



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의 학 박 사      학 위 논 문

림프절 절제술 후  
림프절 전이술과 Tacrolimus 도포의  
예방적 효과 연구 : 동물실험

Prophylactic effects of vascularized lymph node  
transplantation and topical Tacrolimus after rabbit  
hind limb lymph node excision

울 산 대 학 교 대 학 원  
의 학 과  
이 형 철

림프절 절제술 후  
림프절 전이술과 Tacrolimus 도포의  
예방적 효과 연구 : 동물실험

지 도 교 수 김 은 기

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2 0 2 2 년 1 월

울 산 대 학 교 대 학 원  
의 학 과  
이 형 철

이형철의 의학 박사 학위 논문을 인준함

심사위원	홍	준	표	인
심사위원	엄	진	섭	인
심사위원	김	은	기	인
심사위원	서	현	석	인
심사위원	윤	을	식	인

울산대학교 대학원

2022년 1월

## 국문요약

### 연구 목적

림프절 전이술은 림프부종이 있는 환부에 다른 부위에 있는 림프절을 이식하여 새로운 림프액 순환이 이루어지도록 하는 수술 방법으로 활발한 연구가 이루어지고 있다.

한편 림프부종 치료를 보조하기 위한 다양한 약제가 실험 중에 있는데 국소적인 tacrolimus 의 도포가 T-cell 의 역할을 억제함으로써 tissue fibrosis 를 억제하고 lymphangiogenesis 를 촉진시키면서 림프부종을 예방하고 치료에도 도움을 줄 수 있다는 보고가 있다.

이 연구의 목적은 토끼를 이용한 동물실험을 통해 림프절 절제술을 시행한 후에 림프절 전이술을 시행하는 것과 Tacrolimus 를 국소적으로 도포하는 것이 어떠한 효과가 있는지를 알아보려고 하였다. 이를 위하여 다리의 둘레를 반복적으로 측정하여 임상적인 영향을 알아보고 림프관 조영술 소견을 확인하며, 조직학적 관찰과 RT-PCR, ELISA 분석을 시행해 보고자 하였다.

### 연구 재료 및 방법

2.5 에서 3kg 사이의 수컷 New Zealand white rabbit 으로 실험을 진행하였으며 토끼를 다섯 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. Group 1 은 림프절 절제술만 시행, group 2 는 림프절 절제술 후 림프절 전이술 시행, group 3 는 림프절 절제술 시행 후 tacrolimus 도포, group 4 는 림프절 절제술 시행 후 림프절 전이술 시행 후 tacrolimus 도포, group 5 는 림프절 절제술을 시행하지 않은 대조군으로 설정하였다. Tacrolimus 는 수술 후 3 일에 한번씩 피부에 도포하였으며 2 주마다 다리의 둘레를 측정하였고 4 주, 8 주 후에 검체를 채취해 조직학적 검사, 생화학적 검사를 시행하였다.

### 결과

다리의 부피는 2 주에 최대로 부었으며 림프절 절제술만 시행한 경우

8 주에 정상화 되었으며 림프절 전이술을 시행한 경우에는 4 주에 정상화되었다. Tacrolimus 를 도포한 경우 2 주에 증가폭이 훨씬 적었으며 림프절 전이술의 시행 여부와 상관 없이 다리의 부피가 다소 증가하였다가 점차 감소하는 양상을 보였다. RT-PCR 에서 VEGF-C 는 각 그룹간 유의한 차이를 보이지 않았으며 LYVE-1 은 group 4 에서 높은 양상을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다. ELISA assay 에서 VEGF-C 는 4 주와 8 주에서 그룹 2 에서 그룹 1 에 비해 높고 8 주에 그룹 4 에서 그룹 3 에 비해 높은 양상을 보였다. LYVE-1 은 각 그룹들에서 4 주보다 8 주에 높은 양상을 보였으며 Tacrolimus 를 도포하였을 때 높은 수치를 보였다. 림프조영술에서 이식된 림프절로 림프혈관이 연결되면서 작용하는 것을 확인할 수 있었고 조직학적 검사에서 4 주와 8 주에서 채취한 검체에서 대조군과 같이 림프절의 구조가 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

## 결론

토끼의 슬와부에서 림프절 절제술을 시행한 경우 부종이 생겼다가 8 주가 지나면서 호전되는 양상을 보인 반면, 림프절 전이술을 시행했을 때에는 높아진 VEGF-C, LYVE-1 수치와 함께 2 주에 부피가 최대로 증가했다가 4 주가 지나면서 증상이 호전되는 양상을 보였다. 이식된 림프절은 구조가 잘 유지되면서 기능하는 것을 림프조영술과 조직학적 검사를 통해 확인할 수 있었다. Tacrolimus 를 국소적으로 도포하였을 때에는 LYVE-1 의 발현이 증가된 결과를 보였으며 림프절 절제술이나 전이술을 시행한 두 군 모두에서 임상적으로 다리의 부종을 예방하는 효과를 보였다.

중심 단어: 림프절 절제술, 림프절 전이술, 토끼 림프절, Tacrolimus

# 차 례

국문요약	i
표 및 그림 목차	v
서론	1
연구 재료 및 방법	2
가. 실험 그룹	2
나. 실험 방법	3
다. 결과 측정	3
라. 예비 실험	5
마. 분석	5
결과	6
가. 다리 부피의 변화	6
나. VEGF-C	12
다. LYVE-1	15
라. 림프 조영술	19
마. 조직학적 결과	22

고찰	-----	24
결론	-----	30
참고문헌	-----	31
영문요약	-----	34



## 표 및 그림 목차

Figure 1. Limb circumference measurement location -----	4
Figure 2. Limb volume change in group 1 (lymph node excision) -----	6
Figure 3. Limb volume change in group 2 (lymph node excision, transfer) -----	7
Figure 4. Limb volume change in group 3 (lymph node excision, Tacrolimus) -----	7
Figure 5. Limb volume change in group 4 (lymph node excision, transfer and Tacrolimus) -----	8
Figure 6. Limb volume change between group 1 and group 2 -----	9
Figure 7. Limb volume change between group 3 and group 4 -----	9
Figure 8. Limb volume change between group 1 and group 3 -----	10
Figure 9. Limb volume change between group 2 and group 4 -----	11
Figure 10. Limb volume change between all groups -----	11
Figure 11. VEGF-C RNA expression between groups after 4 weeks -----	12
Figure 12. VEGF-C RNA expression between groups after 8 weeks -----	13
Figure 13. VEGF-C protein expression between group 1 and 2 -----	13
Figure 14. VEGF-C protein expression between groups after 4 weeks -----	14
Figure 15. VEGF-C protein expression between groups after 8 weeks -----	15
Figure 16. LYVE-1 RNA expression between groups after 4 weeks -----	16
Figure 17. LYVE-1 RNA expression between groups after 8 weeks -----	16

Figure 18. LYVE-1 protein expression between group 1 and 2 -----	17
Figure 19. LYVE-1 protein expression between group 3 and 4 after 4 weeks -----	18
Figure 20. LYVE-1 protein expression between group 3 and 4 after 8 weeks -----	18
Figure 21. ICG lymphography before harvest, group 5 (4 weeks) -----	19
Figure 22. ICG lymphography before harvest, group 2 (8 weeks) -----	19
Figure 23. ICG lymphography before harvest, group 2 (8 weeks) -----	20
Figure 24. ICG lymphography before harvest, group 3 (8 weeks) -----	20
Figure 25. ICG lymphography before harvest, group 4 (8 weeks) -----	21
Figure 26. ICG lymphography before harvest, group 2 (8 weeks) -----	21
Figure 27. Lymph node histology, group 5 -----	22
Figure 28. Lymph node histology, group 1 (1 week) -----	23
Figure 29. Lymph node histology, group 4 (4 weeks) -----	23
Figure 30. Lymph node histology, group 4 (8 weeks) -----	24

## I. 서론

림프부종은 유방암이나 부인과 종양 수술 시 림프절 절제 후에 많이 발생하며 유방암 수술 후 20% 이상에서, 부인과 종양 수술 후 약 50% 정도에서까지 림프 부종을 경험한다는 보고도 있다.<sup>1),2)</sup> 림프부종은 지속되는 부종으로 환자들의 삶의 질을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 심한 경우 봉와직염을 유발하여 반복적인 치료를 필요로 한다. 림프 부종의 치료는 압박 치료를 중심으로 하는 재활치료가 기본적이고 효과적인 치료이며 여러 수술적 치료와 약물 치료 등이 시도되어 왔지만 여전히 그 치료가 어렵다. 수술적인 치료는 이전에는 림프부종 증상 완화를 위해 단순하게 부종이 발생한 조직을 자르고 봉합하는 절제술이나 지방흡입 등 non-physiologic 한 방법들이 과거에 주로 많이 시행되었지만 최근에는 초미세수술 기법의 발전과 수술 기구의 발전, 그리고 lymphoscintigraphy 와 ICG lymphography 와 같은 진단 기술의 발전으로 2000 년대 후반 미세 수술을 이용한 림프정맥문합술(lymphovenous anastomosis)이 소개되고 많이 시행되고 있으며, 2012 년부터 이에 더하여 림프절 전이술(vascularized lymph node transfer)에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>3)-6)</sup> 림프절 전이술은 림프부종이 있는 환부에 다른 부위에 있는 림프절을 이식하여 새로운 림프액 순환이 이루어지도록 하는 수술 방법으로 미국, 일본, 대만 등에서도 활발한 연구가 이루어지고 있다.

한편 림프부종 치료를 보조하기 위한 다양한 약제가 실험 중에 있는데 국소적인 tacrolimus 의 도포가 림프부종을 완화시킬 수 있다는 실험 결과가 몇 편의 논문에서 발표되었다.<sup>7),8)</sup> Tacrolimus 는 atopic dermatitis, psoriasis, scleroderma 등 만성적인 피부의 병변에 대한 치료제로써 FDA 승인을 받은 약제로 tissue fibrosis 를 촉진하고 lymphangiogenesis 를 억제하는 T-cell 의 역할을 억제함으로써 lymphedema 를 예방하고 치료에도 도움을 줄 수 있다는 가설로 진행된 동물실험이 있다.<sup>9)-11)</sup>

이 연구의 목적은 토끼를 이용한 동물실험을 통해 림프절 절제술을 시행한 후에 림프절 전이술을 시행하는 것과 Tacrolimus 를 국소적으로 도포하는 것이 어떠한 효과가 있는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 다리의 둘레를

반복적으로 측정하여 임상적으로 어떤 의미가 있는지를 알아보고 림프관 조영술 촬영, 조직학적 관찰과 RT-PCR, ELISA 분석을 시행해 보고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 가. 실험 그룹

2.5 에서 3kg 사이의 수컷 New Zealand white rabbit 으로 실험을 진행하였으며 토끼를 다섯 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험은 고려대학교 의과대학 동물실험 윤리위원회 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)의 승인을 받고 진행되었다.

Group 1 (n=10)

림프절 절제

Group 2 (n=10)

림프절 절제, 림프절 전이술

Group 3 (n=10)

림프절 절제, Tacrolimus 도포

Group 4 (n=10)

림프절 절제, 림프절 전이술, Tacrolimus 도포

Group 5 (n=5)

대조군 (림프절 절제하지 않음)

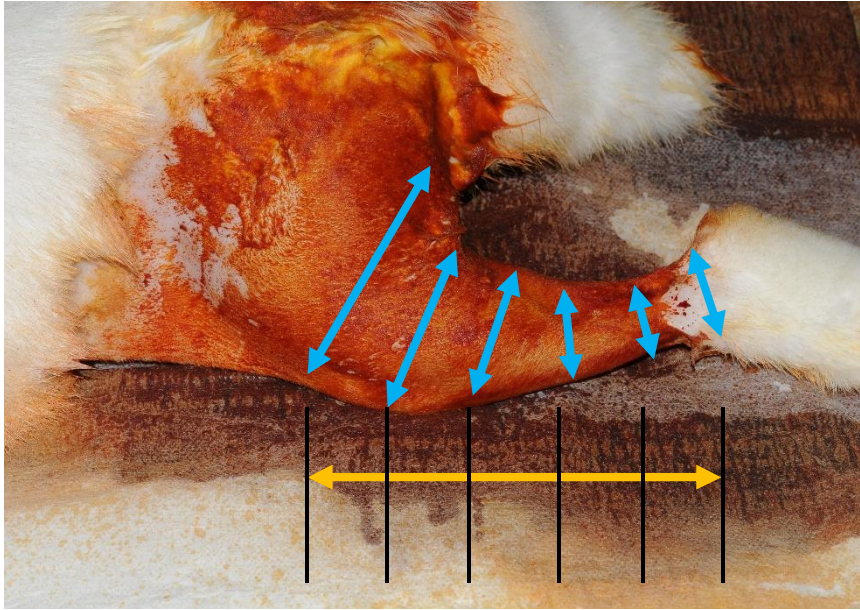
4 주와 8 주에 안락사를 시행하고 검체를 얻었으며 면역화학 검사에 사용할 검체를 3 개, 조직학적 검사에 사용할 검체를 2 개로 각 군에 10 개씩을 배정하였다. Tacrolimus 0.1%(Astellas, Tokyo, Japan)은 다리에 3 일에 한번씩 얇게 도포하였다.

#### 나. 실험 방법

근육주사로 Xylazine 을 5mg/kg 의 용량으로 투여하였으며 2-3% isoflurane 을 이용한 흡입 마취를 시행하였다. Webspacer 에 피하층으로 0.1mg 의 indocyanine green (ICG)를 주입하였으며 infrared camera (Moment K)를 이용하여 림프절의 위치를 확인하였다. 마취 상태의 토끼를 양측 서혜부부터 뒷발 위쪽까지 삭모를 시행하고 베타딘으로 수술 부위를 소독한 뒤 확인된 림프절에 가깝게 서혜부에서 2cm 아래에 2cm 길이로 국소 마취제를 주입한 뒤에 피부를 절개하였다. 양측 다리의 림프절의 위치를 확인한 뒤 슬와부 림프절을 근위부의 깊은 혈관을 피판경으로 사용하기 위해 보존한 채 주변의 림프혈관을 2cm 이상의 길이를 제거한다. 림프절 주위는 피부부터 근육 위층까지 절제를 시행하였다. 림프절 전이술을 시행할 경우 림프절 피판을 원래의 위치에서 1 cm 원위부, 가측으로 옮긴 뒤 Vicryl 3-0 를 이용하여 주변 조직에 고정시켜 준다. 피부 봉합은 Vicryl 3-0, 5-0, Prolene 5-0 를 이용하여 피하층, 피부층을 각각 봉합해주고 Pehaft 로 조이지 않게 감아준다.

#### 다. 결과 측정

2 주에 한번씩 다리 둘레를 측정하였다. 그림과 같이 6 군데서 둘레를 측정하고 길이를 추가로 측정하였다. 5 마리는 1 달째에 안락사를 시행하고 5 마리는 2 달째에 안락사를 시행하였으며 ICG 주입하고 검체를 채취하였으며 면역화학검사와 조직학적 검사를 진행하였다.



**Fig. 1. Limb circumference measurement location**

A. 조직학적 검사

4 주와 8 주에 채취한 검체를 H&E 으로 염색을 시행하였으며 20 배의 저배율에서 가장 많은 림프 혈관을 포함하는 부위를 선택하여 고배율로 관찰을 시행하였다.

B. ELISA, mRNA 검사

4 주와 8 주에 채취한 검체를 즉시 4% paraformaldehyde 에 고정하였으며 파라핀에 embedding 시켰다. 이러한 검체는 flap 의 longitudinal 한 axis 에 따라 5 $\mu$ m 로 section 을 시행하였다.

단백질 발현 정도는 Lymphatic Vessel Endothelial HA Receptor 1 (LYVE-1)과 VEGF-C 를 ELISA assay 를 통하여 측정하였으며 RT-PCR 을 통하여 mRNA expression level 을 측정하였다. RT-PCR 은 cDNA synthesis 를 위하여 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA synthesis kit #K1622 를 사용하였으며 GAPDH, LYVE-1, VEGF-C primer 를 사용하였다. 단백질 분석은 Bio-Rad protein assay buffer 에서 Bradford 방법으로 595nm 에서 absorbance 를 측정하였다.

LYVE-1 과 VEGF-C 에 대하여 mybiosource 의 ELISA kit 를 사용하여 측정하였다.

## 라. 예비 실험

### A. 림프절 전이술

실제 임상에서 사용되는 것과 같이 free vascularized lymph node transfer 를 재현하기 위해서 다른 실험 논문에서 소개된 것과 같이 미세 수술을 통해 예비 실험을 진행하였다. 토끼를 흡입마취 시킨뒤에 ICG 를 주입하고 림프절을 확인한 뒤에 현미경을 통해 popliteal lymph node 를 popliteal artery 에서 분지되는 medial artery 와 lateral vein 을 포함하여 flap 으로 거상하였다. 이를 반대측 다리에서 림프절을 제거한 뒤에 현미경을 통해 10-0 Nylon으로 microanastomosis 를 시행하였다. 정맥은 비교적 큰 반면 동맥이 매우 작았으며 동물 실험실의 기구로는 anastomosis 를 정확하게 시행하는데 한계가 있었다. 총 4 마리에서 시행하였는데 1 개는 viable 하였으나 1 개는 flow 가 명확하지 않았고 2 개는 non viable 한 결과를 보여서 consistent 한 실험 모델을 만들기 힘들 것으로 판단되어 모델을 수정하게 되었다.

### B. Ketoprofen 피하 주사

국소적인 약물 치료로 Ketoprofen 과 Tacrolimus 를 사용한 경우 좋은 결과를 보인 이전의 연구에 따라 두 약의 효과를 검증하기 위해 실험 그룹을 나누고 연구를 진행하였으나 그룹의 구성이 복잡해지고 ketoprofen 피하 주사를 받은 실험군에서 중간에 사망하는 case 들이 많이 나오면서 ketoprofen 그룹을 제외하고 tacrolimus 국소 도포로 단순화시켜 실험을 진행하게 되었다.

## 마. 분석

본 연구에서는 두 군 간의 차이를 측정하기 위해 t test 를 사용하였으며 여러 군간의 차이를 측정하기 위해 ANOVA 와 analysis of variance with a post hoc test (Tukey-Kramer) 방법을 사용하여 검증하였다. P 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 보았고 R program 을 사용하여 통계적 분석을 시행하였다.

### Ⅲ. 결과

#### 가. 다리 부피의 변화

##### A. 일반 기술

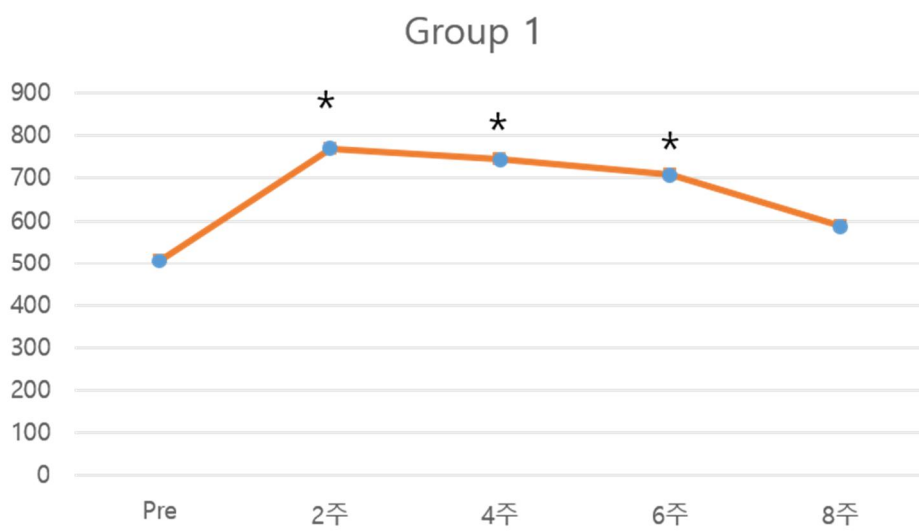
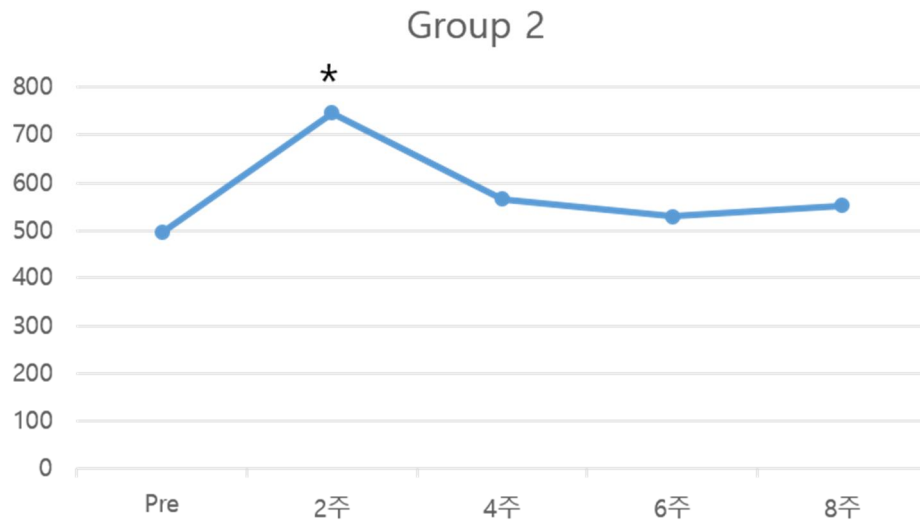


Fig. 2. Limb volume change in group 1 (lymph node excision)

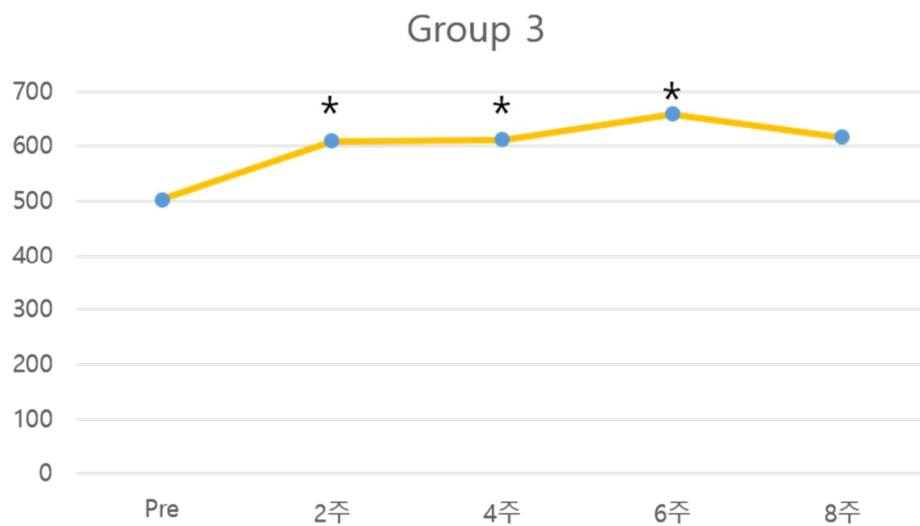
그룹 1에서 2주와 4주, 6주에 수술 전에 비하여 부피가 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 시간이 지날수록 다소 감소하는 양상을 보이다가 수술 후 8주에는 수술 전과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다. ( $p = 0.275$ )





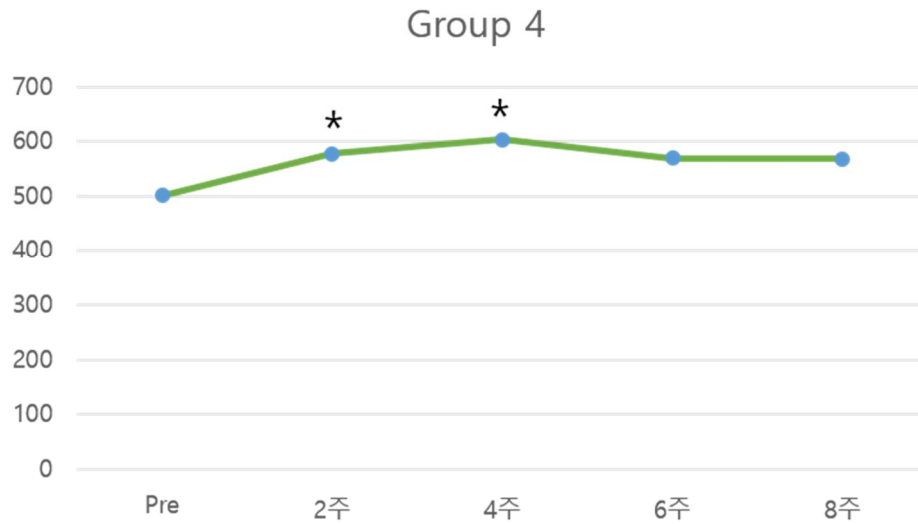
**Fig. 3. Limb volume change in group 2 (lymph node excision, transfer)**

림프절 절제를 시행하고 전이술을 시행한 그룹 2에서는 수술전에 비해 수술 후 2 주에서 유의하게 높은 수치를 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 4 주부터는 부피가 회복되어 이전과 유의하게 다르지 않은 결과를 보였다. ( $p = 0.158, 0.487, 0.292$ )



**Fig. 4. Limb volume change in group 3 (lymph node excision, Tacrolimus)**

그룹 3에서는 2 주째에 부피가 유의하게 증가한 양상을 보였고( $p=0.011$ ), 4 주, 6 주에도 증가한 양상을 보였다. ( $p=0.006$ ,  $p=0.001$ )



**Fig. 5. Limb volume change in group 4 (lymph node excision, transfer and Tacrolimus)**

그룹 4에서는 술 후 2 주, 4 주째에 수술전에 비해 부피가 증가한 양상을 보였으나 ( $p=0.013$ ,  $p<0.01$ ), 6,8 주는 유의한 차이를 보이지는 않았다.

## B. 림프절 전이술의 효과

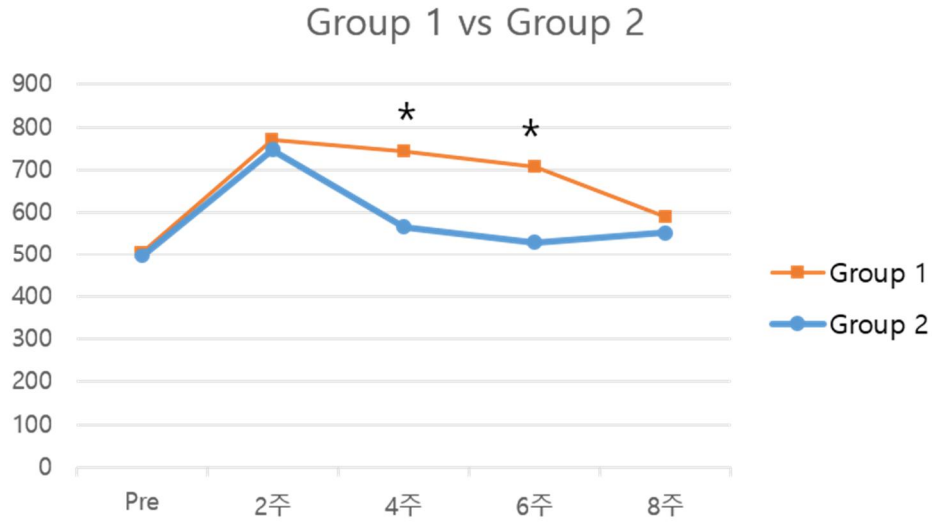


Fig. 6. Limb volume change between group 1 and group 2

그룹 1 과 2 를 비교하였을 때 2 주째에는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 4 주째( $p=0.004$ ), 6 주째( $p=0.002$ )에 유의한 차이를 나타냈다.

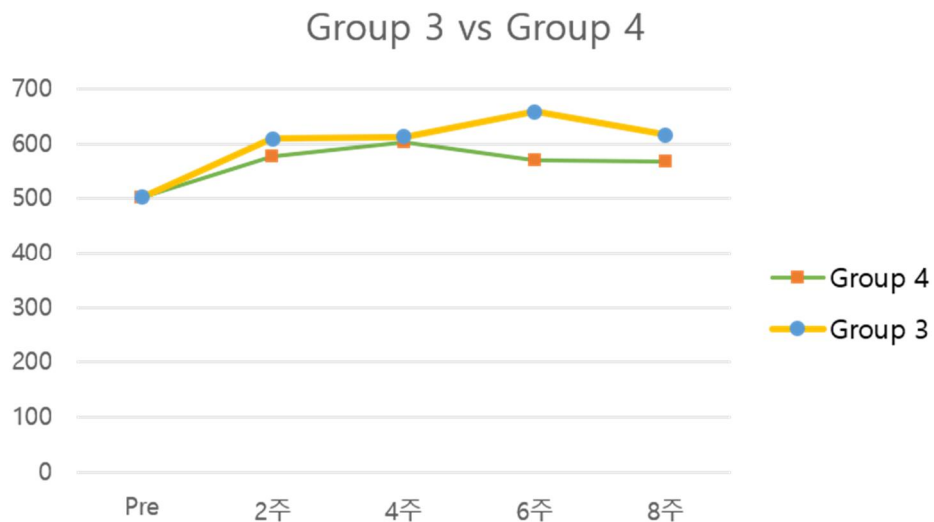
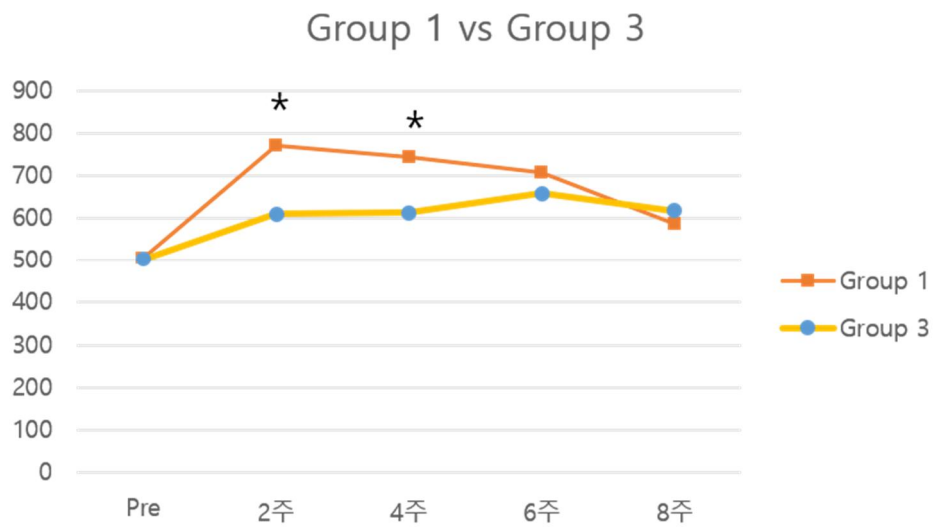


Fig. 7. Limb volume change between group 3 and group 4

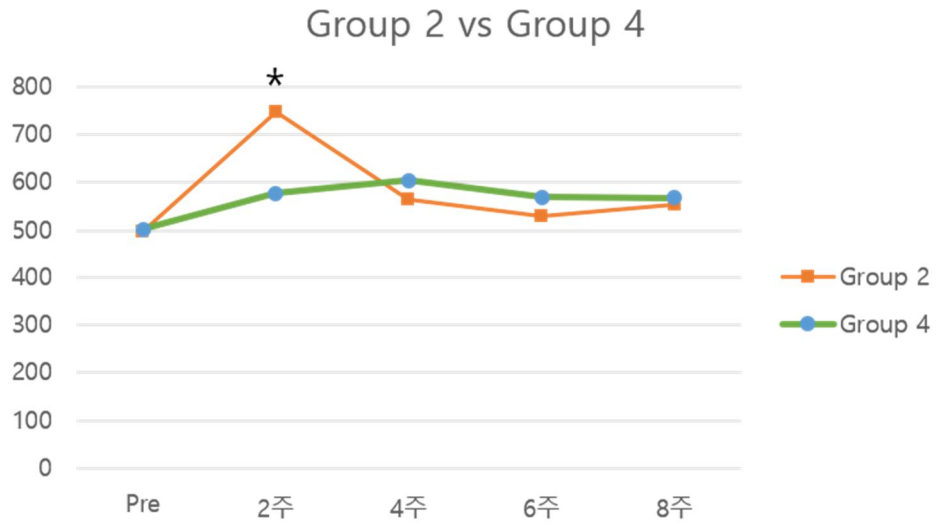
그룹 3 과 4 를 비교하였을 때 그룹 4 의 평균값이 다소 높았지만 유의한 차이를 보이지는 않았다.

### C. Tacrolimus의 효과



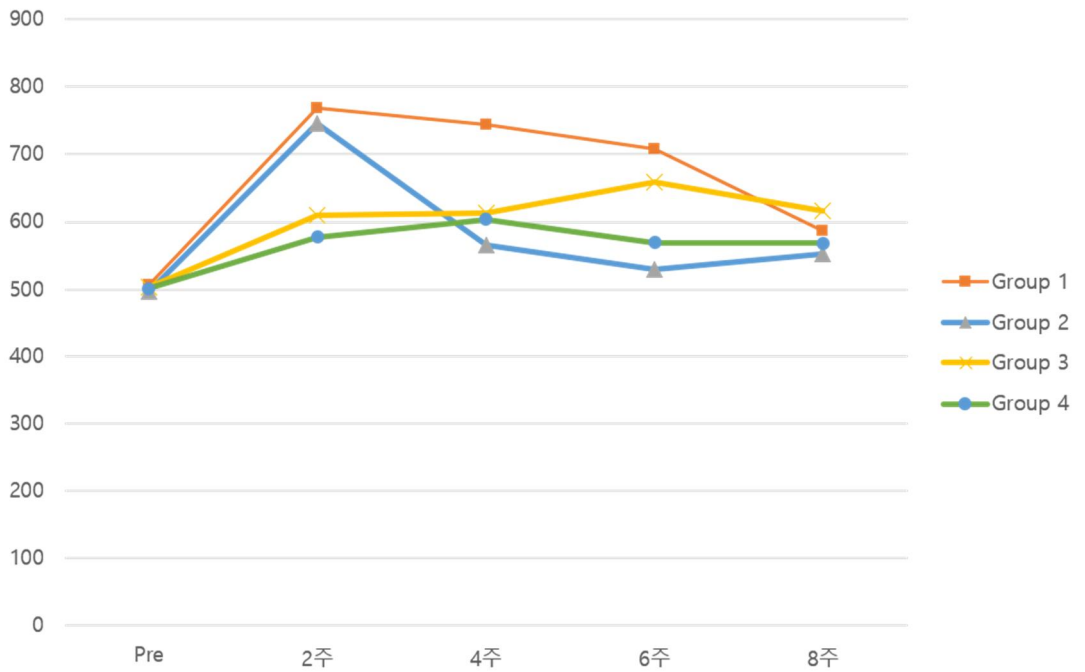
**Fig. 8. Limb volume change between group 1 and group 3**

림프절 절제술을 시행하고 전이술을 시행하지 않은 그룹 1 와 3 를 비교하였을 때 2 주째( $p=0.01$ ), 4 주째( $p=0.024$ )에 유의한 차이를 보였다



**Fig. 9. Limb volume change between group 2 and group 4**

림프절 절제술을 시행한 후 전이술을 시행한 그룹 2 과 4 를 비교하였을 때 2 주째에만 유의한 차이를 보였다. ( $p=0.001$ )

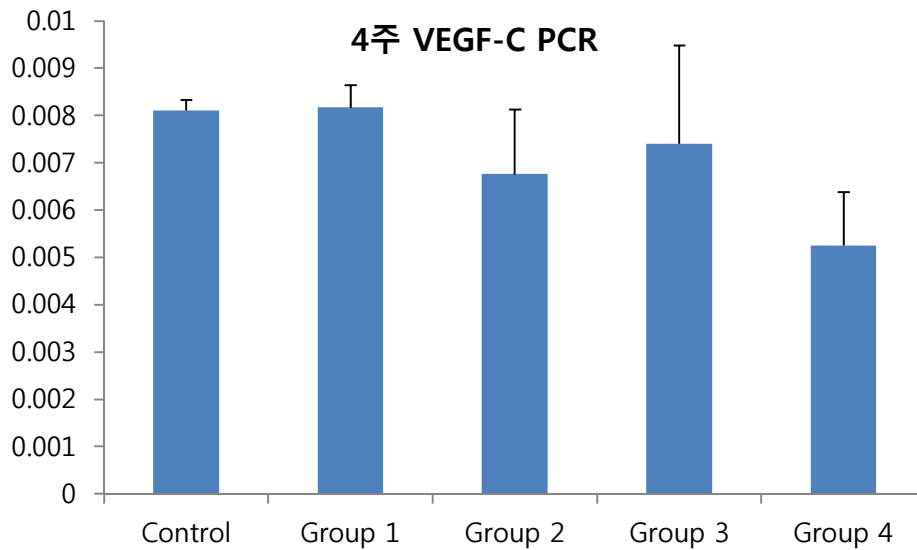


**Fig. 10. Limb volume change between all groups**

네 그룹을 비교하였을 때 2주째에 그룹 1과 2에서 부피가 유의하게 증가하고, 그룹 1은 8주째, 그룹 2는 4주째에 다소 감소하는 것을 확인할 수 있다. 그룹 3과 그룹 4는 2주째에 다소 증가한 상태로 유지되었다.

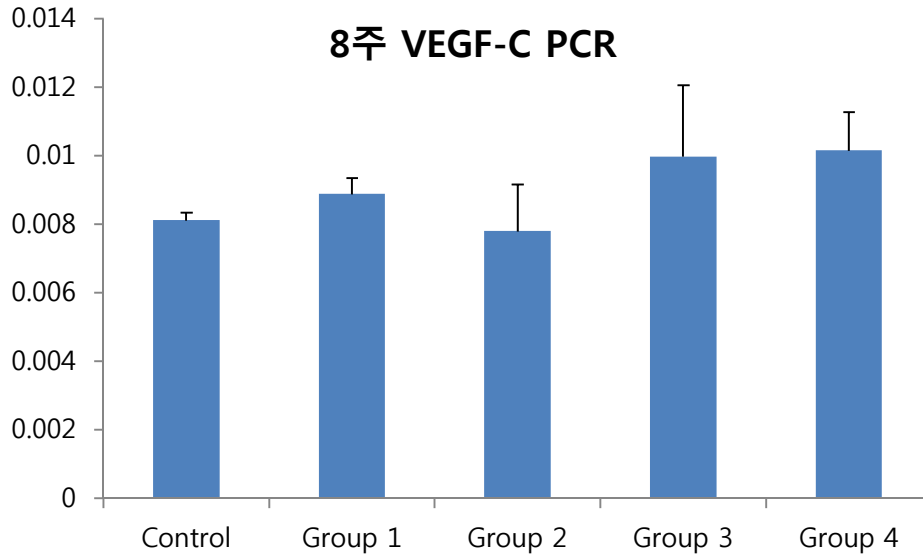
## 나. VEGF-C

### A. RT-PCR



**Fig. 11. VEGF-C RNA expression between groups after 4 weeks**

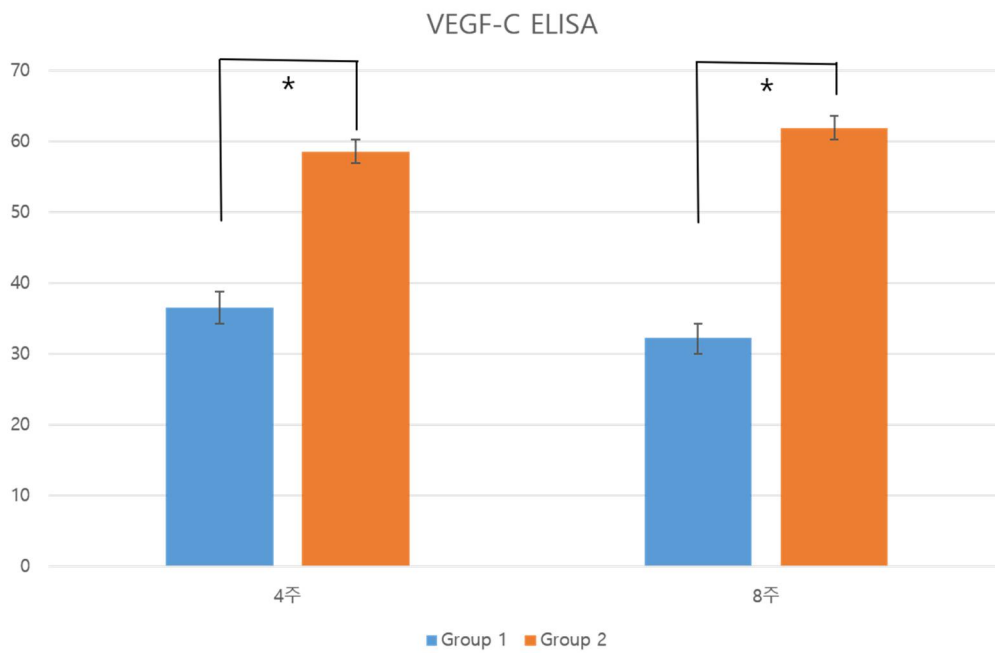
4주째에 시행한 VEGF-C에 대한 RNA expression을 비교하였을 때 0.0081, 0.0067, 0.0082, 0.0053, 0.0074의 concentration ratio를 보였으며 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.



**Fig. 12. VEGF-C RNA expression between groups after 8 weeks**

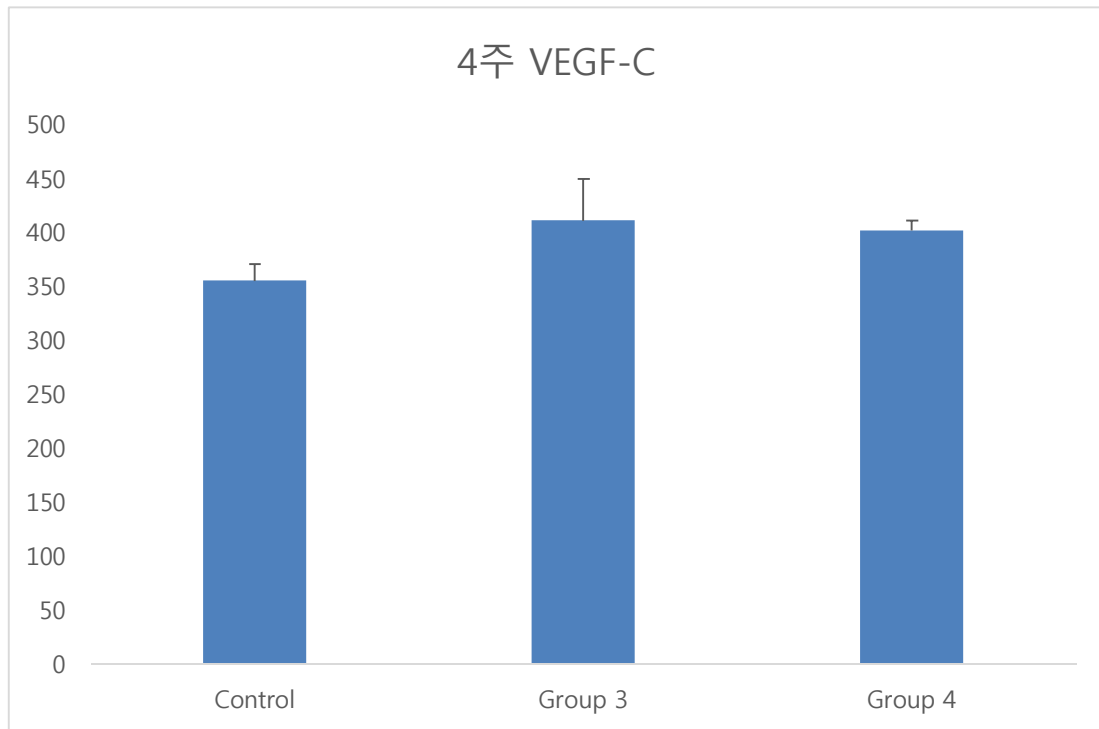
8 주째에 시행한 VEGF-C RNA expression 은 0.0081, 0.0078, 0.0089, 0.0102, 0.0099 로 역시 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다

### B. ELISA



**Fig. 13. VEGF-C protein expression between group 1 and 2**

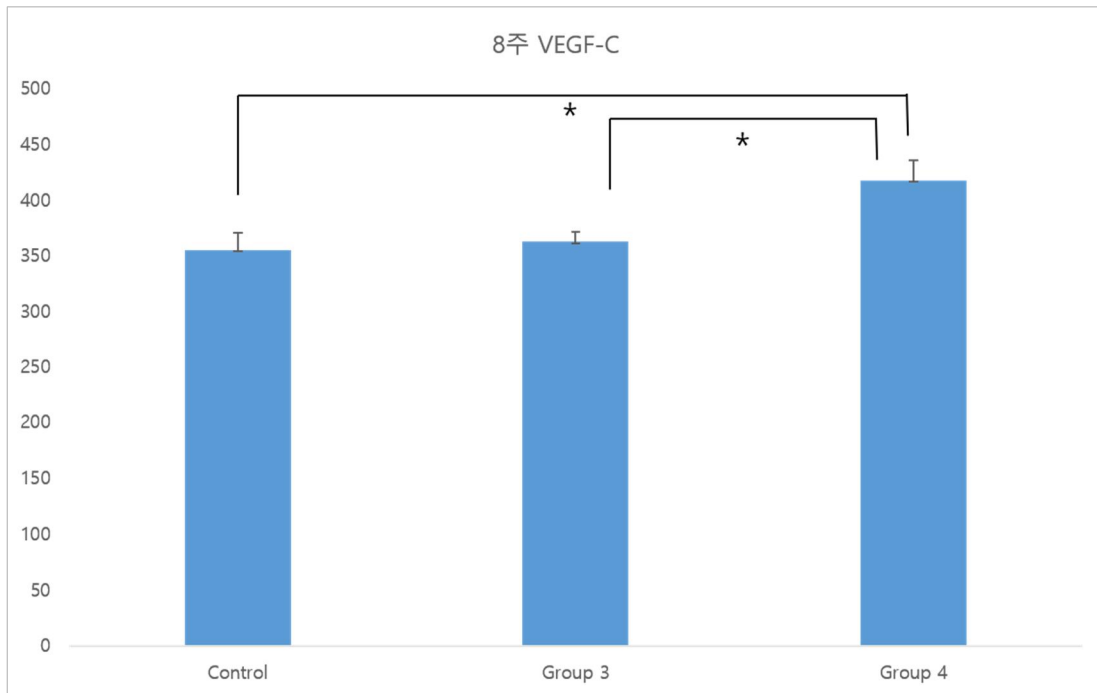
VEGF-C expression 은 림프절 전이술을 시행한 group 2 에서 1 에 비해 유의하게 높은 양상을 보였다.



**Fig. 14. VEGF-C protein expression between groups after 4 weeks**

4 주에는 VEGF-C 는 그룹 간 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.



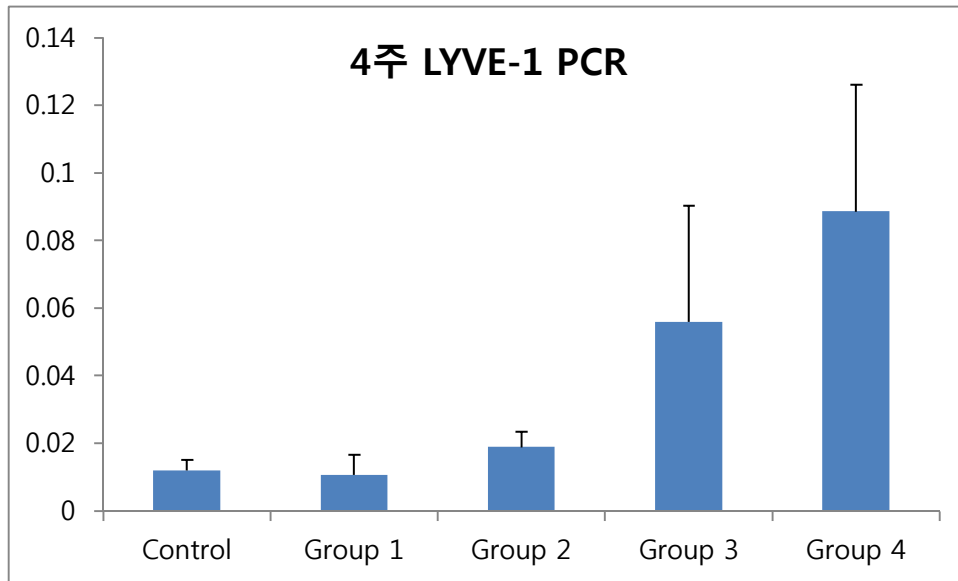


**Fig. 15. VEGF-C protein expression between groups after 8 weeks**

8주에는 그룹 4에서 그룹 3과 대조군에 비해서 유의하게 높은 수치를 보였다. (355.8, 363, 418.1) ( $p=0.023$ , Tukey's comparison  $q=4.167, 4.195$ )

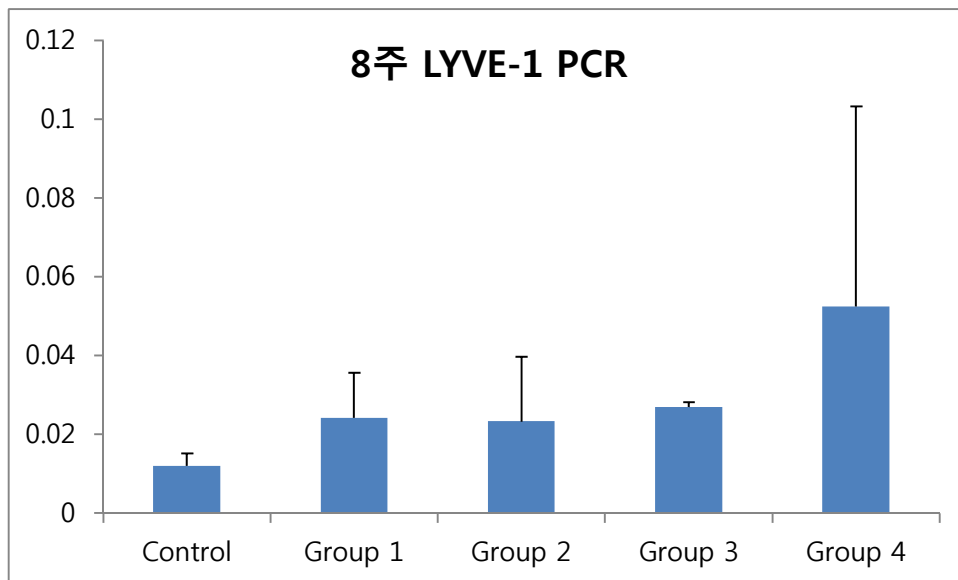
## 다. LYVE-1

### A. RT-PCR



**Fig. 16. LYVE-1 RNA expression between groups after 4 weeks**

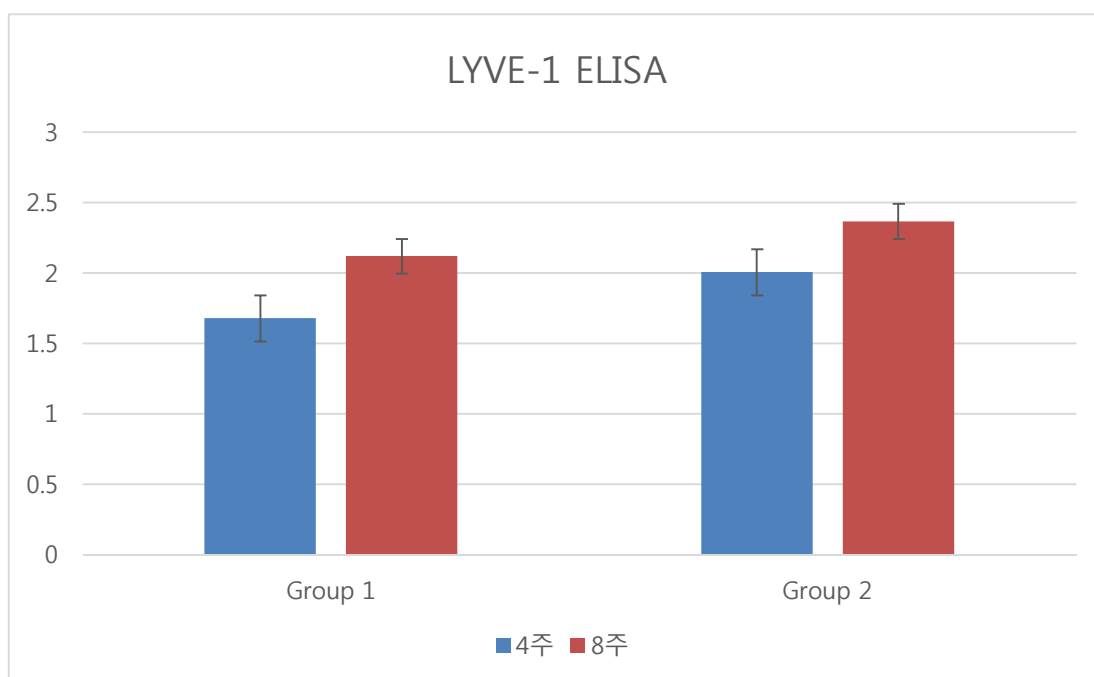
LYVE-1 RNA expression 은 각각 0.0119, 0.0106, 0.018, 0.0559, 0.0886 의 concentration ratio 를 보여 group 3 와 group 4 에서 높은 양상을 보였지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.



**Fig. 17. LYVE-1 RNA expression between groups after 8 weeks**

LYVE-1 RNA expression 은 8 주에 각각 0.0119, 0.0242, 0.0233, 0.0257, 0.0524 의 concentration ratio 를 보여 group 4 에서 높은 양상을 보였지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

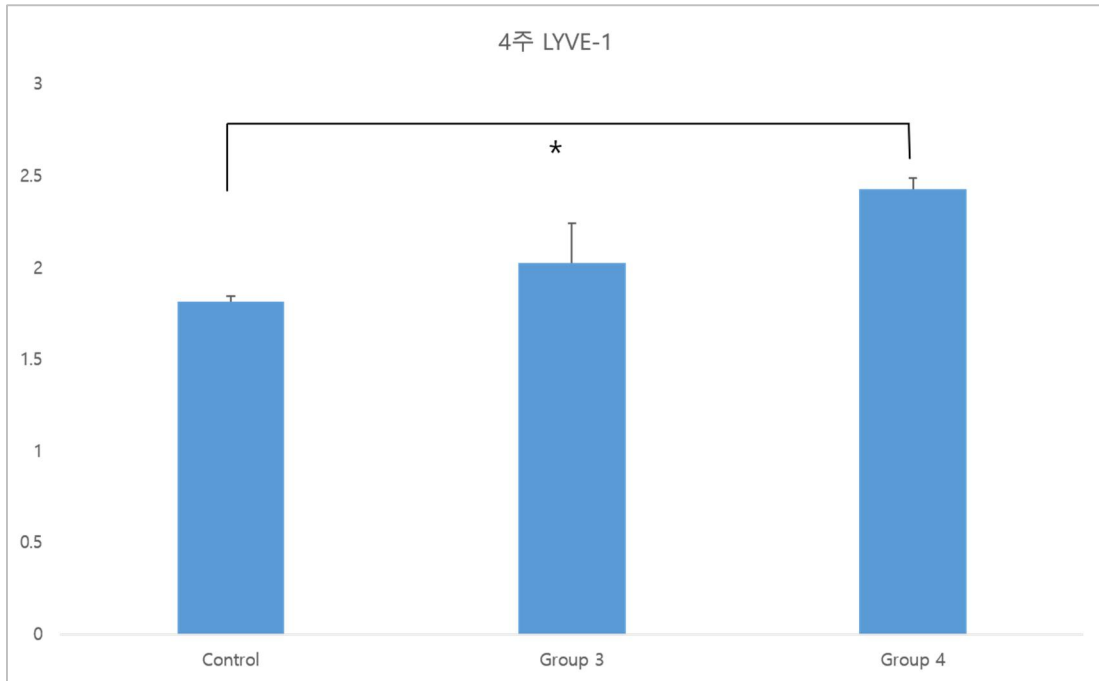
## B. ELISA (림프절 전이술의 효과)



**Fig. 18. LYVE-1 protein expression between group 1 and 2**

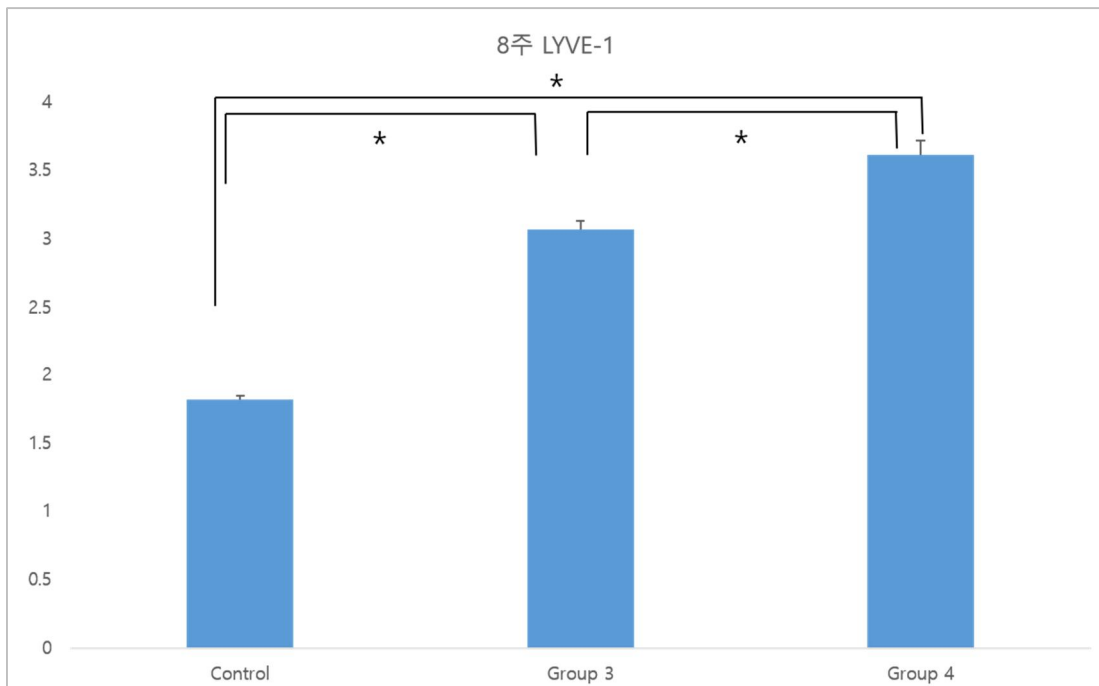
VEGF-C expression 은 group 2 에서 4 주 2.008, 8 주 2.367, group 1 에서 4 주 1.68, 8 주에서 2.119ng/ml 로 나타났다.

## C. ELISA (Tacrolimus의 효과)



**Fig. 19. LYVE-1 protein expression between group 3 and 4 after 4 weeks**

1.817, 2.03, 2.43ng/ml 로 그룹 4 에서 대조군에 비해 유의하게 높은 결과를 보였다. ( $p=0.05$ ,  $q=4.143$ )



**Fig. 20. LYVE-1 protein expression between group 3 and 4 after 8 weeks**

Tacrolimus 를 도포한 그룹 3 이 대조군과 비교하여, 그룹 4 는 그룹 3 과

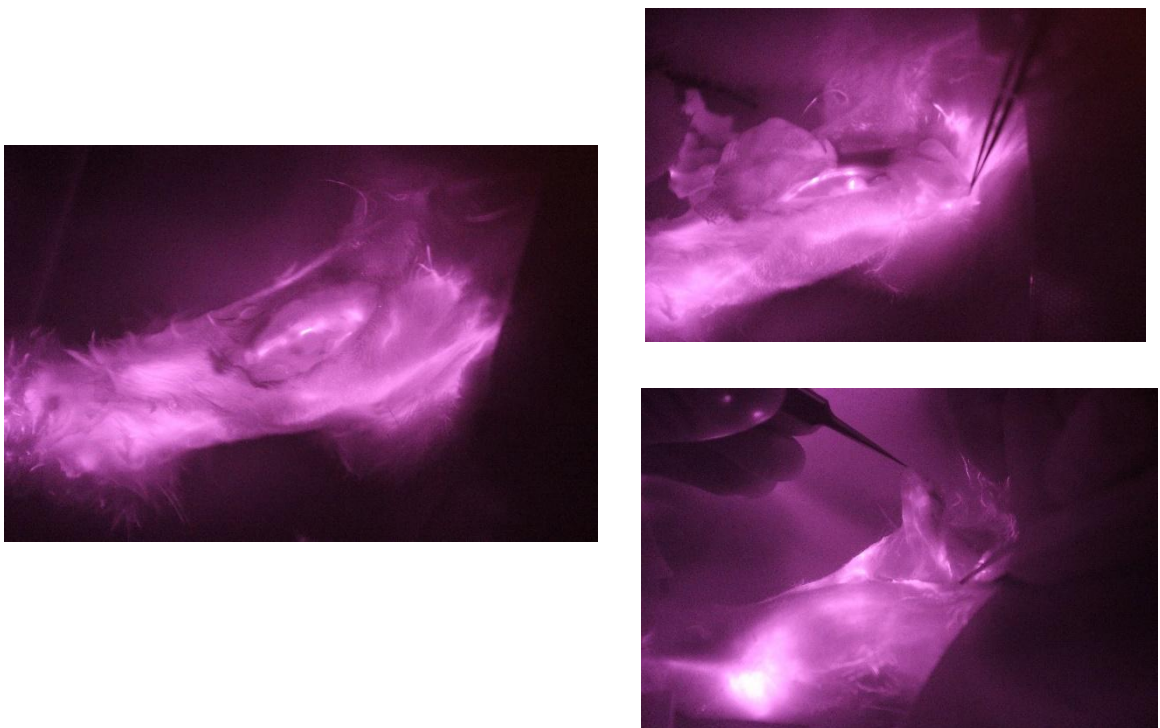
비교하여 유의하게 높은 결과를 보였다. ( $p < 0.001$ ,  $q = 7.356$ ,  $15.08$ )

### 라. 림프 조영술



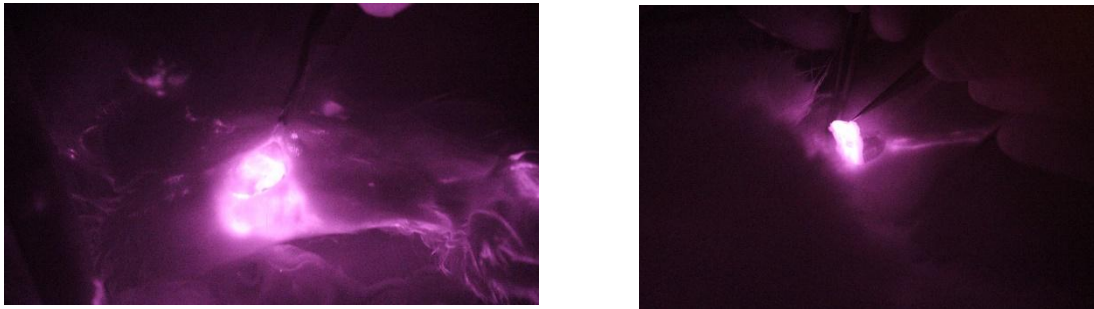
**Fig. 21. ICG lymphography before harvest, Group 5 (4 weeks)**

대조군에서 4 주째 촬영한 사진이며 림프 혈관을 통해 림프절로 ICG 가 잘 조영되는 것을 확인할 수 있다.



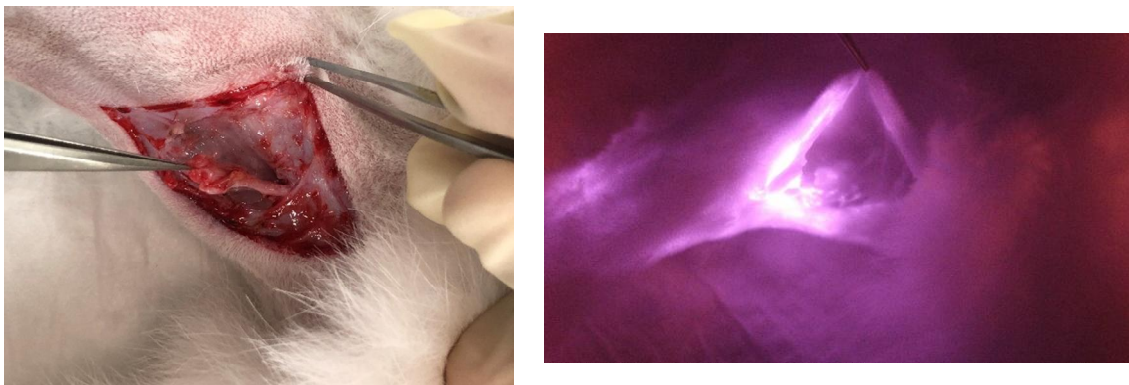
**Fig. 22. ICG lymphography before harvest, Group 2 (8 weeks)**

림프절 절제술 후 전이술을 시행한 group 2 에서 8 주째 림프절을 채취하기 전 림프조영술 사진이며 주변에 irregular pattern 으로 lymphatic flow 가 보이며 림프절에는 조영이 되지만 아주 intense 하지는 않은 양상이다.



**Fig. 23. ICG lymphography before harvest, Group 2 (8 weeks)**

다른 group 2 개체에서 찍은 림프조영술 사진으로 피부에서 diffuse 한 pattern 을 보이며 림프절은 다소 강하게 조영된 양상이다.



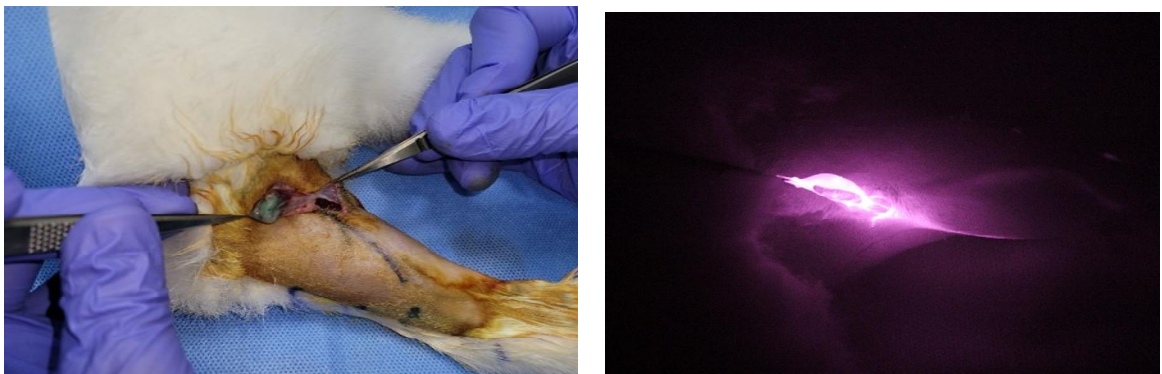
**Fig. 24. ICG lymphography before harvest, Group 3 (8 weeks)**

림프절 절제술을 시행하고 Tacrolimus 를 도포한 group 3 에서 촬영한 사진이며 dermal flow 로 ICG 가 조영되지만 안쪽으로는 조영이 잘 되지 않는 것을 확인할 수 있다.



**Fig. 25. ICG lymphography before harvest, Group 4 (8 weeks)**

림프절 절제술 이후 림프절 전이술을 시행하고 Tacrolimus 를 도포한 group 4 에서 촬영한 사진이며 림프 혈관을 통해 림프절까지 잘 조영되는 것을 확인할 수 있다.

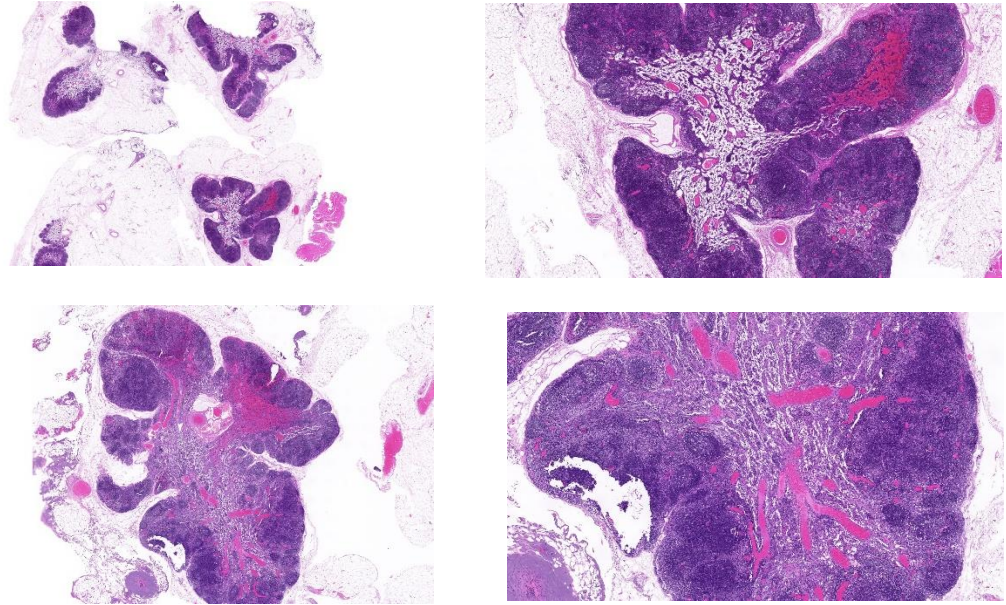


**Fig. 26. ICG lymphography before harvest, Group 4 (8 weeks)**

Group 4 의 다른 개체에서 촬영한 사진이며 림프 혈관을 통해 림프절까지 잘 조영되는 것을 확인할 수 있습니다.

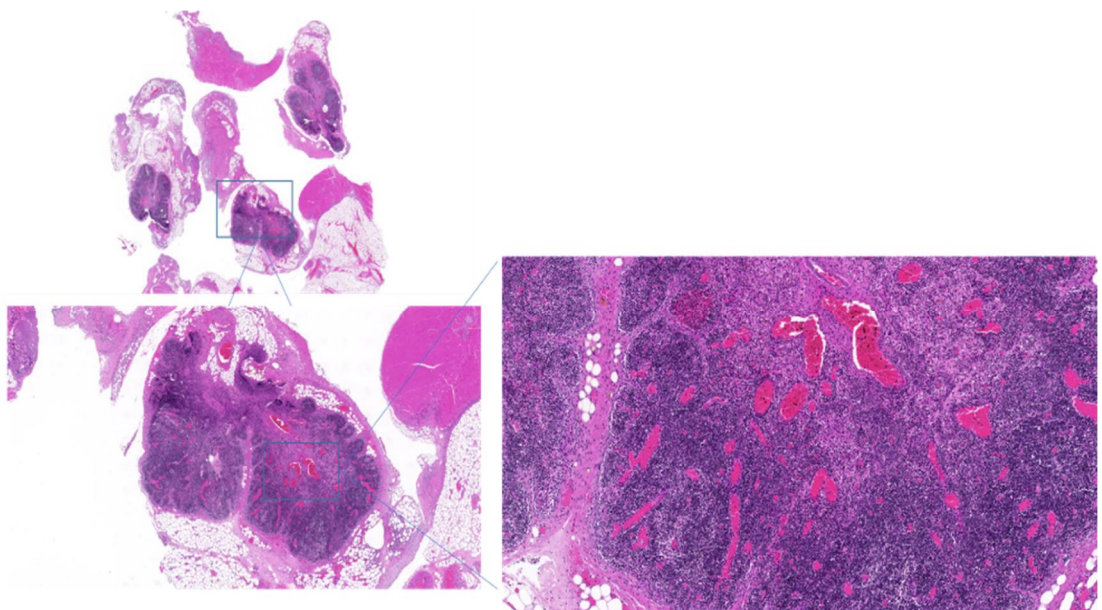
4 주째와 8 주째에 조직 채취를 시행할 때 시행한 림프조영술 결과 새로 연결된 림프관 등을 통하여 옆쪽으로 이식한 림프절이 잘 조영되는 것을 확인할 수 있었다. 림프절은 1 분 이내에 빠르게 조영되었으며 림프관이 선형의 모양으로 다리에서 잘 보이는 경우와 dermal backflow 처럼 전체적으로 조영되는 경우가 혼재되어 관찰되었다.

## 마. 조직학적 결과



**Fig. 27. Lymph node histology, group 5**

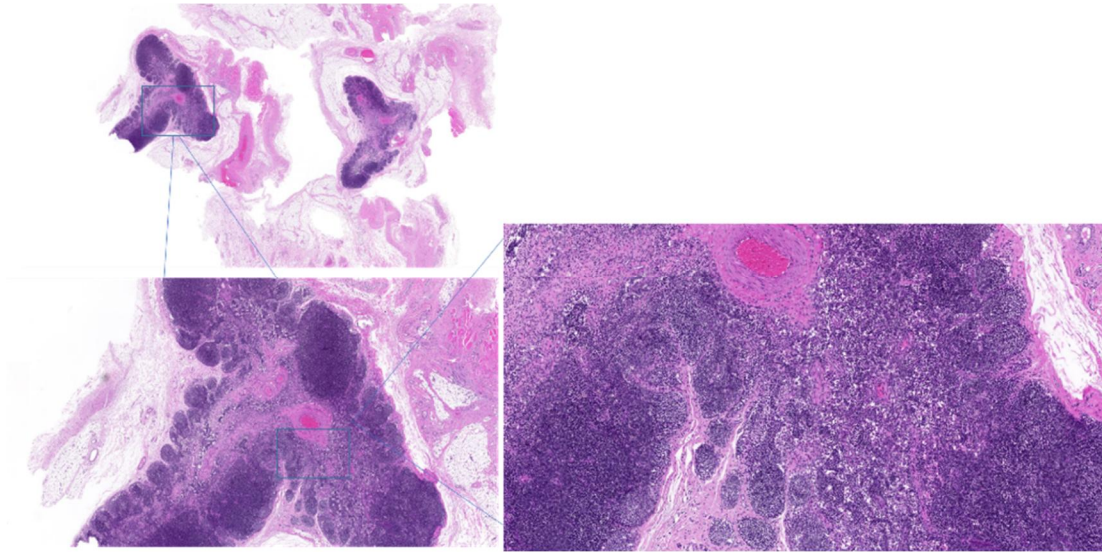
대조군인 group 5 에서 채취한 림프절을 염색한 결과이며 저배율과 고배율에서 림프절의 구조를 잘 확인할 수 있고 medulla 의 구조와 림프혈관, 혈관 등의 구조물을 확인할 수 있다.





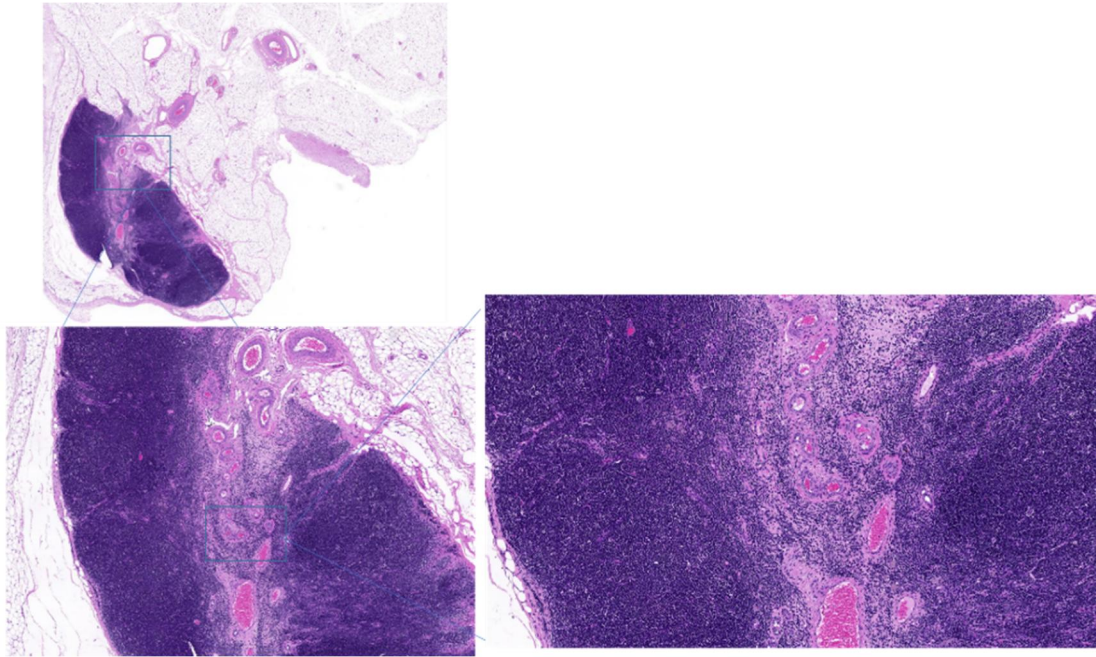
**Fig. 28. Lymph node histology, group 2 (1 week)**

림프절 절제술 후 전이술을 시행한 group 2 의 조직학적 소견으로 림프절 안쪽의 구조가 잘 유지되고 안쪽에 혈관들이 다소 증가한 양상을 보이고 있다. Necrosis 나 cellularity 의 감소, spongiosis 등은 보이지 않는 것을 볼 수 있다,



**Fig. 29. Lymph node histology, group 4 (4 weeks)**

림프절 절제술 후 전이술을 시행하고 Tacrolimus 를 도포한 group 4 의 조직학적 소견으로 구조가 잘 유지되고 tissue density 가 증가한 양상을 보이고 있다.



**Fig. 30. Lymph node histology, group 4 (8 weeks)**

Group 4 에서 8 주 후에 채취한 림프절의 조직학적 사진으로 마찬가지로 구조들이 잘 유지되고 있고 cellularity 가 증가된 상태가 유지되고 있다.

#### **IV. 고찰**

림프부종은 유방암이나 부인과 암 수술 이후 비교적 흔하게 나타나는 질환으로 지금까지 많은 치료법들이 소개되었지만 아직까지 완치법은 없는 실정이다. 수술적인 치료는 이전에는 절제술이나 지방 흡입 등의 증상을 완화시키는 방법들이 시행되었지만 최근 미세수술 기법과 수술 기구의 발전 등으로 림프정맥 문합술과 림프절 전이술과 같은 생리적인 기능을 회복시키는 수술이 많이 시행되고 있다. 림프절 전이술은 공여부로 abdomen 이나 inguinal area, axilla area, submental, supraclavicular area, omentum 등 다양한 부위를 사용하게 되는데 림프절을 옮기게 되는 만큼 공여부의 림프부종이나 다른 수술 합병증 들이 생길 수 있는 문제점이 있다. 한편 수술적인 치료 없이 국소적인 약물의 투여로 림프부종의 증상을 완화시키거나 예방을 시킬 수 있는 방법에 대해서 연구들이 이루어져 왔으며 Ketoprofen, Selenium, Tacrolimus 등에서 일부

효과가 있다는 보고들이 있었다.<sup>12)-15)</sup> 이러한 림프절 전이술과 국소적인 Tacrolimus 의 적용이 림프절을 절제한 후에 어떠한 영향을 끼치는지를 알아보기 위해 동물 실험을 계획하였다.

먼저 림프절 전이술을 시행할 동물 모델을 찾기 위해 림프부종 동물 모델들에 대해서 살펴보았는데, rodent 에서 많은 연구들이 이루어졌었고, rat 에서는 handlimb 에서 수술과 방사선 치료를 같이 시행하는 모델이 소개되었으며, mouse 에서는 tail 이나 hindlimb 을 이용한 연구가 많이 진행되었다. 특히 2006 년 이후 최근에는 mouse 의 tail 에서 cautery 나 ligation 을 통하여 lymphedema 를 만드는 실험이 많이 시행되었다.<sup>16)-20)</sup> 이러한 rodent model 은 동물을 비교적 쉽게 구할 수 있고 경제적으로도 저렴하며 안정적인 모델이라는 장점이 있으며 실험 개체수를 증가시키면서 면역화학검사나 RT-PCR 등에서도 오차를 줄일 수 있는 장점이 있다. 반면에 개체의 크기가 작고 술자에 따라 결과가 다를 수 있으며 유리 피판 형태의 림프절 전이술은 어렵거나 시행할 수 없는 단점이 있다. Canine model 은 1968 년 등 비교적 이전부터 연구가 되어 왔으며 주로 hindlimb 에서 수술과 방사선 치료 등을 혼합하는 다양한 림프부종 형성 방법들이 제시되었다. 실험군으로 lymphvenous anastomosis 나 free omentum transplantation 등이 시행되었으나, mortality rate 가 높은 편이며 윤리적인 문제 등으로 현재는 잘 사용하지 않고 있다. 토끼, 양, 돼지 등 중대형 동물들에서도 림프 부종에 대한 연구가 진행되었다. 토끼 귀에서 연구가 많이 진행되었으며 lymphovenous anastomosis 를 시행하거나 VEGF-C 를 실험군으로 사용하였는데 deep lymphatic 이 없어서 acute 한 림프부종 형성이 잘 되는 장점이 있었으며 다만 cartilage necrosis 에 대한 우려가 있었고 림프절을 이식하기에는 적절한 공간이 없어 림프절 이식실험을 시행하기에는 부적합하다고 생각하였다. 양을 이용한 실험은 많이 시행되지는 않았고 2009 년에 한 그룹에서 발표되었는데 사람과 비슷한 크기와 구조를 가진 장점을 가지고 있었으며 vascularized lymph node transfer 를 시행했을 때 avascular transplantation 을 했을 때보다 좋은 결과를 보였다고 보고하였다. Lateral saphenous vein 은 2-4mm, medial circumflex femoral artery 는 1-3mm 정도의 크기를 가지고 있어 8-0 나 9-0 nylon 으로 microanastomosis 를 시행할 수 있었다고 보고하였다. 핀란드 그룹에서 2011 년과 2013 년에 growth factor

투여와 lymph node transfer 를 이용한 실험을 발표하였으며 양 모델과 같이 동물의 크기가 크고 비슷한 환경을 가진 장점이 있으며 inguinal region 에서 해부학적 구조가 조금 다른 점과 chronic lymphedema model 이 아니라는 점, 현실적인 비용 문제 등이 있을 수 있다.<sup>18),21)</sup> 또한 vascularized lymph node transfer 가 아닌 pedicled lymph node 의 형태로 주변 lymphatic vessel 을 박리해서 제거하는 방법을 사용하였다. 2013 년 토끼의 lymphatic territory 에 대해서 정리한 논문이 발표되었는데 8개의 territory 로 나눌 수 있으며 사람이나 개와는 다르게 superficial 과 deep system 으로 완전히 나뉘지는 않는 차이점이 있다고 하였다.<sup>22)</sup> 5 번의 popliteal territory 를 target 으로 하여 실험을 진행하고자 하였으며 lateral saphenous vein 을 따라서 두개의 lymphatic vessel 이 관찰되며 이들이 popliteal lymph node 로 연결된다. 2019 년 한 그룹에서 토끼를 이용해 vascularized lymph node transplantation 을 free flap 의 형태로 성공적으로 시행한 model 을 발표하였고 소형 설치류나 중대형 동물에 비해 장점을 가진 모델로 생각되어 실험을 진행해 보기로 하였다.<sup>23)</sup> 이전에는 토끼의 림프부종 실험은 귀에서 주로 연구가 이루어졌고 hindlimb 은 연구가 많이 이루어지지 않았으며 특히 free vascularized lymph node 는 이전에 발표가 없었다. 2.5 에서 3kg 의 New Zealand white rabbit 에서 실험을 진행하였으며 0.3cc 의 patent blue dye 를 주입하고 popliteal lymph node 를 제거하였으며 15 일 뒤에 free vascularized lymph node transplantation 을 시행하였을 때 volume reduction 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있다고 주장하였다. 같은 방법으로 예비 실험을 진행하였으며 ICG 를 web space 에 주입하고 실험을 진행하였다. Lymphatic vessel 과 lymph node 가 잘 조영되었으며 lateral vein 은 크기가 비교적 큰 편이었는데 popliteal artery 에서 분지되는 medial artery 의 크기가 매우 작아서 10-0 nylon 으로도 microanastmosis 를 정확하게 시행하는데 어려움이 있었다. 4 마리에서 수술을 진행하였는데 1 개의 lymph node 는 4 주 후에 viable 하였으나 1 개는 중간 정도의 결과를, 나머지 2 개는 non viable 한 결과를 보여서 consistent 한 실험 결과를 가져오기 힘들 수 있다고 생각되어 실험 모델을 수정하기로 결정하였다. 이전 rabbit hindlimb 에서의 lymphatic 의 recanalization 에 대한 논문에서 1mm excision 을 시행했을 때에는 4 주 후에 연결이 되는 것을 확인할 수 있었지만 3mm, 10mm 를 제거하였을 때에는 recanalization 이 일어나지 않는다고

발표하였다.<sup>24)</sup> 그래서 free vascularized lymph node transfer 의 대안으로 afferent lymph vessel 을 2cm 이상 주변 조직을 포함하여 충분히 박리를 시행한 뒤에 모두 제거해 주고 lymph node 를 feeding 하는 deep vessel 만 pedicled 의 형태로 완전히 들어준 뒤에 위치를 이동시킨 뒤 고정시키는 방법으로 실험을 진행하기로 하였다. 이는 mouse 나 sheep model 에서 lymph node transfer 의 효과를 보기 위해 시행된 보고들이 있었다. 이와 함께 국소적으로 약을 주입하거나 도포해 주었을 때 lymphangiogenesis 나 lymphedema 에 영향을 줄 수 있는 약제를 찾기 위해 다른 동물들에서의 실험을 조사해 보았다. 수술적인 치료들이 많이 연구되고 시행되고 있지만 림프 부종의 진행을 억제시키거나 상태를 호전시킬 수 있는 약제는 아직까지 없는 상태로 이에 대한 연구들이 동물실험으로 진행되고 있다. 림프부종에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 fibrosis 나 inflammation 을 억제하거나 lymphangiogenesis 에 관여하는 약제들에 대해 연구가 많이 진행되었으며, VEGF-C 에 대한 연구가 많이 진행되었지만, metastasis 등을 높일 수 있는 잠재적인 위험성이 있을 수 있는 단점이 있다. Selenite 와 ketoprofen 을 경구로 복용하였을 때 효과를 보였다는 논문들이 있었고 실험논문으로 ketoprofen 을 subcutaneous 하게 주입하거나 tacrolimus 를 국소적으로 도포하였을 때 효과가 있다는 논문이 있었다. Ketoprofen 을 4 달동안 하루 3 번 경구 복용시킨 placebo controlled trial 에서 skin thickness 를 줄이고 G-CSF 를 줄이는 결과를 보고하였으며 sodium selenite 를 3 달동안 복용시킨 경우 부피가 줄었다는 보고도 있었다. 2009 년 보고된 논문에서 ketoprofen 을 투여하였을 때 TNF-alpha 가 증가되지만 VEGF-C 를 induce 함으로써 lymphangiogenesis 를 촉진하고 edema 를 줄이고 inflammation 을 억제하면서 림프부종에 효과를 보인다고 하였다. 이에 토끼 모델에서 림프절을 절제하고 국소적으로 ketoprofen 을 주입했을 때의 영향에 대하여 비교해보고자 group 을 나누어 디자인하고 실험을 진행하였다. 하지만 토끼가 스트레스에 매우 민감하고 5 마리 중 1-2 마리가 1 주에서 6 주 사이에 반복적으로 폐사되는 부작용이 발생하여 수의사와 상의 후 이러한 그룹을 제외하고 실험 디자인을 단순화 시킨 후에 다시 진행하기로 하였다. Gardenier 등의 쥐의 꼬리를 이용한 림프부종 실험에서 국소적으로 tacrolimus 를 도포하였을 때 림프부종의 진행을 예방하는 효과 뿐 아니라 발생한 림프부종을 치료하는 데에도 효과를 보인다고

보고하였다. 이들은 혈관에 투입했을 때와 비교하여 혈중 약물의 농도를 측정하여 immunosuppression 을 일으키지 않고 안전하게 사용할 수 있음을 보고하였고 CD4+ cell 과 cytokine 들에 작용하는 기전으로 림프부종과 fibrosis 를 줄일 수 있다고 주장하였다. CD4+ deficient 한 athymic nude mice 에서 림프부종이나 tissue fibrosis 가 일어나지 않는다는 이전의 연구 결과가 있었으며 lymphangiogenesis 와 collateral lymphatic vessel formation 을 일으킨다고 보고하였다. 다만 저자들은 lymphangiogenesis 가 VEGF-C 나 VEGF-A 를 통한 기전은 아닐 것으로 생각하였고 T-cell inflammatory 반응을 줄이고 TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-4 등의 조절을 통한 것으로 생각하였다.

토끼를 이용한 림프부종 실험은 주로 귀에서 많이 시행되고 hindlimb 에서는 많이 시행되지 않았는데 mouse 나 rat 에 비해 크기가 커서 림프절의 조작이 용이하고 임상적인 결과를 확인하고 비교하기 좋을 것으로 생각하였다. 림프절 이식술과 함께 림프절 절제술 후 국소적인 Tacrolimus 연고 도포 치료의 효과를 보고자 하였는데 수술적인 치료가 우선이 되더라도 topical 한 치료가 효과가 있을 경우 많은 환자들에서 쉽게 적용될 수 있는 장점이 있다고 생각한다.

다리의 부피를 측정해 보았을 때 2 주째에 유의하게 부피가 증가하였다가 감소하는 양상을 보였으며 림프절 전이술을 시행했을 경우에는 4 주부터, 림프절 제거술을 시행했을 때에는 6 주에서 8 주에 걸쳐 서서히 줄어드는 양상을 보였다. VEGF-C 를 측정하였을 때 그룹 2 에서 그룹 1 에 비해 더 높은 수치를 보였으며 LYVE-1 도 높은 수치를 보였다. Tacrolimus 를 도포한 그룹 3 과 그룹 4 는 앞의 두 그룹에 비해서 부피 증가가 많지 않았고 완만하게 감소하는 양상을 보였다. VEGF-C, LYVE-1 은 8 주에서 좀 더 높았으며 림프절 전이술을 같이 시행한 경우 더 높게 나타났다. 다만 이러한 결과들은 RT-PCR 을 통한 RNA level 에서는 유의한 차이를 보이지 않은 한계점이 있으며 Tacrolimus 를 도포한 군들과 도포하지 않은 군들간에 ELISA 를 직접 비교하지 못한 한계점이 있다.

종합해 보면 토끼 모델에서 림프절 절제술을 시행한 뒤 림프절 이식술을 시행했을 때 VEGF-C 와 LYVE-1 이 증가하는 것을 ELISA 를 통해 확인할 수 있었으며 조직학적 검사에서 구조가 잘 유지되고 림프조영술에서 기능이 잘 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 다리의 둘레 변화를 보았을 때 술 후 2 주째에 유의하게 증가했던 수치가 기능이 회복되면서 감소하는 결과를

가져왔을 수 있다.

한편 Tacrolimus 는 다리 두께의 변화를 보았을 때 림프절 절제술만 시행한 군과 이식술까지 시행한 군 모두에서 부종을 호전시키는 결과를 보여주었다. VEGF-C는 림프절 이식술을 시행했을 때 다소 증가하는 결과를 보였고 LYVE-1 이 Tacrolimus 를 적용하지 않았을 때에 비해서 증가하는 양상을 보여주었다. 이는 Tacrolimus 를 이용한 이전의 mouse 연구에서와 비슷한 결과로 VEGF-C RNA level 은 증가하지 않았지만 LYVE-1 과 collateral lymphatic vessel 이 증가한 소견을 보였고 부종이 줄어든 양상을 보였다.

실험에서 사용된 토끼 모델은 림프절 절제술을 시행한 후에 일시적인 부종을 일으킨 뒤 림프절 이식술과 Tacrolimus 도포의 효과를 살펴보았는데 임상적으로 좀 더 의미있는 실험이 행해지기 위해서는 만성적이고 안정적인 림프부종 모델을 만들어야 할 것으로 생각된다. 한 연구에서 피부까지 광범위하게 조직을 절제하고 3일 뒤에 방사선 조사를 시행한 경우 80%에서 1년 동안 지속되는 림프 부종을 일으켰다는 보고가 있었다. 림프부종 모델이 잘 정립된 후에는 VEGF-C 나 retinoic acid 같은 다른 약제의 적용이나 국소적인 약물 치료에 대한 연구도 더 용이하게 진행할 수 있을 것으로 생각된다.<sup>26),27)</sup> 또한 향후에는 피부를 포함하여 조직 검사를 시행하여 피부의 두께와 피하에서의 변화에 대하여 좀 더 정량적으로 분석을 시행하고 rabbit specific 한 CD4, TGF-b 등 다른 cytokine 등에 대한 연구를 진행하여 Tacrolimus 의 작용 기전에 대하여 연구가 더 필요할 것으로 생각한다.

조직학적 검사에서 대조군과 비교하여 이식된 림프절이 viable 하였으며 새로운 림프 혈관이 연결되면서 잘 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 토끼에서 실시할 수 있는 ELISA kit 나 결합시킬 수 있는 항체 등이 많지 않은 등 기전을 정확히 밝히지 못한 한계점이 있지만 설치류에 비해 많이 시행되지 않은 비교적 큰 동물 모델에서 림프절 절제술 후 림프절 이식술과 Tacrolimus 국소 도포의 효과에 대하여 연구를 진행했으며 임상적인 차이를 직관적으로 확인할 수 있었다. 림프절 이식술의 효과를 생화학적 분석과 임상적 호전, 림프조영술과 조직학적 소견 등으로 확인할 수 있었고 국소적인 tacrolimus 의 도포는 증가된 LYVE-1 과 더불어 초기의 부종을 억제시키는 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

## V. 결론

토끼의 슬와부에서 림프절 절제술을 시행한 경우 부종이 생겼다가 8주가 지나면서 호전되는 양상을 보인 반면, 림프절 전이술을 시행했을 때에는 높아진 VEGF-C, LYVE-1 수치와 함께 2 주에 부피가 최대로 증가했다가 4 주가 지나면서 증상이 호전되는 양상을 보였다. 이식된 림프절은 구조가 잘 유지되면서 기능을 하는 것을 림프조영술과 조직학적 검사를 통해 확인할 수 있었다. Tacrolimus 를 국소적으로 도포하였을 때에는 LYVE-1 의 발현이 증가된 결과를 보였으며 림프절 절제술이나 전이술을 시행한 두 군 모두에서 임상적으로 다리의 부종을 예방하는 효과를 보였다.



## 참고문헌

1. Cormier HN, Askew RL, Mungovan KS, et al. Lymphedema beyond breast cancer: A systemic review and meta-analysis of cancer-related secondary lymphedema. *Cancer* 2010 Nov;116:5138-49
2. McLaughlin SA, Wright MJ, Morris KT, et al. Prevalence of lymphedema in women with breast cancer 5 years after sentinel lymph node biopsy or axillary dissection: objective measurements. *J Clin Oncol* 2008 Nov;26:5213-9
3. Schaverien MV, Coroneos CJ. Surgical treatment of lymphedema. *Plast Reconstr Surg*. 2019 Sep;144:738-58
4. Ito R, Suami H. Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg*. 2014 Sep;134:548-56
5. Saaristo AM, Niemi TS, Viitanen TP, et al. Microvascular breast reconstruction and lymph node transfer for postmastectomy lymphedema patients. *Ann Surg*. 2012 Mar;255:468-73
6. Aschen SZ, Farias-Eisner G, Cuzzone DA, et al. Lymph node transplantation results in spontaneous lymphatic reconnection and restoration of lymphatic flow. *Plast Reconstr Surg*. 2014 Feb;133:301-10
7. Gardenier JC, Kataru RP, Hespe GE, et al. Topical tacrolimus for the treat of secondary lymphedema. *Nat Commun*. 2017 Feb 10;8:14345
8. Van YR, Wald G, Lu C, et al. The effect of topical Tacrolimus on pedicled flap survival. *Ann Plast Surg*. 2020 Jul;85:118-21
9. Ruzicka T, Bieber T, Schopf E, et al. A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. European Tacrolimus multicenter atopic dermatitis study group. *N Engl J Med*. 1997 Sep 18;337:816-21
10. Wang C, Lin A. Efficacy of topical calcineurin inhibitors in psoriasis. *J Cutan Med Surg*. 2014 Jan;18:8-14
11. Mancuso G, Berdondini RM. Localized scleroderma: response to occlusive treatment with tacrolimus ointment. *Br J Dermatol*. 2005 Jan;152:180-2
12. Forte AJ, Boczar D, Huayllani MT, et al. Pharmacotherapy agents in lymphedema treatment: a systematic review. *Cureus*. 2019 Dec;11:e6300
13. Kasseroller RG, Schrauzer GN: Treatment of secondary lymphedema of the arm with

- physical decongestive therapy and sodium selenite:A review. *Am J Ther.* 2000, 7:273-9
14. Micke O, Bruns F, Mucke R, et al. Selenium in the treatment of radiation-associated secondary lymphedema. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003, 56:40-9
  15. Nakamura K, Radhakrishnan K, Wong YM, et al. Anti-inflammatory pharmacotherapy with ketoprofen ameliorates experimental lymphatic vascular insufficiency in mice. *PLoS One.* 2009, 4:8380
  16. Frueh FS, Gousopoulos E, Rezaeian F, et al. Animal models in surgical lymphedema research:a systematic review. *J Surg Res.* 2016 Jan;200:208-20
  17. Iwasaki D, Yamamoto Y, Murao N, et al. Establishment of an acquired lymphedema model in the mouse hindlimb:technical refinement and molecular characteristics. *Plast Reconstr Surg.* 2017 Jan;139:67-78
  18. Tobbia D, Semple J, Baker A, et al. Experimental assessment of autologous lymph node transplantation as treatment of postsurgical lymphedema. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Sep;124:777-86
  19. Fu K, Izquierdo R, Vandevender D, et al. Transplantation of lymph node fragments in a rabbit ear lymphedema model: a new method for restoring the lymphatic pathway. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Jan;101:134-41
  20. Ishikawa K, Maeda T, Funayama E, et al. Feasibility of pedicled vascularized inguinal lymph node transfer in a mouse model: A preliminary study. *Microsurgery.* 2019 Mar;39(3):247-54
  21. Honkonen KM, Visuri MT, Tervala TV, et al. Lymph node transfer and perinodal lymphatic growth factor treatment for lymphedema. *Ann Surg.* 2013 May;257:961-7
  22. Soto-Miranda MA, Suami H, Chang DW. Mapping superficial lymphatic territories in the rabbit. *Anat Rec (Hoboken).* 2013 Jun;296:965-70
  23. Fernández Peñuela R, Casaní Arazo L, Masiá Ayala J. Outcomes in Vascularized Lymph Node Transplantation in Rabbits: A Reliable Model for Improving the Surgical Approach to Lymphedema. *Lymphat Res Biol.* 2019 Aug;17:413-417
  24. Ikomi F, Yokoyama Y, Ogiwara N, et al. Recanalization of the collecting lymphatics in rabbit hind leg. *Microcirculation* 2006. Jul;13:365-76
  25. Slavin SA, Van Den Abbeele AD, Losken A, et al. Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. *Ann Surg.* 1999 Mar;229:421-7
  26. Zhou H, Wang M, Hou C, et al. Exogenous VEGF-C augments the efficacy of therapeutic lymphangiogenesis induced by allogenic bone marrow stromal cells in a rabbit model of limb secondary lymphedema. *Jpn J Clin Oncol.* 2011 Jul;41:841-6
  27. Choi I, Lee S, Kyoung Chung H, et al. 9-cis retinoic acid promotes lymphangiogenesis

and enhances lymphatic vessel regeneration: therapeutic implications of 9-cis retinoic acid for secondary lymphedema. *Circulation*. 2012 Feb 21;125:872-82

## English Abstracts

### Purpose

Lymph node transfer is a microsurgical surgery currently being in active research and practice. On the other hand, various drugs to aid in the treatment of lymphedema are being tested, especially in animal models. It is reported that topical application of tacrolimus can inhibit tissue fibrosis and promote lymphangiogenesis by inhibiting the role of T-cell and may have a role in preventing and treating lymphedema.

The purpose of this study was to investigate the effects of lymph node transfer and topical Tacrolimus application after lymph node excision in rabbit hindlimb model. Limb circumference measurement, lymphangiography, histologic examination, RT-PCR and ELISA analysis were done.

### Method

Experiments were conducted with male New Zealand white rabbits weighing between 2.5 and 3 kg.

The experiment was conducted by dividing the rabbits into five groups. Group 1 performed only lymph node excision, group 2 performed lymph node excision and transfer, group 3 applied tacrolimus after lymph node excision, group 4 applied tacrolimus after lymph node excision and transfer, and group 5 was the control group with no lymph node excision. Tacrolimus was applied to the skin once every 3 days after surgery, and the circumference of the leg was measured every 2 weeks. After 4 and 8 weeks, samples were collected and histological and immunohistochemical tests were performed.

### Results

Leg volume was maximally swollen at 2 weeks, normalized at 8 weeks after lymph node excision and at 4 weeks after lymph node excision and transfer. In the case of applying Tacrolimus, the increase was much smaller at 2 weeks, and the leg volume slightly increased and then gradually decreased regardless of whether or not lymph node transfer was performed. In RT-PCR, there was no significant difference between VEGF-C and LYVE-1 expressed higher in group 4, but it was not statistically significant. In the ELISA assay, VEGF-C was higher in group 2 than group 1 at 4 and 8 weeks, and higher in group 4 than group 3 at 8 weeks. LYVE-1 showed a higher expression at 8 weeks than at 4 weeks in each group, and tacrolimus groups showed higher expression compared with no tacrolimus groups. In lymphangiography, it was confirmed that the lymphatic vessels were connected to the transferred lymph nodes, and the histological examination confirmed that the structure of the lymph nodes was well maintained as in the control group.

#### Conclusion

In the lymph node excision group, the volume increased to a maximum at 2 weeks and improved after 8 weeks, whereas when lymph node transfer was performed, the volume improved after 4 weeks with elevated VEGF-C and LYVE-1 levels. It was confirmed that the transferred lymph nodes functioned while maintaining their structure well. Topical Tacrolimus was both effective in preventing hindlimb edema in both lymph node excision and transfer groups.

Key words: Lymph node transfer, lymph node excision, tacrolimus, topical treatment, lymphedema