시키고 이를 완전 배양액을 추가로 첨가하여 일정한 양을 만든뒤에 배양 플라스크에 재배양 시켰다.

2. 혈관내피세포의 확인

배양된 세포가 혈관내피세포인지의 확인은 내피세포내의 제8인자 연관항체(factor VIII related antigen, von Willebrand factor)에 대한 일차 항원(Immunotech, cat. # 0803) 100 마이크로리타로 항원-항체 반응을 일으킨뒤 fluorescein isothiocyanate (FITC) 표식 이차항원 100 마이크로리타로 처리하여 이를 형광 현미경(Olympus BH-2)으로 400배율하에서 관찰하였다.

3. 혈소판부착정도에 의한 내피세포의 혈액적합성 분석

1) 실험군 및 대조군

내피세포군이 confluence를 이루고 있는 배양플라스크를 실험군으로 하였다. 그리고 동일한 조건의 배양플라스크에 2.5% glutaraldehyde 4.0ml씩을 첨가하여 내피세포들을 고정시킨 것을 제1대조군, 배양플라스크를 아무런 처리없이 phosphated buffered solution (PBS)으로 세척한 것을 제2대조군으로 사용하였다.

2) 혈액적합성 분석

전술한 3종류의 배양플라스크에 인디움이 부착된 혈소판을 함유한 혈액을 접촉시킨뒤 혈소판의 표면부착의 양적정도를 gamma counter (Beckmann Instruments)로 측정하여 혈액적합성을 정량분석하였다.

인디움(Indium-oxine)에 의한 혈소판 표식방법은 먼저 소의 신선전혈 100ml을 채혈한뒤 8:2의 비율로 ACD 항응고용액과 혼합시키고, 이를 350g에서 20분 동안 원심분리시켰다. 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma)으로 구성된 상청액을 수거하여 다시 1,000g에서 20분동안 원심분리시켰다. 상청액인 혈소판결핍 혈장(platelet poor plasma)은 보관해두고 혈소판으로 구성된 펠리트는 tyrode-ACD 용액(9:1) 10ml로 재부유시켰다. 이를 다시 1,000g에서 20분동안 원심분리시키고 여기서 얻어진 혈소판펠리트를 다시 재부유시켰다. 그런뒤에 200 마이크로큐리의 인디움(Indium-oxine)을 재부유용액에 첨가하고 이를 섭씨 37도에서 30분간 항온배양 시켰다. 항온배양후에 이전에 수거 보관해 놓고있는 혈소판결핍혈장을 10ml 첨가하여 혼합시켰다. 다시 혼합용액을 1,000g에서 10분간 원심분리시키고 상청액은 제거하였다. 펠리트를 소의 전혈(whole blood) 50ml로 재부유시켜 인디움표식 혈소판을 함유한 전혈을 만들었다.

각 실험 및 대조군 플라스크에 인디움표식 혈소판을 함유하고 있는 전혈을 플라스크당 2.0ml씩 주입하고 회전기에서 섭씨 37도로 3시간 동안 항온배양시켰다.

항온배양후에 각 실험표면들을 생리적식염수로 철저히

세척한뒤 표면에 부착된 혈소판들은 88% formic acid으로 처리하여 표면에서 분리시켰다. 각 실험 및 대조군 플라스크에서 0.5ml 용액씩을 채취하여 이들의 방사능을 감마계수기로 측정하였다. 각각의 실험 및 대조군마다 3개씩의 플라스크를 사용하여 측정하였다.

4. 인조혈관의 혈액접촉표면과 내피세포의 접촉시간에 따른 부착능의 비교 분석

1) 실험군

인조혈관의 혈액접촉표면을 보통의 대크론 인조혈관(untreated Dacron graft), 콜라겐(collagen)으로 전처리된 대크론인조혈관, 그리고 파이버린(fibrin)으로 전처리된 대크론인조혈관 3개의 실험군으로 나눈뒤에, 인디움 표식 내피세포를 일정한 시간간격으로(15분, 30분, 60분, 120분) 접촉시켜 접촉시간경과에 따른 내피세포부착능의 차이를 관찰하였다.

2) 단순 대크론 인조혈관은 8mm Microvel double velour Dacron vascular graft(Meadox Medicals Inc)을 절편을 이용하였다. 파이버린으로 전처리된 인조혈관은 똑같은 조건의 8mm 대크론 인조혈관에 Yates 등⁴⁾에 의해 개발된 4단계 전응고법(preclotting)으로 혈액접촉표면의 파이버린코팅을 시행하였다. 콜라겐코팅은 상업적으로 콜라겐이 코팅되어 있는 제품(Hemashield Microvel double velour vascular graft, meadox medicals Inc)을 사용하였다. 각각의 혈액접촉표면에는 모두 1cm²의 절편을 사용하였다.

3) 내피세포의 인디움표식방법은 먼저 배양플라스크들을 trypsin-EDTA(Gibco Grand Island., New York, USA) 용액으로 처리하여 내피세포들을 소화분리시키고 이를 PBS로 2차례 세척하였다. 그런뒤에 내피세포 3.0 × 10⁶을 3.0ml의 PBS로 재부유시키고 여기에다 인디움 150 마이크로큐리를 첨가하였다. 용액이 든 튜브를 섭씨 37도로 유지된 물통에서 일정간격 흔들어주면서 항온배양 시킨뒤 원심분리하고 상청액은 제거하였다. 남은 내피세포펠릿을 칼슘과 마그네슘이 없는 Hank's balanced salt solution으로 재부유시키면서 2차례 세척하였다. 최종적으로 내피세포들을 완전 배양액으로 재부유시키고 내피세포의 농도는 2.0 × 10⁵/ml로 유지시켰다.

4) 각각의 혈액접촉표면을 함유하고 있는 용기(well)에 인디움표식 내피세포용액 30.5ml씩을 넣고 정해진 시간에 따라 접촉시킨후 이들 인조혈관들을 각각 감마계수기에서 방사능을 측정하여 이를 정량 분석하였다.

1. 소 폐동맥의 내피세포의 배양과 형태

내피세포들은 처음에는 둥근 형태의 세포들로 작은 덩어리들을 이루면서 배양액중에 떠 있다가, 곧 플라스크 바닥에 부착하면서 다변형 세포(polygonal cells)이 근접해 있는 작은 군집들을 이루었다. 배양플라스크에서 4~5일간의 성장후에 이 세포군집들은 단층(monolayer)을 이룬 상태에서 완전한 세포간의 합류상태(confluence)를 만들었다(그림 1).

각각의 세포는 3~4개의 핵인(nucleolus)을 함유한 한개의 난원형 핵을 가지고 있었다. 세포들은 계대배양을 거치면서 그 크기가 다소간 커지면서 비전형적인 형태를 띠었다.

2. 내피세포의 확인

내피세포의 확인은 세포내에 제 8인자 연관 항원(factor VIII related antigen)의 존재를 입증하여 증명하였다. 연구방법에서 기술한대로 세포들을 처리한뒤 면역형광 현미경으로 관찰한 결과 세포내에 뚜렷한 형광성이 관찰되었다(그림 2). 형광성은 주로 세포질내에서 관찰되었으며 세포핵에서는 거의 관찰되지 않았다.

3. 내피세포의 혈액적합성 분석

표 1)에서와 같은 결과를 얻었다.

4. 인조혈관의 혈액접촉표면과 내피세포의 접촉시간에 따른 부착능의 비교 분석

표 2)에서와 같은 결과를 얻었다.

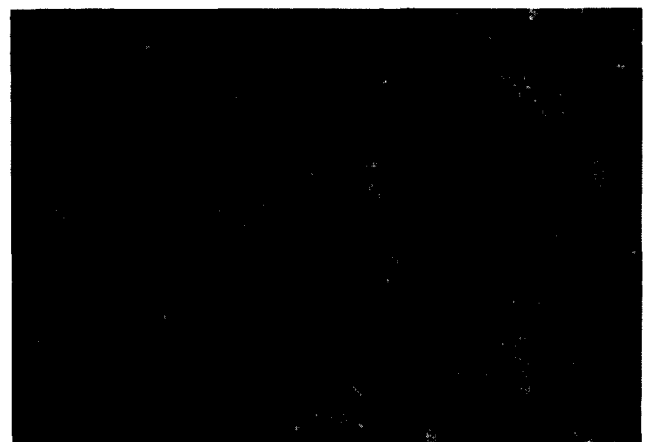


그림 1. 완전한 세포간의 합류상태(Confluence)를 이룬 상태에서의 소폐동맥 내피세포

결 과



그림 2. 면역 형광현미경하의 내피세포내 제 8인자 연관항원의 증명

된 것이 증명되었다고 보고하였다. 내피세포의 효소적 채취법은 Graham 등에 의해 소개되었다⁵⁾. 그들은 stainless steel 막대기에 뒤집어 씌운 정맥절제편을 collagenase 로 처리하여 내피세포를 채취하였는데, 그후 효소적 방법은 내피세포의 채취에 가장 효율적인 방법으로서 보편적으로 사용되기 시작하였다.

과거 오래동안 내피세포의 기능에 관한 생체의 (in vitro) 실험방법은 내피세포의 균일한 세포군을 선택적으로 분리하는 방법의 결여로 인해 많은 어려움을 겪어왔다. 일찍이 내피세포를 선택적으로 분리하여 배양하려는 첫 시도가 1920년 Lewis 에 의해 시도되고^{6, 7)}, 1963년에는 두 연구그룹들이 각각 독립적으로 사람의 제정맥 (umbilical cord vein)과 토끼의 대동맥을 trypsin 으로 관류시켜 내피세포

표 1. 혈액접촉표면에 따른 혈소판 부착의 분석

실 험 군	Count per Minute	평 균
각 실험군의 표면에 접촉하는 기준 혈액양속의 방사능		449,868
실험군의 혈액접촉표면에 부착된 혈소판 방사능	3,984 / 4,565 / 5,557	4,702
대조 1군의 혈액접촉표면에 부착된 혈소판 방사능 (그림 9)	8,152 / 7,143 / 9,214	8,170
대조 2군의 혈액접촉표면에 부착된 혈소판 방사능	12,616 / 12,970 / 12,570	12,719

표 2. 인조혈관의 혈액접촉표면과 내피세포의 접촉시간에 따른 부착능의 비교분석

혈액접촉표면 / 내피세포 접촉시간	15 분	30 분	60 분	120 분
1. 단순 대크론 인조혈관 (CPM) #	848,669	792,964	737,536	715,516
	118.6 %*	110.8 %*	103.1 %*	100.0 %*
2. 파이브린 처리 대크론 인조혈관	134,345	214,150	309,955	336,876
	39.9 %*	63.6 %*	92.0 %	100.0 %*
3. 콜라젠 처리 대크론 인조혈관	436,653	496,050	654,359	692,418
	63.1 %*	71.6 %*	94.5 %*	100.0 %*

* CPM ; Count per Minute.

* 120 분의 내피세포의 부착량을 100 % 로 하였음.

고 찰

인조혈관에 내피세포를 파종함으로써 소구경 인조혈관의 항혈전성을 개선시켜 보려는 시도는 1978년 미국의 Herring 등에 의해 실험적으로 처음 시도되었다³⁾. 당시 그들은 개의 정맥내면을 steel wool pledget 로 기계적으로 자극하여 내피세포들을 분리채취한후, 혈액과 함께 혼합하여 대크론 인조혈관을 전용고시켰다. 실험건의 복부대동맥에 삽입실험결과 내피세포를 미리 파종시킨 인조혈관에서 대조군에 비해 혈액접촉표면의 내피화가 현저히 향상

의 분리 채취를 시도하였으나 성공적이지는 못하였다⁸⁾. 보다 성공적인 내피세포의 배양실험은 1973년 Jaffe 등이 collagenase 로 사람의 제정맥을 관류시켜 내피세포를 분리 채취함으로써 이루어졌다⁹⁾. 이들의 방법으로 내피세포의 채취율및 배양시 증식율도 높아지고 섬유아세포나 평활근 세포로부터의 오염도 줄일 수가 있었다. 그리고 이와 동시에 소나 돼지 등 동물의 대혈관들을 이용한 내피세포배양도 성공적으로 이루어지기 시작하였다.

본 연구에서 내피세포의 채취원으로 사용한 소의 폐동맥은 도축장에서 비교적 용이하게 무균적으로 획득할 수 있으며 성장인자 (growth factor)의 첨가없이도 세포배양

플라스크에서 활발히 증식할 수있는 이점이 있다. 실제 본 실험에서도 소의 폐동맥에서 채취된 내피세포들은 보통 배양시작 4~5일후에 배양플라스크 바닥에서 단층의 완전한 confluence를 일으키는 것이 관찰되었다. 또 실험 과정에서 한례에서도 세균감염이나 섬유아세포 및 평활근세포에 의한 오염이 일어나지 않아 본 연구에서 시행한 내피세포의 채취 및 배양방법이 우수하다는 것이 입증되었다.

내피세포의 확인방법으로는 제 8 응고인자 연관항원 (factor VIII related antigen)의 존재를 확인하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다¹⁰⁾. 제 8 응고인자 연관항원은 von Willebrand factor로도 불리는 물질로, 혈관벽의 내막에서 그 존재가 규명된 것은 1977년 Jaffe에 의해서였다¹¹⁾. 본 실험에서는 제 8인자 연관항원을 항체로 하는 monoclonal antibody를 사용하여 면역형광법에 의해 제 8인자 연관항원의 존재를 확인하였다. 관찰결과 형광성은 세포핵에서는 거의 발견되지않고 주로 세포질에 국한되어 있었는데 이런 소견은 기왕의 문헌보고들과 일치하는 소견이었다¹²⁾.

혈소판을 방사선동위원소로 표식시킨뒤 혈액접촉 인공 표면에 혈소판이 부착되는 정도를 감마 계수기 (gamma counter) 등으로 정량분석하는 방법은 어떤 인공표면의 혈액적합성을 분석하는데 많이 사용되는 방법중의 하나이다. 본 실험에서는 혈소판을 표식시키기 위한 방사선 동위원소로 인디움 (Indium-oxine)을 사용하였다. 인디움은 빨리 섭취되고, 표식율이 높으며, 혈소판의 과립탈실시에 안정성을 유지하며, 반감기가 짧다는 점에서 (67시간의 반감기) 이런 종류의 실험에서 가장 많이 사용되고 있는 방사선 동위원소이다¹³⁾. 인디움으로 표식된 혈소판을 함유한 혈액을 3시간동안 각 실험군 플라스크에 접촉시킨뒤 혈액 접촉표면에 부착된 혈소판의 수를 감마 계수기로 측정하였다. 실험결과는 예견했던대로 살아있는 내피세포군에서 가장 적은 양의 방사성이 측정되어 (고정된 내피세포군의 58%, 그리고 polystyrene 표면의 37%), 대조실험군들에 비해 우수한 혈액적합성을 지니고 있다는 것이 증명되었다. 여기서 한가지 특기할만한 사실은 내피세포를 고정처리한 군에서도 비록 살아있는 내피세포군보다는 못하지만은 단순 polystyrene 표면에 비해서는 혈소판부착이 현저히 감소되었다는 것이다. 이는 향후 살아있는 내피세포뿐만 아니라 고정된 내피세포로도 어느 정도의 항혈전성개선 가능성을 제시해주고 있는 것으로 잠정해석할 수 있다.

실험의 다음 단계로 단순 대크론인조혈관, 콜라젠코팅 인조혈관, 그리고 파이프린코팅된 인조혈관의 3가지 혈액 접촉표면에 각각 15분, 30분, 60분, 120분의 시간별로 내피세포를 접촉시킨뒤에 내피세포의 부착정도를 비교분석하였다. 이때 내피세포의 인조혈관 파종율 (seeding ef-

iciency)을 측정하기 위하여 먼저 내피세포를 인디움으로 표식시켰다¹⁴⁾. 이 방법으로 인조혈관의 표면에 부착된 내피세포의 전체 방사성을 측정하는 방법은 내피세포의 파종율을 분석하는 방법으로서 radioautography를 이용하거나 또는 인조혈관절편을 전자현미경으로 관찰하는 방법보다 더 정확한 것으로 되어 있다. 또 이러한 내피세포의 인디움표식과정은 내피세포의 생존이나 부착능에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 알려지고 있다¹⁵⁾.

본 실험에서는 콜라젠이나 파이프린으로 코팅된 대크론 인조혈관의 경우에는 접촉시간이 길수록 내피세포의 부착 정도가 많아진다는 것이 입증되었다. 파이프린 코팅의 경우 콜라젠 코팅에 비해 비교적 초기에 (15분) 높은 파종율을 보이는 것이 특징이었다 (39.9% 대 63.1%). 그러나 30분 접촉시간부터는 서로 근접된 파종율을 보였다. 단순 대크론 인조혈관의 경우 접촉시간이 경과할수록 오히려 내피세포의 부착량이 줄어든 것으로 나와 분석에 난점을 제기하였다. 이는 아마 생체삽입실험에서와는 달리 본 실험에서는 단순 대크론인조혈관의 경우 혈액과 접촉할 기회가 없었기 때문에 실험과정중 인조혈관의 유공성 (porosity)이 계속 유지되어 시간경과에 따라 부착이 잘 되지 않았던 내피세포가 구멍을 통해 바닥으로 빠져나간 것이 큰 이유일 것으로 추정된다.

결 론

소폐동맥 내피세포를 배양증식시킨뒤 이를 이용하여, 내피세포파종에 따른 혈액접촉표면의 혈액적합성분석과 인조혈관의 성상의 변화에 따른 내피세포의 부착능 분석을 시행하여 소정의 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

References

1. Callow AD. *History of vascular graft development*. In: Kambic HE, Kantrowitz A, P Sung P, eds. *Vascular graft update*. Philadelphia: ASTM Special Technical Publication, 1986:13.
2. Hoffman AS. *Modification of material surface to affect how they interact with blood*. In: Leonard EF, Turitto VT, Vroman L, eds. *Blood in Contact with Natural and Artificial Surfaces*. New York: The New York Academy of Sciences, 1987:96-101.
3. Herring M, Gardner A, Glover J. *A single-staged technique for seeding bascular grafts with autogenous endothelium*. *Surgery* 1978;84:498-504.
4. Yates SG, et al. *The preclotting of porous arterial prostheses*. *Ann Surg* 1979;188:611-22.
5. Graham LM, Vinter DW, Ford JW, Kahn RH, Burkel WE, Stanley JC. *Endothelial cell seeding of prosthetic vascular gra-*

- fts. Early experimental studies with cultured autologous canine endothelium.* Archives of Surgery 1980;115:929-33.
6. Lewis WH. *Smooth muscle and endothelium in tissue cultures.* Anat Rec 1921;21:72.
 7. Lewis WH. *The outgrowth of endothelium and capillaries in tissue culture,* John Hopkins Med J 1931;48:242-53.
 8. Pomerat CM, Slick WC. *Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture.* Nature 1963;198:859-61.
 9. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins: Identification by morphologic and immunologic criteria.* J Clin Invest 1973;52:2745-56.
 10. Wagner DD, Marder VJ. *Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: Processing steps and their intracellular localization.* J Cell Biol 1984;99:2123-30.
 11. Jaffe EA. *Endothelial cells and the biology of factor VIII.* N Engl J Med 1977;296:377.
 12. Macarak EJ, Howard BV, Kefalides NA. *Properties of calf endothelial cells in culture.* Lab Invest 1977;36:62-7.
 13. Kempczinski RF, Douville EC, Ramalanjaona G, gle JD, Silberstein EB. *Endothelial cell seeding on a fibronectin-coated substrate.* In: Herring M, Glover JL, eds. *Endothelial Seeding in Vascular Surgery.* Orlando: Grune & Stratton, Inc, 1987:57-77.
 14. Sharefkin JB, Lather C, Smith M, Rich NM. *Endothelial cell labeling with indium-111-oxine as a marker of cell attachment to bioprosthetic surfaces.* J Biomed Mat Res 1983;17:345-457.
 15. Lingblad B, Wright SW, Sell RL, Burkel WE, Graham LM, Stanley JC. *Alternative techniques of seeding cultured endothelial cells to ePTFE grafts of different diameters, porosities, and surfaces.* J Biomed Mater Res 1987;21:1013-22.