

ПЯТИЛЕТНИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

ЧЕРВЯКОВ Ю.В.^{1,2}, СТАРОВЕРОВ И.Н.^{1,2}, ВЛАСЕНКО О.Н.¹,
БОЗО И.Я.³, ИСАЕВ А.А.³, ДЕЕВ Р.В.³

¹ Ярославский Государственный медицинский университет Минздрава РФ, кафедра хирургии института последипломного образования,

² Областная клиническая больница, отделение сосудистой хирургии, Ярославль

³ ПАО "Институт стволовых клеток человека", Москва, Россия

Представлен опыт комплексного консервативного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК), связанной с атеросклерозом периферических артерий с использованием первого отечественного зарегистрированного генотерапевтического препарата "Неоваскулген" (плазмида с геном vegf165). Проанализированы отдаленные результаты лечения 45 пациентов со II и III стадией заболевания по Покровскому–Фонтейну до срока 5 лет. У больных определяли динамику дистанции безболевого ходьбы (ДБХ), лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), линейной скорости кровотока (ЛСК), а также сохранность конечностей и выживаемость больных. У всех пациентов отмечена хорошая переносимость лечения, отсутствие побочных эффектов и осложнений. Клиническое улучшение при II степени ХИНК отмечено в 91% наблюдений при полной стабилизации клинического течения на протяжении 5 лет. Сохранность конечностей в этой группе составила 95%, выживаемость – 82%. При III степени ишемии улучшение отмечено у 78% больных, что проявилось уменьшением ее степени до II (44,4%) и до IA (33,3%). Прогрессирование ХИНК с последующей ампутацией констатировано в 22% наблюдений. Выживаемость больных – 78%. Таким образом, применение одного курса комплексного лечения, включавшего генотерапевтический препарат «Неоваскулген» у больных с ХИНК II и III степени приводит к стойкому положительному эффекту у значительного большинства пациентов в отдаленном периоде в сроки не менее 5 лет.

Ключевые слова: генная терапия, «Неоваскулген», периферический атеросклероз, хроническая ишемия нижних конечностей, отдаленные результаты, vegf165.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение пациентов с облитерирующими заболеваниями артериального русла нижних конечностей является одной из актуальных задач современной медицины; это подтверждается довольно высоким их распространением, а также относительно неблагоприятным прогнозом. Данная патология характерна для 3% населения всего Земного шара [1]. В Российской Федерации количество пациентов с перемежающейся хромотой составляет около 5% лиц пожилого возраста, из них нуждается в постоянном специализированном лечении и наблюдении не менее 1 млн человек [2]. Современная программа медицинской помощи этим больным заключается в проведении повседневной консервативной терапии согласно Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних

конечностей [3]. Если эффект недостаточен, ишемия конечности прогрессирует, то у части больных клинический успех может быть достигнут хирургическими вмешательствами. Существует мнение о том, что возможности дальнейшего улучшения результатов разработанных стандартных реконструктивных операций в бедренно-берцовой зоне практически исчерпаны. Первичная проходимость аллопротезов через 5 лет составляет 49%, аутовенозных шунтов – 69% [4]. Современные эндоваскулярные методы лечения окклюзий в бедренно-берцовом артериальном сегменте позволяют увеличить шансы больных на спасение конечности. Первичная проходимость артерий после эндоваскулярных процедур через 5 лет составляет 44% [4]. При этом около 20% пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей относятся к «неоперабельным», что связано с дисталь-

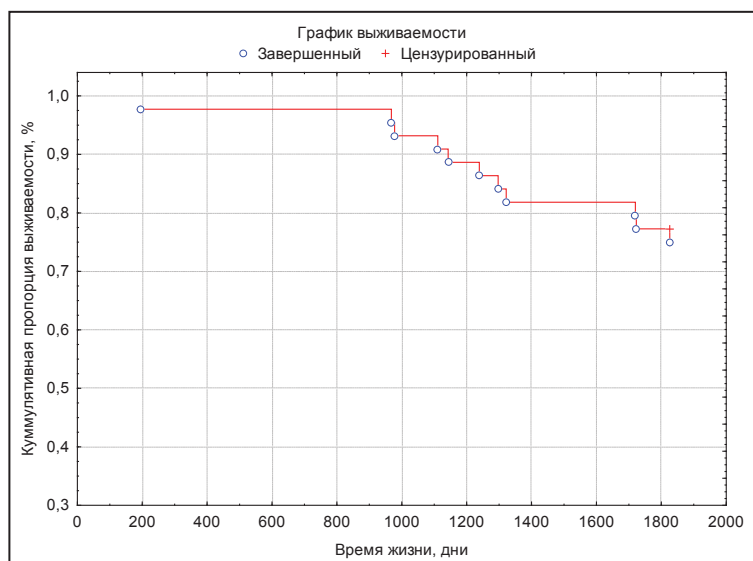


Рис. 1. Кумулятивная пропорция выживаемости больных в течение 5 лет (n=45).

ными или многоэтажными формами поражения сосудов. Выполнение сосудистых реконструкций у этих пациентов весьма ограничено в связи с большим количеством тромбозов зон реконструкции в ближайшем послеоперационном периоде [5]. Часто единственно возможным лечебным мероприятием для подобных пациентов при «критической ишемии» становится ампутация.

В настоящее время существует отчетливая потребность в поиске и развитии новых компонентов комплексного лечения, способствующих компенсации кровообращения у больных с хронической ишемией нижних конечностей (ХИНК). Инновационные методы лечения при широком использовании в специализированных и общехирургических стационарах позволяют сократить количество больных с «критической ишемией» конечности и, соответственно, уменьшить число высоких ампутаций, а также могут стать альтернативой реконструктивной хирургии в лечении дистальных, «неоперабельных» форм атеросклеротического поражения артерий нижних конечностей [3].

Обнадеживающие результаты использования в лечении больных с ХИНК терапевтического ангиогенеза в виде клеточной и генной терапии показывают многочисленные публикации последних лет [6–12]. Геннотерапевтические конструкции на основе *vegfl65* демонстрируют более убедительные положительные результаты [13, 14]. Они могут вносить существенный вклад в повышение эффективности комплексного лечения пациентов с ХИНК [15]. Единственным разрешенным к применению в России генным препаратом является «Неоваскулген». Показаниями к его использованию является ХИНК II и III степени по Покровскому–Фонтейну на фоне атеросклероза артерий нижних конечностей. Активным компо-

нентом препарата является плазмида с геном эндотелиального сосудистого фактора роста (Vascular Endothelial Growth Factor –165, VEGF165) [7].

Цель исследования: проследить отдаленные результаты использования генно-терапевтического препарата на основе плазмиды с геном *vegfl65* в комплексном консервативном лечении больных с ХИНК II и III степени по Покровскому–Фонтейну в течение 5 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С 2009 по 2010 гг. в исследование включено 45 пациентов с ХИНК II–III степени по Покровскому–Фонтейну, получавших консервативное лечение с применением препарата «Неоваскулген» в отделении сосудистой хирургии ГБУЗ ЯО «ОКБ». Средний возраст больных составил $63,3 \pm 5,8$ года. Мужчин – 36 (75%), женщин – 9 (25%). Все больные проходили стандартный курс сосудистой терапии, как в условиях стационара, так и амбулаторно. Все пациенты получили двукратное введение препарата «Неоваскулген» 1,2 мг в мышцы пораженной конечности согласно инструкции по медицинскому применению лекарственного средства [16].

Статистический анализ результатов проводился селективно в зависимости от исходной степени хронической ишемии на момент обращения в клинику. Для объективизации результатов лечения, статистическую обработку данных проводили в зависимости от степени тяжести заболевания на этапе начала исследования. Таким образом, все пациенты оказались распределенными на три неравные группы. Группа А – IА степень ХИНК – 5 пациентов. Средний возраст $57 \pm 8,2$ лет, гендерный состав: мужчин 5. Группа Б – IБ степень ХИНК – 22 больных. Средний возраст $62,45 \pm 8,6$ года, мужчин – 19, женщин – 3. Группа В – II степень ХИНК – 18 наблюдений. Средний возраст $64,5 \pm 10,0$ года, мужчин – 12, женщин – 6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве основного критерия эффективности был принят показатель дистанции безболевого ходьбы (ДБХ), определяемый по тредмил-тесту. Вторичные критерии эффективности: лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ); линейная скорость кровотока (ЛСК) по берцовым артериям на уровне голеностопного сустава. Оценивалась выживаемость пациентов и количество ампутаций. У части пациентов (36%) проводилось ангиографическое исследование дистального артериального русла перед началом исследования, через 6 месяцев и через 3 года после

введения препарата. Критерии оценки: увеличение коллатеральной сети на голени не отмечено, незначительное увеличение коллатеральной сети, умеренное увеличение и, значительное увеличение коллатеральной сети.

Клинико-лабораторные показатели исследова-

лись у всех больных до введения препарата, через 1, 3, 6 месяцев, затем ежегодно. Ежегодно выполняли скрининговое обследование на онкологическую патологию (флюорография, ФГДС, УЗИ брюшной полости, осмотр гинеколога для женщин). Общий срок наблюдения за больными – 5 лет.

На первом этапе статистического анализа применялись описательные методы с определением среднего значения (M), стандартной ошибки среднего значения (m), нижнего и верхнего квартилей (LQ и UQ), межквартильного размаха (IQR). С помощью критерия Шапиро–Уилка определялось соответствие распределения количественных признаков закону нормального распределения. Учитывая ненормальное распределение признаков для сравнения показателей в динамике, использовались непараметрические методы: метод Фридмана для одновременного сравнения значений каждого признака на всех сроках наблюдения и критерий Вилкоксона для попарного сравнения связанных групп (в случаях, когда по критерию Фридмана была выявлена статистическая значимость различий). Когда количество попарных сравнений превышало максимально допустимое число сравнений, применяли поправку Бонферрони. За уровень значимости принимали 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 графически представлена кумулятивная выживаемость всей группы больных при ХИНК II–III степени через 5 лет. Она составила 75,5%. Причины летальности: острый инфаркт миокарда (ОИМ) – 6, острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) – 3, онкологическая патология – 2. Сохранность конечностей у всех 45 больных после проведения генной терапии через 5 лет составила 89%. В разные сроки наблюдения у 5 пациентов выполнены ампутации нижних конечностей на уровне бедра по поводу прогрессирования хронической ишемии.

Для уточнения зависимости результатов консервативного лечения от исходной стадии заболевания, проведено сравнение диагностических показателей в группах. В группе А (IIA стадия) ДБХ в течение первого года в среднем увеличилась на 850 м. Т.е., все больные перешли

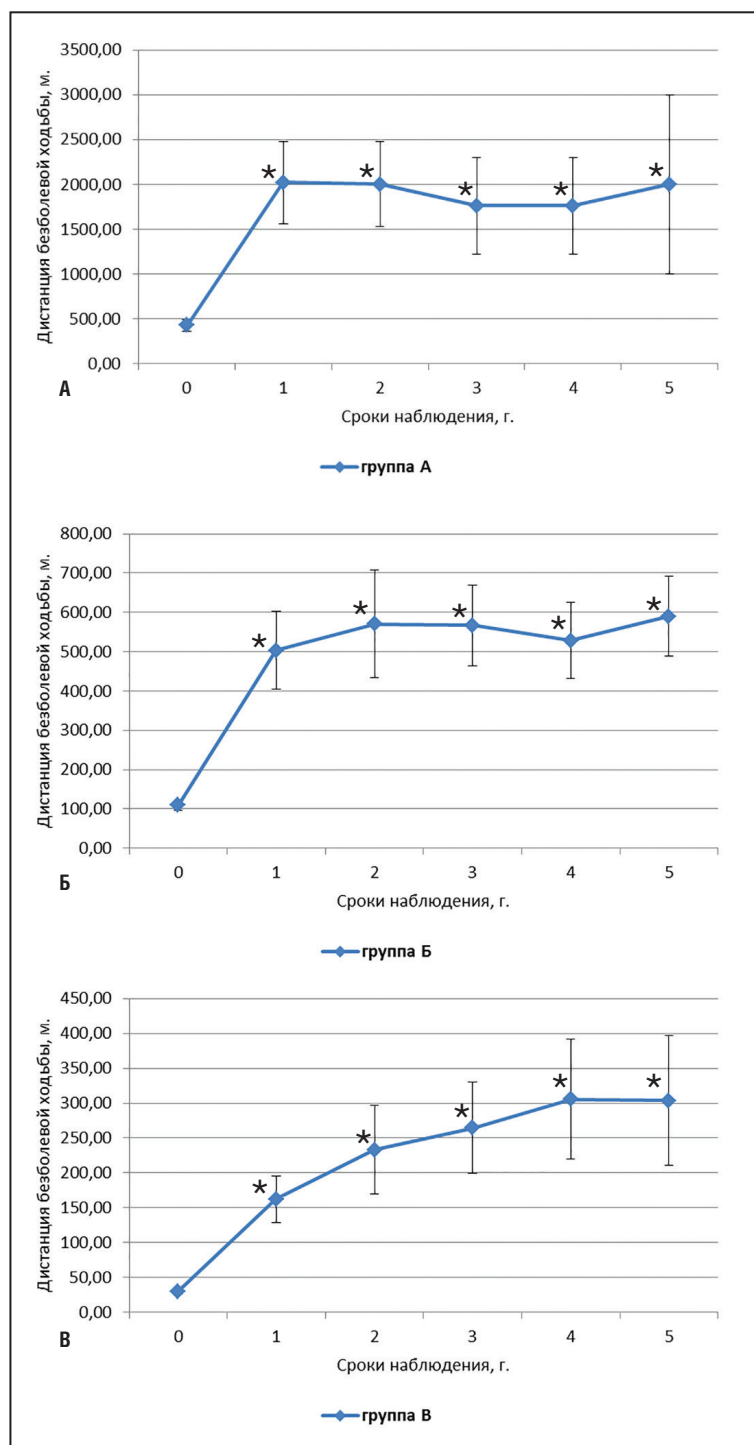


Рис. 2. Динамика изменения ДБХ в исследуемых группах в течение 5 лет наблюдения. Группа А - 2А ст. ХИНК; группа Б - 2Б ст. ХИНК; группа В - 3 ст. ХИНК.). * – различия с исходным уровнем при сравнении с исходным значением статистически значимы (p<0,05).

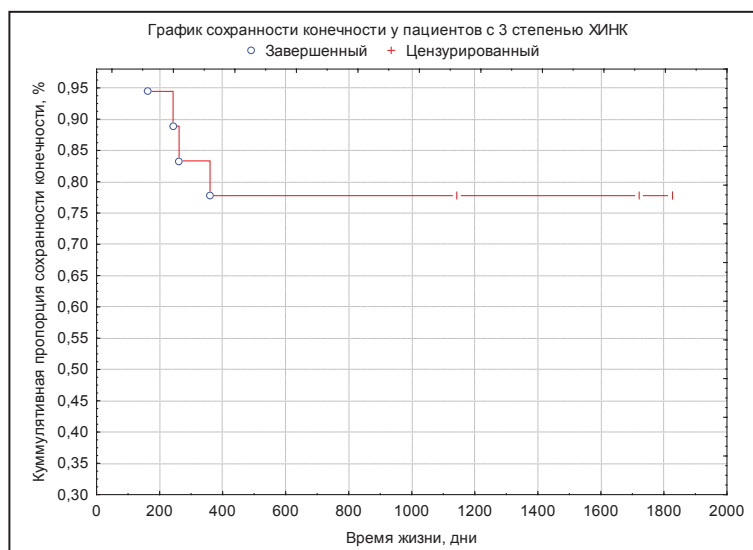


Рис. 3. Сохранность конечностей у больных группы С через 5 лет.

в I стадию заболевания. Этот показатель сохранился без значимой динамики на протяжении всех последующих 4 лет (рис. 2А). Во всех наблюдениях отмечено увеличение всех вторичных показателей эффективности, но учитывая небольшое количество пациентов (n=5) статистически оценивать эти данные сочли нецелесообразным. Сохранность конечностей за 5 лет наблюдения составила 100%. Выживаемость – 40% (на 4 году наблюдения отмечено 3 летальных исхода (ОНМК – 2, рак легкого – 1 (возраст – 65 лет))).

Результаты лечения в группе Б были более разнообразными. Динамика изменения основного критерия эффективности у пациентов группы Б представлена графически на рис. 2Б. Увеличение среднего показателя за первый год составило 456 м. В дальнейшем отмечен дальнейший рост ДБХ и к концу 5-го года наблюдений он составил в среднем 590 ± 102 м. Высокая степень достоверности изменения основного критерия эффективности лечения ($P \leq 0,001$) отмечена во всех промежутках времени по сравнению с исходным. Изменение ЛПИ, статистически оцененное с применением непараметрических функций, оказалось достоверным на 2, 4 и 5 годах наблюдения по сравнению с исходным уровнем ($P \leq 0,05$). Исходный показатель – $0,53 \pm 0,03$; через 1 год – $0,59 \pm 0,03$; через 5 лет – $0,62 \pm 0,04$. Исходное значение ЛСК – $16,6 \pm 2,4$ см/сек; через 1 год – $20,8 \pm 2,7$; через 5 лет – $22,8 \pm 3,3$ см/сек. Динамика показателя оказалась достоверной во всех промежутках времени по сравнению с исходными данными при использовании параметрических функций ($P \leq 0,05$).

Клиническое улучшение через один год после проведения курса генной терапии в группе Б отмечено в 91% наблюдений. При этом 62% пациентов

(n=13) перешли из ПБ в ПА стадию заболевания. За второй год еще двое больных перешли в более легкую стадию, и их количество составило 71% (n=15). В течение последующих лет отмечена полная стабилизация клинического течения ХИНК у всех больных. Сохранность конечностей за весь срок наблюдения – 95% (1 ампутация на 5 году наблюдения – у пациента с фоновым сахарным диабетом). Выживаемость в группе – 82% (летальность в различные сроки от ОИМ – 4).

В группе В (больные с критической ишемией нижних конечностей, ДБХ менее 50 м, болями в ноге в покое, без трофических нарушений) получены следующие результаты лечения. Дистанция безболевого ходьбы исходная ДБХ 30 ± 3 м; через 1 год – 162 ± 33 м; через 5 лет –

304 ± 93 м. Основным критерий эффективности лечения показал значительный устойчивый рост во всех промежутках времени по сравнению с исходным ($P \leq 0,001$ или $P \leq 0,002$) (рис. 2В). Изменение средних показателей ЛПИ в этой группе оказалось статистически достоверным во все контрольные временные точки ($P \leq 0,05$). Лодыжечно-плечевой индекс исходно – $0,25 \pm 0,03$; через 1 год – $0,31 \pm 0,03$; через – 5 лет $0,32 \pm 0,03$. Среднее значение линейной скорости кровотока до проведения генной терапии – $7,4 \pm 1,6$; через 1 год – $10,8 \pm 2,6$; через 5 лет – $14,8 \pm 3,6$ см/сек. Отмечено достоверное увеличение данного показателя во всех промежутках времени по сравнению с исходным ($P \leq 0,05$).

В целом, в группе В через 1 год клиническое улучшение отмечено в 78% наблюдений. При этом у 44,4% пациентов (n=8) хроническая ишемия уменьшилась до ПБ степени, а у 6 больных (33,3%) – даже до ПА степени. В дальнейшем у большинства пациентов отмечена стабилизация состояния без рецидива критической ишемии. Выживаемость больных за весь срок наблюдения – 78% (летальность: после ампутации – 1, ОИМ – 1, ОНМК – 1, от злокачественной опухоли почки в возрасте 82 лет на 4 году наблюдения – 1).

При анализе сохранности конечностей у больных с III степенью ХИНК установлено, что к пятилетнему рубежу она составляет 78% (рис. 3). У 3 пациентов в течение первого года и в одном в течение второго года выполнены ампутации нижних конечностей на уровне бедра по поводу прогрессирования хронической ишемии. Эти результаты являются достаточно обнадеживающими по отношению к современной консервативной терапии, эффективность которой при критической ишемии не превышает 40% в сроки наблюдения до 3 лет [17, 18].

Дополнительным методом исследования, который давал возможность визуализации новообразованных коллатералей в ишемизированных конечностях, являлась рентгенконтрастная ангиография. Ее выполнили у 16 больных (36%) до введения препарата и через 6 месяцев после лечения. Первичные и повторные ангиограммы выполнялись на одном ангиографе, одним специалистом с такой же временной задержкой снимков, скоростью и объемом введения контрастного вещества. В целом, у подавляющего большинства пациентов зарегистрированы изменения ангиоархитектоники дистальных сегментов нижних конечностей. Только у 2 (12,5%) пациентов не отмечено увеличения коллатеральной сети на голени. Незначительная положительная динамика зафиксирована в 2 наблюдениях (12,5%); умеренное увеличение у 6 (37,5%) и значительное увеличение коллатеральной сети еще у 6 (37,5%) больных. Таким образом, у подавляющего числа пациентов (75%) отмечена убедительная динамика в виде роста коллатеральной сосудистой сети на голени, что напрямую коррелировало с клинической эффективностью. Через 3 года после начала лечения выполнили контрольное ангиографическое исследование у 10 (63%) пациентов из этой группы. Отмечена полная стабилизация ангиографической картины в дистальном артериальном русле (аналогичный результат, как и через 6 месяцев после лечения).

Клинико-лабораторные показатели, которые регулярно исследовались в течение всего периода лечения и наблюдения за всеми пациентами не выявили значимых отклонений от первоначальных значений. За весь период наблюдения не отмечено нежелательных явлений напрямую связанных с использованием препарата. Возникновение онкологических заболеваний у 3 больных в сроки превышающие 3 года после начала лечения не позволяют сделать вывод о наличии связи онкологической патологии с генной терапией.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проангиогенная терапия показана больным с периферическим атеросклерозом магистральных артерий нижних конечностей при IIА и Б стадиях заболевания, когда нет показаний для оперативного лечения, а качество жизни больных страдает за счет невысокой дистанции безболевого ходьбы. Процесс неоангиогенеза, происходящий в мышцах ишемизированной голени, позволяет улучшить микроциркуляцию за счет развития новых коллатералей. При этом не отмечено влияния на сам процесс атеросклероза в магистральных артериях. Наблюдение за больными в сроки до 5 лет показывает, что у большей части больных идет прогрессирование заболевания в проксимальном артериальном русле

(подвздошных и общих бедренных артериях). При этом рецидива ишемии конечности не происходит, т.е. развившиеся артериолы и капилляры продолжают адекватно кровоснабжать мышцы голени.

В настоящее время имеется большой разрыв между количеством пациентов с хронической ишемией нижних конечностей, которым требуется хирургическое лечение и возможностью оказания специализированной помощи этой группе больных. Генная терапия, при ее широком использовании в специализированных и общехирургических стационарах, позволит снизить необходимость в оперативных пособиях. Лечение препаратом на основе гена *vegfl65*, проведенное больным при субкритической ишемии IIБ степени позволяет не только предотвратить прогрессирование заболевания, значительно уменьшить риск возникновения гангрены конечности но, что так же актуально, увеличить в 4–5 раз дистанцию безболевого ходьбы, что улучшает качество жизни пациентов. При критической ишемии конечности, когда риск ампутации в течение первого года наблюдения превышает 50%, генная терапия приводит к сохранению конечности у 78% больных на протяжении 5 лет.

Наш опыт лечения более 100 больных с различными стадиями облитерирующих заболеваний позволяет сделать вывод о том, что наибольшая эффективность генной терапии наблюдается при применении её у пациентов со II и III стадией заболевания по Покровскому–Фонтейну и сохранении возможности даже минимального передвижения. Таким образом, применение *pl-vegfl65* наиболее целесообразно по принципу превентивной терапии на стадии перемежающейся хромоты, не дожидаясь появления трофических изменений и необходимости хирургического лечения.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень № 317, 2011.
2. *Савельев В.С., Кошкин В.М., Каралкин А.В.* Патогенез и консервативное лечение тяжелых стадий облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей. М.: МИА, 2010; 214.
3. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ). Периферические артерии. М., 2010; 1: 29–35.
4. *Затевахин И.И., Шиповский В.Н., Золкин В.Н. и др.* Отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных операций в коррекции окклюзионно-стенозных поражений артерий бедренно-подколенного сегмента. Ангиология и сосудистая хирургия. 2011; 17: 3: 59–62.
5. Клиническая ангиология. Под ред. А.В. Покровского. В 2 т. М.: Медицина, 2004; 2: 184–228.

6. Григорян А.С., Шевченко К.Г. Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций содержащих ген VEGF. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; 6: 3: 24–28.
7. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсесян Е.Г. и др. Терапевтический ангиогенез в лечении больных с хроническими облитерирующими заболеваниями нижних конечностей. Ближайшие и отдаленные результаты. Ангиология и сосудистая хирургия. 2012; 18: 3: 19–26.
8. Шойхет Я.Н., Хорев Н.Г. Клеточные технологии в лечении заболеваний периферических артерий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; 6: 3: 15–23.
9. Marui A., Tabata Y., Kojima S., et al. A Novel Approach to Therapeutic Angiogenesis for Patients With Critical Limb Ischemia by Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor Using Biodegradable Gelatin Hydrogel An Initial Report of the Phase I–IIa Study. Circ. J. 2007; 71: 1181–1186.
10. Powell R.J., Simons M., Mendelsohn F.J., et al. Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Assess the Safety of Intramuscular Injection of Hepatocyte Growth Factor Plasmid to Improve Limb Perfusion in Patients With Critical Limb Ischemia. Circulation. 2008; 118: 58–65.
11. Morishita R., Makino H., Aoki M., et al. Phase I/II Clinical Trial of Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer to Treat Critical Limb Ischemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011; 31: 713–720.
12. Henry T.D., Hirsch A.T., Goldman J., et al. Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. Gene Therapy. 2011; 18: 788–794.
13. Деев Р.В., Григорян А.С., Потапов И.В. Мировой опыт и тенденции генной терапии ишемических заболеваний // Ангиология и сосудистая хирургия. 2011; 17: 2: 145–154.
14. Талицкий К.А., Булкина О.С., Арефьева Т.И. и др. Эффективность терапевтического ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011; 6: 3: 89–98.
15. Гавриленко А.В., Воронов Д.А. Результаты комплексного лечения больных с хронической ишемией нижних конечностей с использованием генных технологий стимуляции ангиогенеза. Ангиология и сосудистая хирургия. 2015; 21: 3: 7–14.
16. Червяков Ю.В., Староверов И.Н., Нерсесян Е.Г. и др. Возможности генной терапии при хронических облитерирующих заболеваниях артерий нижних конечностей. Хирургия им. Н.И. Пирогова. 2014; 4: 40–45.
17. Джаффа М.Р., Молер Э.Р. Заболевания периферических артерий. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2010; 224.
18. Диагностика и лечение пациентов с критической ишемией нижних конечностей. Российский консенсус. М. 2002; 40.

FIVE-YEAR RESULTS OF TREATING PATIENTS WITH CHRONIC LOWER LIMB ISCHAEMIA BY MEANS OF GENE ENGINEERING

Chervyakov Yu.V.^{1,2}, Staroverov I.N.^{1,2}, Vlasenko O.N.¹, Bozo I.Ya.³, Isaev A.A.³, Deev R.V.³

¹ *Chair of Surgery of the Institute of Postgraduate Education, Yaroslavl State Medical University of the Public Health Ministry of the Russian Federation,*

² *Regional Clinical Hospital, Department of Vascular Surgery, Yaroslavl,*

³ *Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia*

The authors share their experience in comprehensive conservative treatment of patients presenting with chronic lower limb ischaemia (CLLI) associated with atherosclerosis of peripheral arteries by means of the first Russian registered gene therapeutic agent “Neovasculgen” (plasmid with the vegf165 gene), analysing the long-term outcomes of treating a total of 45 patients with stage II and III CLLI according to the classification of Pokrovsky–Fontain. The patients were followed up for 5 years. Efficacy of treatment was assessed by registering the dynamics of the pain-free walking distance (PFWD), linear blood velocity (LBV), ankle-brachial index (ABI), as well as the limb salvage rate and survival of patients. All patients showed good tolerance of treatment, with neither side effects nor complications noted. Clinical improvement in stage IIB CLLI was observed in 91% of patients with complete stabilization of the clinical course during 5 years. The limb salvage rate in this group amounted to 95%, with the survival rate equalling 82%. In patients with stage III CLLI, improvement was noted in 78% of cases, manifesting itself by a decrease of its degree to stage IIB (44.4%) and to stage IIA (33.3%). Progression of CLLI followed by amputation was registered in 22% of cases, with the survival rate of 78%.

Hence, the use of a single course of combined treatment including the gene therapeutic agent “Neovasculgen” in patients with stage II and III CLLI resulted in a persistent positive effect in a considerable majority of patients in the remote period of not less than 5 years.

Key words: *gene therapy, “Neovasculgen”, peripheral atherosclerosis, chronic lower limb ischaemia, remote results, vegf165.*
