



# KRONİK YARADA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

**Editörler**

Selçuk BAKTIROĞLU

Şamil AKTAŞ



KRONİK YARADA GÜNCEL YAKLAŞIMLAR

## **Kronik Yarada Güncel Yaklaşımlar**

---

Editörler: Selçuk BAKTIROĞLU, Şamil AKTAŞ  
1. Baskı, Kasım 2013, İSTANBUL  
Para ile Satılmaz.

Kapak Fotoğrafı:  
Mismari siğillerin dağılması. Şerafeddin Sabuncuoğlu (1386-1470)  
Kitâbü'l-Cerrâhiyyetü'l-Hâniyye

## İÇİNDEKİLER

<b>Kronik Yara Sınıflandırmaları.....</b>	<b>1</b>
<i>Mesut MUTLUOĞLU</i>	
<b>Kronik Yarada Revaskülarizasyon: Ne Zaman? Nasıl? Kime?.....</b>	<b>12</b>
<i>Fatih YANAR, Selçuk BAKTIROĞLU</i>	
<b>Kronik Yarada Revaskülarizasyon Yöntemi Olarak Cerrahi.....</b>	<b>24</b>
<i>Bekir İNAN, Tuna TÜRKKOLU</i>	
<b>Kronik Yarada Epidermal Büyüme Faktörünün (EGF) Kullanımı.....</b>	<b>66</b>
<i>Şamil AKTAŞ</i>	
<b>Yağ Dokusundan Elde Edilen Kök Hücrelerin Kronik Yara Tedavisinde Kullanımı</b>	<b>82</b>
<i>Günalp UZUN</i>	
<b>Yara Aletleri.....</b>	<b>90</b>
<i>Ali BARUTÇU</i>	
<b>Yarada Gümüş Kullanımı.....</b>	<b>96</b>
<i>Bengüsu MİRASOĞLU</i>	
<b>Kronik Yara ve Vasküler Kalsifikasyon.....</b>	<b>108</b>
<i>Tevfik ECDER</i>	
<b>Basınç Ülserlerinde Etiyoloji ve Fizyopatoloji.....</b>	<b>116</b>
<i>Ayişe KARADAĞ, Arzu KARABAĞ AYDIN</i>	
<b>Basınç Ülserlerinde Değerlendirme.....</b>	<b>138</b>
<i>Ayişe KARADAĞ, Pınar AVŞAR</i>	
<b>Basınç Ülserlerinin Önlenmesi.....</b>	<b>186</b>
<i>Ayişe KARADAĞ, Şenay GÜL</i>	
<b>Diyabetik Ayak Ülseri Olan Hastada Kan Şekeri Düzenlenmesi.....</b>	<b>210</b>
<i>Ayşe KUBAT ÜZÜM, İlhan SATMAN</i>	
<b>Diyabetik Ayak Ülserlerinin Tanı ve Tedavisinde Laboratuar.....</b>	<b>220</b>
<i>Nurdan GÜL, İlhan SATMAN</i>	

# KRONİK YARADA EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN (EGF) KULLANIMI

Şamil AKTAŞ

## YARA İYİLEŞMESİ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Yara iyileşmesi sıralı, bununla birlikte birbiri ile iç içe geçen inflamasyon dönemi, proliferasyon dönemi, olgunlaşma ve yeniden yapılanma dönemlerinden oluşur. Bu dönemlerde birçok hücre grubu görev alır. Bunların bir kısmı bizzat hücrenel olarak varlık gösterirken, bir kısmı da ürettikleri büyüme faktörleri, sitokin ve kemokin gibi kimyasal ajanların etkisi altındadır. Bu kimyasal ajanlar ya hücrelerin faaliyetlerini uyarır, ya bazılarının faaliyetlerini inhibe eder ya da sinyal görevi görürler. Normal yara iyileşmesinin türlü nedenlerle bir fazında takılıp kalma olarak adlandırabileceğimiz kronik yara durumunda bu süreçler çok daha fazla karmaşıklaşırlar. Normal yara iyileşmesi ve kronik yara iyileşmesinin dönemleri, her bir dönemde görev alan hücreler, hücrenel faaliyetleri etkileyen mediyatörler *Güncel Yönleriyle Kronik Yara Kitabında* ayrıntılı olarak ele alınmıştır<sup>1</sup>.

Büyüme faktörleri, son derece karmaşık yara iyileşmesi sürecinde hücre göçü, bunların bölünmeleri, farklılaşmaları ve protein üretimlerinde hücreler arasındaki iletişimi sağlayan ve adeta bir orkestrayı yönetir gibi görev üstlenen elemanlardır. Belli başlı büyüme faktörü ve sitokin grubu, bunların üretildikleri hücreler, etkiledikleri hedef hücreler ve yara iyileşmesinde görev aldıkları aşamalar ve başlıca etkileri Tablo 1’de gösterilmiştir<sup>1-4</sup>.

Bunlardan PDGF, TGF, EGF, FGF, VEGF, KGF gibileri akut yara ortamlarında artmış olarak saptanırken kronik yara ortamlarında miktarlarının azaldığı görülür. Oysa IL’ler ve TNF’lerin miktarı hem akut yara ortamında hem de kronik yara ortamında artmıştır.

Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi basamaklarına etkileri göz önüne alınarak tedavi amacıyla kullanımları gündeme gelmiştir. Kronik yara ortamında bu faktörlerin miktarı ve etkileri araştırılmıştır<sup>5,6</sup>. Günümüze kadar PDGF, EGF, KGF ve VEGF gibi büyüme faktörleri deneysel ve klinik olarak yara iyileşmesinde kullanılmıştır.

Bu büyüme faktörlerinin yara üzerine uygulanması için rekombinant üretim tekniği gerekmektedir. Biyoteknolojik bir yöntem olan rekombinant üretim tekniği ile gerçekte var olmayan bir DNA, laboratuvar yöntemleriyle, örneğin klonlamayla üretilir. Bu amaçla çeşitli fiziksel koşullar, laboratuvar yöntemleri, mikroorganizmalar kullanılır. Teknik, ilk kez Stanford Üniversitesi’nde bir doktora öğrencisi olan Peter Lobban tarafından ortaya atılmıştır. Bu alandaki ilk patent başvurusu da yine Stanford Üniversitesi tarafından Stanley Cohen ve Herbert Boyer adına alınmıştır. Bu teknikle üretilen en popüler ilaç rekombinant insan insülini olmuştur<sup>7</sup>. Günümüzde hayvancılıktan ziraate, aşı üretinden hormon üretimine kadar birçok alanda rekombinant yöntemden yararlanılmaktadır.

Kronik yara ortamında büyüme faktörlerinin düşük saptanması, bunların yaraya topikal olarak eklenmeleri düşüncesini de beraberinde getirmiştir. Böylece PDGF, EGF, KGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin rekombinant yolla elde edilmiş biçimleri topikal olarak uygulanmıştır. Başka bir yol da bu büyüme faktörlerini adeta bir “büyüme faktörü kokteyli”

gibi sağlayacak trombositten zengin plazmayı yaraya uygulamak olmuştur<sup>8-10</sup>. Bu yönde başka bir yol da in vitro olarak elde edilen deri eşdeğerlerinin yaraya uygulanması ve bu ürünün yaraya büyüme faktörü sağlaması olarak düşünülmüştür<sup>11</sup>.

Topikal PDGF'in kronik yaralarda uygulanması, becaplermin jenerik ismi ile oldukça yaygınlık kazanmıştır. 5 cm<sup>2</sup>'ye kadar infekte olmayan nöropatik diyabetik ayakta uygulanması için ruhsatlandırılan becaplermin ile yapılan randomize çalışmalarda istatistik olarak anlamlı bir iyileşme sağlandığı kadar<sup>12-13</sup>, anlamlılık kazanmayan çalışmalara da rastlanmaktadır<sup>14-16</sup>.

**Tablo 1.** Yara iyileşmesinde görev alan sitokin ve büyüme faktörleri

Büyüme faktörü	Üretildiği hücreler	Etkilediği hücreler	Etkisi
PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	Trombosit	Lökosit	İnflamasyon
	Makrofaj	Makrofaj	Granülasyon dokusu oluşumu
	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	Endotel hüç.	Fibroblast
TGF (Transforming Growth Factor)	Trombosit	Fibroblast	Re-epitelizasyon
	Keratinosit	Keratinosit	TGF- $\alpha$ : Keratinositlere ve fibroblastlara mitojenik etki
	Dönüştürücü büyüme faktörü)	Lenfosit	Lökosit
EGF (Epidermal Growth Factor)	Trombosit Makrofaj	Keratinosit	TGF- $\beta$ : Anjiogenez, kolajen üretimini uyarır.
	Fibroblast	Fibroblast	İnflamasyon hücrelerinin göçünü artırır.
FGF (Fibroblast Growth Factor)	Makrofaj	Keratinosit	Keratinositlere ve fibroblastlara mitojenik etki
	Mast hücresi	Fibroblast	
	Lenfosit	Fibroblast	
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	Endotel hüç.	Endotel hüç.	Keratinosit göçünü uyarır.
	Keratinosit	Makrofaj	
	Fibroblast		
Vasküler endotelial büyüme faktörü	Makrofaj		Anjiogenez

<b>KGF</b> (Keratinocyte Growth Factor) Keratinosit büyüme faktörü	Fibroblast	Keratinosit	Keratinosit göçünü, diferansiyasyonunu ve proliferasyonunu uyarır.
<b>TNF</b> (Tumor Necrosis Factor) Tümör nekroz faktörü	Makrofaj Mast hücresi Lenfosit	Makrofaj Fibroblast Endotel hüç.	Makrofajları aktive eder. Fibroblastlara mitojenik etki Anjiogenezi uyarır.
<b>Interlökinler</b> (IL-1, IL-4, IL-6, and IL-8)	Makrofaj Mast hücresi Keratinosit Lenfosit	Endotel hüç. Makrofaj Keratinosit Lökosit Fibroblast	IL-1 –Nötrofil, fibroblast ve keratinosite kemotaktik etki. Nötrofilleri aktive eder IL-4- Fibroblast farklılaşmasını aktive eder, kollajen sentezini uyarır. IL-6 – İnflamasyon, anjiogenez, reepitelizasyon ve kollajen üretimine etki eder. IL-8 – Nötrofil ad-ezyonunu, kemotaksisini ve granül içeriğinin salınmasını kolaylaştırır.

Büyüme faktörlerinin kronik yaralarda uygulanması amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Her ne kadar bu alanda henüz ruhsat alınmamış olsa da bası yaralarında becaplerin<sup>17</sup>, infekte diyabetik ayaklarda granulosit koloni uyarıcı faktör<sup>18</sup>, bası ülserlerinde FGF<sup>19</sup> kullanımına ait olumlu sonuçlara rastlanmaktadır.

## EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

Yara iyileşmesi ile ilgisi açısından üzerinde belki de en fazla çalışma yapılan grup epidermal büyüme faktörü grubudur. Bu grubun üyeleri: EGF, heparin bağlayan EGF (HB-EGF), dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ), epiregulin, amphiregulin, betacellulin, epigen, neuregulinler (NRG-1, NRG-2, NRG-3, NRG-4, NRG-5 ve NRG-6)'dir<sup>3</sup>. Bu 13 alt üye bir tirozin kinaz transmembran proteini olan reseptör ile (EGFR) birleşirler. Tüm epidermiste ve bilhassa bazal membranda meydana gelen bu birleşme reseptörün dimerizasyonuna ve otofosforizasyonuna yol açar. Bu süreç çok çeşitli yollarla mitojenik etki gösterir; DNA sentezini, hücre bölünmesini ve proliferasyonunu artırır<sup>3,4</sup>.

Elliüç aminoasit zincirinden oluşan bir polipeptid olan epidermal büyüme faktörü aynı zamanda ilk kez bulunan büyüme faktörlerindedir. 1962 yılında Stanley Cohen tarafından fare

submaksiller tükürük bezinden izole edilmiştir<sup>20</sup>. Cohen bu çalışmaları ile 1986 yılında fizyoloji ve tıp dallarında Nobel ödülüne layık görülmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarla EGF'in trombositler, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından üretildiği ve keratinositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri üzerine otokrin ve parakrin etkilere sahip olduğu bulunmuştur<sup>21</sup>.

### **Akut yaralarda EGF**

Epidermal büyüme faktörünün topikal olarak akut yara iyileşmesinde kullanılması oldukça eskidir. Savage ve Cohen deneysel olarak yaralanan kornea epitelinde topikal olarak uygulanan EGF'den yarar sağlamışlardır<sup>22</sup>. Tavşan kulağında açılan deneysel akut yarada, Franklin ve Lynch, 12 saatte bir uygulanan topikal EGF ile daha hızlı ve daha iyi bir iyileşme sağladıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonucuna göre epitel daha kalın oluyor ve daha fazla hücre bulunuyordu. Fibroblast sayısı da daha fazlaydı ve kontrol grubuna göre daha erken görülmüyordu. Yaralar ayrıca daha erken olgunlaşıyor ve çevre dokulara daha hızlı benziyorlardı. Yarada kontraktür ve deformite de EGF ile tedavi edilen kulaklarda daha azdı<sup>23</sup>.

Benzer biçimde insan donör alanlarında<sup>24</sup>, insanda ciddi göz yanıklarında ve tavşan korneasının deneysel alkali yanıklarında<sup>25,26</sup>, deneysel duman inhalasyonu geliştirilen koyun trakealarında<sup>27</sup>, ösafagusun deneysel alkali yanıklarında<sup>28</sup> topikal EGF kullanımı yararlı sonuçlar vermiştir. Akut yaralanmalarda gözlenen bu sonuçlara dayanarak topikal EGF'in kronik yaralarda da kullanılabilceği düşünülmüş ve bu yönde çalışmalara girilmiştir. Bununla birlikte topikal EGF'in akut yaralara uygulanması ile kronik yaralara uygulanması açısından bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu temel olarak akut ve kronik yara ortamlarının sahip oldukları farklılıklara bağlıdır<sup>29</sup>.

### **Kronik yaralarda EGF**

Akut yaraların tersine kronik yara ortamında PDGF, bFGF, EGF ve TGF- $\beta$  miktarı daha düşük bulunmaktadır<sup>30</sup>. Bu ya büyüme faktörlerinin ekstrasellüler matris tarafından tutulmasına<sup>31</sup>, ya da kronik yara ortamında aşırı miktarda bulunan proteazlar tarafından yıkılmasına bağlıdır<sup>32</sup>. Akut yaralardan alınan sıvılar fibroblast ve endotel hücrelerinde proliferasyon sağlarken kronik yaralardan alınan sıvılar fibroblast, endotel hücreleri ve keratinositlerin gelişimini baskılamaktadır. Bu tür bir yara ortamı topikal büyüme faktörlerinden yararlanımı sınırlayabilir<sup>33</sup>. Topikal olarak uygulanan EGF, uygulanma alanından hızlı temizlenmektedir. Bunun olası sebebi proteazlar tarafından yıkılma ya da reseptörler tarafından hücre içine çekilme olabilir<sup>34</sup>. Kronik ve akut yara sıvıları ile yapılan bir çalışmada EGF yıkımı kronik yara sıvısında akut yara sıvısına oranla önemli miktarda yüksek bulunmuştur (%28,1'e karşılık %0,6). EGF aktivitesi de kronik yara sıvısında anlamlı biçimde düşüktür<sup>35</sup>. Falanga ve arkadaşlarının venöz ülser hastalarında yürüttükleri bir çalışmada kullanılan topikal EGF, kapanan ülser sayısında ve kapanan ülser alanında artış sağlasa da bu artışlar istatistik olarak anlamsız bulunmuştur<sup>36</sup>.

EGF'in kronik yaralarda kullanımı ile ilgili yayınlar incelendiğinde 1960'lı yıllardan 1980'lere kadar az sayıda akut yarada kullanım; 1984'de rekombinant EGF sentezi ile birlikte 1990'lara doğru hızla tırmanan kronik yarada kullanıma ait çalışmalar izlenmektedir. Bu yıllardan sonra çalışmalar bir plato oluşturmuş durumdadır. Son yıllardaki çalışmalar EGF'in yara tedavisinde etkinliği ile değil, daha çok yarada dayanıklılığının artırılması, daha uzun süre kalması, yaraya kontrollü biçimde salınmasıyla ilgilidir<sup>34,37</sup>. EGF'i yaraya taşımak, burada

daha uzun süre etkin kalmasını sağlamak, etkinliğini arttırmak için bir çok taşıyıcı denenmiştir. Bunlar arasında jelatin bazlı malzemeler<sup>38,39</sup>, chitosan ve nanopartiküller<sup>40,41</sup>, hidrojel<sup>42-43</sup>, nanoteknolojik ürünler<sup>44-47</sup> ve diğerleri bulunmaktadır<sup>48,49</sup>.

Günümüzde en az üç ülkede; Hindistan, Güney Kore ve Küba'da EGF ticari olarak üretilmekte ve pazarlanmaktadır. Klinik uygulamalar da genellikle bu ülkelerin ürünlerinde yoğunlaşmaktadır.

### **Topikal EGF ile klinik uygulamalar**

Güney Kore'den Hong ve arkadaşlarının yürüttükleri ve diyabetik ayak yarası bulunan 89 hastayı kapsayan prospektif bir çalışma, günde iki kez %0,005 EGF uygulanmasını değerlendirmektedir. Ortalama süresi 6 ay olan yaralar debride edildikten sonra önce hidrokolloid veya kompozit yara örtüsü ile 3 hafta izlenmişlerdir. Hastaların 21'i bu yolla yarar sağlamışlardır. Ancak yara örtüsünden yarar sağlamayan 68 hastaya bu kez yara örtüsüne ek olarak EGF uygulanmıştır. Bu hastaların 52'sinin yarası ortalama 46 günde tamamen kapanmış, kalan 16 hastaya başka tedaviler gerekmiştir. Yarası kapanan hastaların 6 aylık takibinde nüks görülmemiştir. Yazarlar yara örtüsü ile kombine edilen EGF uygulamasının diyabetik ayak tedavisinde yararlı olabileceğini ileri sürmüştür<sup>50</sup>.

Tsang ve arkadaşları 61 diyabetik ayak hastasında ileriye dönük, çift-kör, randomize kontrollü bir çalışma yürütmüşlerdir. İlk grup yalnızca %5'lik actovegin kremle, ikinci grup bu kreme eklenmiş %0,02 EGF ile ve üçüncü grup da %0,04'lük EGF içeren krem ile tedavi edilmişlerdir. Çalışma 12 hafta sürmüş ve kriter olarak tam kapanma alınmıştır. İlk grupta bulunan 19 hastadan bu süre sonunda 8 hastanın yarası kapanmış, 9'unun kapanmamış ve ikisi parmak amputasyonuna gitmiştir. İkinci grupta bulunan 21 hastadan 12'sinin yarası kapanmış, 7'sinin kapanmamış ve ikisi parmak amputasyonuna gitmiştir. Üçüncü grupta bulunan 21 hastadan 20'sinin yarası kapanmıştır. Tam kapanma oranları ilk grupta %42, ikinci grupta %57 ve üçüncü grupta ise %95'tir. Bu çalışma topikal olarak uygulanan EGF'in doza bağımlı bir biçimde diyabetik yara iyileşmesinde pozitif etkisini ortaya koymaktadır<sup>51</sup>.

Vietnam'dan Tuyet ve arkadaşları, 28 diyabetik ayak yarasında %0,005 EGF içeren Easyef adlı Güney Kore ürünü spreyi kullanmışlardır. Hasta kabulünde periferik arteriyel hastalığı bulunanlar çalışma dışı tutulmuştur. Öncelikle debride edilen ve infekte görünümü ortadan kalkan hastalara günde iki kez Easyef sprey uygulanmış, 8 haftalık takip süresinin sonunda 28 hastanın tamamında granülasyon cevabı alınmış, ancak 23 hastanın 13'ünde tam kapanma sağlanmıştır. Kapanma oranları 2. hafta sonunda %43, 4. hafta sonunda %60, 6. hafta sonunda %69 ve 8. hafta sonunda %85 olarak gerçekleşmiştir. Yazarlar topikal EGF spreyinin orta ve şiddetli diyabetik ayak yaralarında etkin ve güvenli bir tedavi olduğunu vurgulamışlardır<sup>52</sup>.

EGF'in topikal yolla uygulanmasına yönelik diğer bir klinik çalışma da Hindistan'dandır. Diyabetik ayak yaralarında topikal EGF'in etkinliğini araştıran bu çalışma randomize, çift-kör, çok merkezli, paralel bir Faz III çalışmasıdır. 150 mg/g EGF içeren jel uygulanan yaraların 10 haftanın sonunda %69'u tamamen kapanmıştır. Oysa plasebo uygulanan kontrol grubu hastalarda bu süre sonunda kapanma oranı %21'dir. Çalışma, EGF uygulanan grupta yara kapanmasının, uygulanmayan gruba göre 9 hafta kadar kısa olduğunu da göstermiştir<sup>53</sup>. Bu



ilaçla yapılan bir pazar sonrası çalışmasında yara iyileşme oranının daha da iyi (10. haftada %90'ın üzerindedir) olduğu; ortalama iyileşme süresinin de Faz III çalışmasına göre daha kısa olduğu (9 haftaya karşılık 4,8 hafta) ortaya konulmuştur<sup>54</sup>.

## INTRALEZYONEL EGF

Yukarıda ayrıntılı biçimde ele alındığı gibi diyabetik ayak, venöz ülser, bası yarası, arteriyel yetmezlik yaraları gibi kronik yara ortamlarında topikal EGF uygulamasını kısıtlayan faktörler bulunmaktadır. Bunların başında EGF'in kısa biyoyararlanım süresi ve kronik yara ortamında bulunan proteinazlar tarafından kolayca parçalanarak etkisiz hale getirilmesi sayılabilir. Oysa örneğin diyabetik ayak yaralarının tedavisi için EGF adeta bir orkestra şefi görevi üstlenmektedir. Bununla birlikte diyabetik yaralarda EGF ile ilgili sorunlar yalnızca proteinazlar tarafından kolayca yıkılması değildir. Diyabetik ayak yaralarındaki fibroblastların EGF'e verdikleri yanıtın azaldığı bilinmektedir<sup>55,56</sup>. Galkowska ve arkadaşlarının diyabetik ayak lezyonlarında yaptıkları immünohistokimyasal araştırmada EGF'in keratinositlerde aşırı miktarda rastlandığı ancak endotel hücrelerinde yeterli oranda rastlanmadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca EGF reseptörü de hem keratinositlerde hem de endotel hücrelerinde belirgin biçimde düşüktür<sup>57</sup>.

EGF'in yeterli etkisinin sağlanabilmesi için istenen bölgeye yeterli miktarda ulaştırılabilmesi gerekmektedir. Topikal uygulamanın en önemli sınırlaması budur. Nekrotik doku, sepsis, inflamasyon ve yarada bulunan proteinazlar topikal EGF'in diffüzyonunu engellerler<sup>21</sup>. Bu nedenle EGF'in intralezyonel olarak uygulanması bu soruna karşı bir çözüm oluşturabilir.

Küba'da intralezyonel olarak uygulanan EGF'in ruhsatlanmasından sonra bu uygulamanın etkinliği ve güvenilirliği bir dizi klinik çalışma ile ortaya konuldu. 2006 yılında Acosta ve arkadaşları nöropatik veya iskemik lezyonları bulunan, Wagner 3 veya 4 düzeyinde ve yüksek amputasyon riski bulunan 29 hastaya haftada 3 kez olmak üzere 8 hafta 25 µg EGF'i intralezyonel olarak uyguladılar. Hastaların %86'sında 8. uygulama sonunda granülasyon dokusu gelişimi saptandı. 24. uygulama sonunda 17 hastada (%58,6) amputasyon engellendi. Ortalama 66 günde %77 oranında reepitelizasyon sağlandı. Bir yıllık kontrolde nüks yalnızca bir hastada görüldü. Yazarlar intralezyonel EGF uygulamasının ilk sonucu olarak diyabetik ayak amputasyonlarının azaltılabileceğini öne sürdüler<sup>58</sup>.

Bir yıl sonra aynı gruptan Fernandez-Montequin ve arkadaşları, Citoprot-P adını verdikleri intralezyonel EGF ürününün 25 ve 75 mikrogramlık dozlarını karşılaştırdılar. Tip 1 veya tip 2 diyabeti bulunan, tümünün yaraları Wagner 3 ve 4 düzeyinde olan ve yüksek amputasyon riski taşıyan 41 hasta üzerinde çift kör yapılan bu araştırmada iki gruba ayrılan hastalara normal yara bakımına ek olarak haftada üç kez olmak üzere toplam 5-8 hafta boyunca ya 25 µg ya da 75 µg EGF intralezyonel olarak uygulandı. Yaraların toplam alanının %98'inden fazlasında granülasyon dokusu gelişimi açısından bakıldığında 5-8 hafta sonunda 75 µg grubunda hastaların %83'ü, 25 µg grubunda ise %61'i bu düzeye ulaşmıştı. Yaraların tam olarak kapanması açısından bakıldığında; yüksek doz grubunda 13 hasta (%56,5), düşük doz grubunda ise 9 hasta (%50) tam olarak iyileşmişti. Amputasyonun önlenmesi açısından değerlendirme

yapıldığında 75 µgr grubunda %65, 25 µgr grubunda %66,7 hastanın amputasyonunun önlendiği görülmüyordu. Yan etkiler açısından da iki grup arasında fark saptanmadı. Böylece bu çalışmada iki doz arasında tedavi etkinliği ve güvenilirlik açısından belirgin bir fark saptanmadı<sup>59</sup>.

Fernandez-Montequin ve arkadaşları granülasyon gelişimi açısından etkisini gördükleri intralezyonel EGF uygulamasını bu kez tam iyileşme kriteri açısından ele aldılar. Heberprot-P adını alan 75 µgr intralezyonel EGF'yi 20 hastanın diyabetik ayak lezyonuna uyguladılar. Hastaların en az 4 hafta takip edilen tam kat yaraları ortalama 264 gündür açıktı ve ortalama 16,3±21,3 cm<sup>2</sup> boyutlarındaydı. Intralezyonel EGF haftada 3 kez olmak şartıyla yaralar tam kapanana kadar uygulandı. 20 hastanın tamamında yaklaşık 24 günde tam granülasyon dokusu gelişimi sağlandı. Ortalama 44 günde de hastaların 17'sinin (%85) yaraları tam olarak kapandı. Hiçbir hasta amputasyona gitmedi, yalnızca bir hastada nüks görüldü. En sık görülen yan etkiler titreme, ateş, injeksiyon yerinde ağrı ve lokal infeksiyon oldu. Yazarlar bu çalışmanın sonucu olarak intralezyonel EGF uygulamasının yara kapanana kadar güvenle uygulanabilecek bir tedavi olduğunu vurguladılar<sup>60</sup>.

Fernandez-Montequin ve arkadaşları aynı yıl içinde bir faz III çalışması gerçekleştirdiler. Çok merkezli, çift kör, plasebo kontrollü bu klinik çalışmaya 20 merkezden yollanan 149 hasta dahil edildi. Wagner derecelendirmesine göre 3 veya 4 düzeyinde, iskemik veya nöropatik yaraları bulunan hastalar üç gruba ayrıldı: 75 µgr, 25 µgr veya plasebo. Haftada 3 kez olmak üzere 8 hafta uygun yara bakımına ek olarak bu dozlar uygulandı. Çalışmanın ilk amacı 2. haftanın sonunda granülasyon dokusunun yaranın en az %50'sini kapsamasıydı. Bu; 75 µgr'lık grupta hastaların %83'ünde, 25 µgr'lık grupta %71'inde ve plasebo grubunda da %40'ında sağlandı. Gruplar arasındaki bu fark istatistik olarak ileri düzeyde farklıydı. İkinci hafta sonunda yapılan bu değerlendirmeden sonra yeterli iyileşme görülmeyenlerin bir üst gruba aktarılmasına izin verildi. İkinci değerlendirme kriteri 8 hafta sonunda yaralarda tam granülasyon dokusu ile kapanmasıydı (toplam alanın %75'inden fazlası). 75 µgr'lık grupta hastaların %87'si, 25 µgr'lık grupta %71'i ve kontrol grubunda %58'i bu hedefe ulaştılar. Kontrol grubunun bu hedefe ulaşması 5 hafta, diğer grupların 3 hafta almıştı. Çalışmadan sonra yapılan takipte yaraların tam olarak kapanmasının değerlendirilmesi yine benzer sonuçlar verdi: 75 µgr'lık grupta hastaların %76'sı, 25 µgr'lık grupta %52'si ve kontrol grubundakilerin yine %52'sinin yaraları tam olarak kapandı. Yüksek doz intralezyonel EGF uygulamak özellikle iskemik karakterli yaralarda daha büyük önem taşıyordu<sup>61</sup>.

Velazquez ve arkadaşları Wagner derecelendirmesine göre 10'u Grade 3 ve 22'si Grade 4 olan 32 hastaya haftada üç kez intralezyonel EGF uyguladılar. Hastaların yaklaşık yarısı 70 yaşın üzerindediydi. Grade 3 hastalardan 9'u granülasyon ve tam sikatrizasyonla iyileşti, biri amputasyona gitti. Grade 4 olan 22 hastanın da 20'si iyileşti ve ikisi amputasyona gitti. Tüm hastalardaki iyileşme oranı %91 gibi yüksek bir düzeydeydi. Tedavi ortalama 46,5±8,9 gün sürmüştü<sup>62</sup>.

### **Ülkemizde intralezyonel EGF ile ilgili klinik deneyimler**

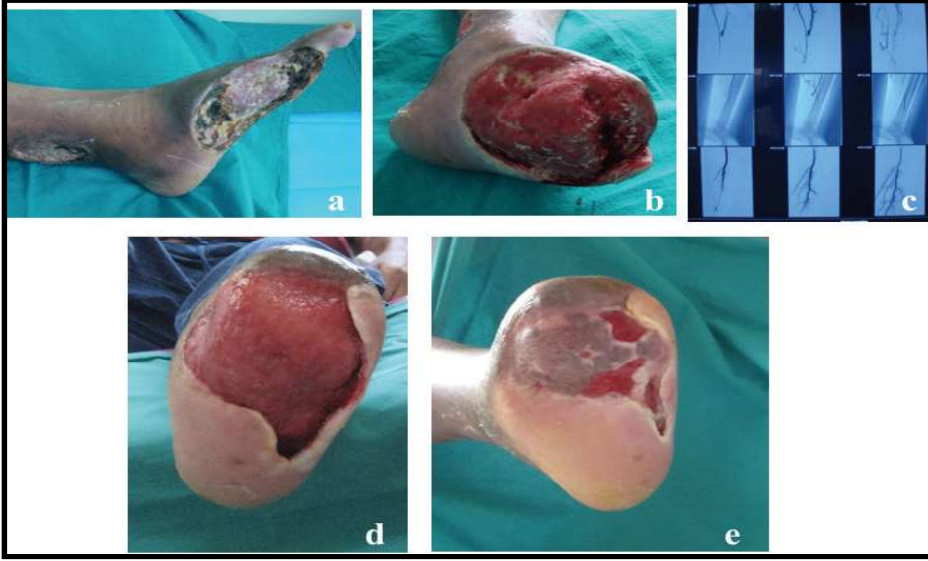
Intralezyonel EGF uygulaması Sağlık Bakanlığında izin alınarak eş zamanlı olarak iki merkezde başlamıştır. Bu alandaki ilk yayın Adnan Menderes Üniversitesinde tedavi edilen üç diyabetik ayak hastası ile ilgili olarak çıkmıştır. Hastaların tümü haftada üç kez uygulanan 75 µgr intralezyonel EGF'den fayda görmüşlerdir<sup>63,64</sup>.

İstanbul Tıp Fakültesi, Kronik Yara Konseyi'nde (ITF-KYK) takip edilen üç hastaya da intralezyonel EGF uygulanmıştır. Hastaların ortak özellikleri iskemik olmaları ve yüksek seviyeden amputasyon kararı alınmış olmasıdır. İFT-KYK'da iskemik diyabetik ayak olgularında tedavi algoritması; diğer yara bakım ve tedavilerine ek olarak mutlaka periferik dolaşımın değerlendirilmesi ve mümkünse revaskülarizasyonu, hiperbarik oksijen tedavisi ve negatif basınçlı yara tedavisini kapsamaktadır. Söz konusu üç hasta, bu tedaviler uygulanmış ancak yeterli fayda sağlanamamış ve amputasyon kararı verilmiş hastalardır. Haftada üç kez uygulanan 75 µgr intralezyonel EGF ile hastaların yaraları kapatılmış ve amputasyonları engellenmiştir<sup>65</sup> (Resim1, 2). Her iki merkezin hastaları, diyabetik ayak konusunda önemli toplantılardan olan DFCon toplantısında ortak bir bildiri ile sunulmuşlardır<sup>66</sup>.

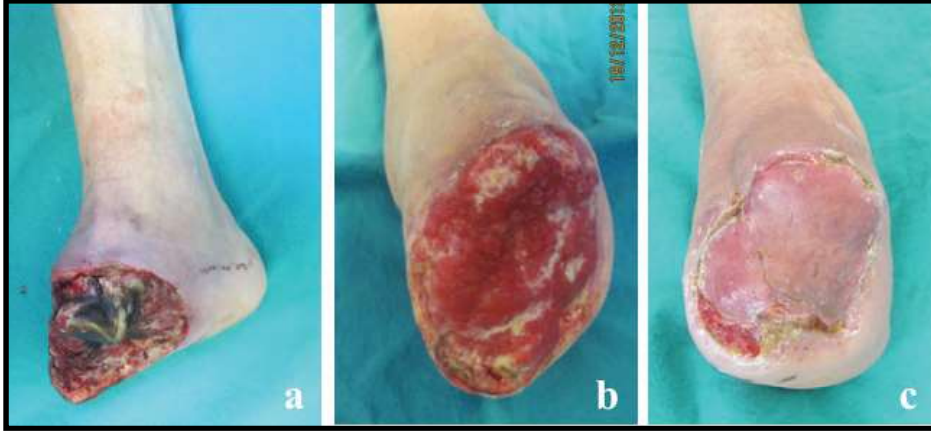
Halen merkezimizde seçilmiş hastalarda intralezyonel EGF tedavisi uygulanmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır (Resim 3, 4).



**Resim 1.** 52 yaşında, 17 yıllık Tip II DM hastası. Daha önce kardiyak bypass, bilateral femoropopliteal bypass, farklı zamanlarda parmak amputasyonları öyküsü mevcut. a) başvurduğunda b) iki kez negatif basınçlı yara kapama ile daha da ağırlaşmış hali c) balon ajioplasti ve buna rağmen ilerleyen, topuğu da tutan nekroz e) 12 doz intralezyonel EGF ile ayak önünde düzelme f) topuğa uygulama öncesi g) topuğa 6 doz uygulama h) son hali.



**Resim 2.** 68 yaşında, 16 yıllık Tip II DM, kronik böbrek yetmezliği hastası. a) başvurduğunda b) negatif basınç, HBO ve popliteodistal bypass'a rağmen ilerleyen nekroz ve amputasyon c) sol alt ekstremitte başarısız PTA d) 25 doz 75µgr intralezyonel EGF uygulaması sonrası e) greftleme ile son hali.



**Resim 3.** 58 yaşında, erkek, 15 yıllık Tip II DM hastası. Periferik damar hastalığı, kardiyak problemler, 5 ay önce bir parmakta başlayan ve sırayla değişik zamanlarda parmak amputasyonları öyküsü bulunuyor. a) başvurduğunda b) 9 doz 75µgr intralezyonel EGF uygulaması sonrası c) greftleme ile son hali.



**Resim 4.** 79 yaşında, erkek, Tip II DM hastası, koroner bypass ve iki kez koroner stent, 4. Parmak amputasyonu öyküsü mevcut. a) başvurduğundaki hali b) iki kez negatif basınçlı yara kapama ile kötüleşme c) sol alt ekstremiteye başarısız PTA girişimi d) yara bakımı ve HBO'ya rağmen kötüleşme e) parmak amputasyonları f) 8 doz 75µgr intralezyonel EGF uygulaması sonrası g) son hali.

Merkezimizde tedavi edilen hastalarımızın Küba ve diğer ülkelerde intralezyonel EGF ile tedavi edilen hastalardan önemli farkları bulunmaktadır. Hastalarımız "üst seviyeden amputasyon kararı verilmiş olmak" gibi oldukça dar bir yaklaşımla seçilmiştir. Bu kriterin uygulanmasında intralezyonel EGF'in ülkemizde yeni bir tedavi olması ve maliyeti gibi unsurların yanında; diğer ülkelerde rutin uygulamada bulunmayan negatif basınçlı yara kapama, hiperbarik oksijen tedavisi gibi tedavilerin ülkemizde rutin kullanımda, kolay bulunabilir ve maliyet açısından daha avantajlı olması gibi faktörler de yer almaktadır. Bununla birlikte ilk uygulamalar için konulan bu dar sınırlar ve sıkı kriterlere rağmen intralezyonel EGF uygulamasının aslında daha geniş bir hasta grubunda uygulanabileceği ve diğer tedavilerle birlikte uygulanmasının bir çelişki yaratmadığı söylenebilir.

## KAYNAKLAR

1. Topalan M, Önel D. Yara iyileşmesi. İç: Topalan M, Aktaş Ş. (eds): Güncel Yönleriyle Kronik Yara. Ankara: Aygül Offset; 2010: 1-26.
2. Behm B, Babilas P, Landthaler S, Schreml S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26(7): 812-820.
3. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg* 2008; 16: 585-601.
4. Gabriel A. Wound healing and growth factors. <http://emedicine.medscape.com/article/1298196-overview>. (18.08.2013).
5. Doxey DL, Ng MC, Dill RE, Lacopino AM. Platelet-derived growth factor level in wounds of diabetic rats. *Life Sci* 1995; 57(11):1111-1123.
6. Werner S, Breeden M, Hübner G, et al. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol* 1994; 103(4):469-473.
7. Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science* 1983; 219(4585): 632-637.
8. Driver VR, Hanft J, Fylling CP, et al. A prospective, randomized, controlled trial of ologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52(6): 68-74.
9. Fryberg RG, Driver VR, Carman D, et al. Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: a prospective case series. *Ostomy Wound Manage* 2010; 56(6): 36-44.
10. De Leon JM, Driver VR, Fylling CP, et al. The clinical relevance of treating chronic wounds with an enhanced near-physiological concentration of platelet-rich plasma gel. *Adv Skin Wound Care* 2011; 24(8): 357-368.
11. Zaulyanov I, Kirsner RS. A review of a bi-layered living cell treatment (apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging* 2007; 2(1): 93-98.
12. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *J Vasc Surg*. 1995; 21(1):71-81.
13. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 1998; 21(5):822-827.

14. d'Hemecourt PA, Smiell JM, Karim MR. Sodium carboxymethylcellulose aqueous-based gel vs. becaplermin gel in patients with nonhealing lower extremity diabetic ulcers. *Wounds* 1998;10: 69-75.
15. Smiell JM, Wieman TJ, Steed DL, et al. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen* 1999;7(5): 335-46.
16. Robson M, Payne WG, Garner WL, et al. Integrating the results of phase IV (postmarketing) clinical trial with four previous trials reinforces the position that Regranex (becaplermin) gel 0.01% is an effective adjunct to the treatment of diabetic foot ulcers. *J Appl Res* 2005;5: 35-45.
17. Rees RS, Robson MC, Smiell JM, Perry BH. Becaplermin gel in the treatment of pressure ulcers: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Wound Repair Regen* 1999;7(3): 141-147.
18. Gough A, Clapperton M, Rolando N, et al. Randomised placebo-controlled trial of granulocyte-colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet*. 1997;350(9081): 855-859.
19. Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT, et al. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg* 1992; 216(4): 401-408.
20. Cohen S. Isolation of a Mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-1562.
21. Tiaka EK, Papanas N, Manolakis AC, Georgiadis GS. Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2012; 24(1): 37-44.
22. Savage CR, Cohen S. Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 1973; 15(3):361-366.
23. Franklin JD, Lynch JB. Effects of topical application of epidermal growth factor on wound healing. Experimental study on rabbit ears. *Plast Reconst Surg* 1979; 64(6): 766-770.
24. Brown GL, Nanney LB, Griffen J, et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med* 1989; 321(2):76-79.
25. Reim M, Kehrer T, Lund M. Clinical application of epidermal growth factor in patients with most severe eye burns. *Ophthalmologica* 1988; 197(4): 179-184.
26. Reim M, Busse s; Leber M, Schulz C. Effects of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns. *Ophthalmic Res* 1988; 20(5): 327-331.
27. Barrow RE, Wang CZ, Evans MJ, Herndon DN. Growth factor accelerate epithelial repair in sheep trachea. *Lung* 1993; 171(6):335-344.
28. Koltuksuz U, Mutuş HM, Kutlu R, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. *J Pediatr Surg* 2001; 36(10): 1504-1509.

29. Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324(7330):160-163.
30. Higley HR, Ksander GA, Gerhardt CO, Falanga V. Extravasation of macromolecules and possible trapping of transforming growth factor-beta in venous ulceration. *Br J Dermatol* 1995;132(1): 79-85.
31. Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen* 1993;1(3):181-186.
32. Barrick B, Campbell EJ, Owen CA. Review Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen* 1999;7(6): 410-422.
33. Falanga V. Growth factors and chronic wounds: the need to understand the microenvironment. *J Dermatol* 1992; 19(11): 667-672.
34. Hardwicke J, Schmaljohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing –past, present and future perspectives. *Surgeon* 2008;6(3): 172-177.
35. Prats PA, Doconge J, Valenzuela C, et al. Disposition and receptor-site binding of (125)I-EGF after topical administration to skin wounds. *Biopharm Drug Dispos* 2002; 23(2): 67-76.
36. Falanga V, Eaglstein WH, Bucalo B, et al. Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *J Dermatol Surg Oncol* 1992; 18(7): 604-606.
37. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care* 2012; 25(8): 349-370.
38. Ulubayram K, Çakar AN, Korkusuz P. EGF containing gelatin-based wound dressing. *Biomaterials* 2001; 22: 1345-1356.
39. Doğan S, Demirer S, Kepenekçi I, et al. Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Int Wound J* 2009; 6(2): 107-115.
40. Zhou W, Zhao M, Zhao Y, Mou Y. A fibrin gel loaded with chitosan nanoparticles for local delivery of rhEGF: preparation and in vitro release studies. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22(5): 1221-1230.
41. Değim Z, Çelebi N, Alemdaroğlu C, Deveci M, et al. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int Wound J* 2011; 8(4): 343-354.
42. Pulat M, Kahraman AS, Tan N, Gümüşderelioğlu M. Sequential antibiotic and growth factor releasing chitosan-PAAm semi-IPN hydrogel as a novel wound dressing. *J Biomater Sci Polym Ed* 2013; 24(7): 807-819.
43. Lao G, Yan L, Yang C, et al. Controlled release of epidermal growth factor from hydrogels accelerates wound healing in diabetic rats. *J Am Podiatr Med Assoc* 2012; 102(2): 89-98.



44. Tıǧlı RS, Kazaroǧlu NM, Maviş B, Gümüşderelioǧlu M. Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds. *J Biomater Sci* 2011; 22: 207-223.
45. Dong X, Xu J, Wang W. repair effect of diabetic ulcers with recombinant human epidermal growth factor loaded by sustained-release microspheres. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(11): 1039:1044.
46. Kim HS, Yoo HS. In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes. *Acta Biomater* 2013; 9(7): 7371-7380.
47. Choi JS, Leong KW, Yoo HS. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials* 2008; 29(5): 587-596.
48. Hardwicke JT, Hart J, Bell A. The effect of dextrin-rhEGF on the healing of full-thickness, excisional wounds in the (db/db) diabetic mouse. *J Control Release* 2011; 152(3): 411-417.
49. Choi JK, Jang JH, Jang WH, et al. The effect of epidermal growth factor (EGF) conjugated with low-molecular-weight protamine (LMWP) on wound healing of the skin. *Biomaterials* 2012; 33(33): 8579-8590.
50. Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Ann Plast Surg* 2006; 56(4): 394-400.
51. Tsang MW, Wong WK, Hung CS, et al. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2003; 26(6): 1856-1861.
52. Tuyet HL, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H. The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results. *Int Wound J* 2009; 6(2): 159-166.
53. Viswanathan V, Pendsey S. A phase III study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human epidermal growth factor (REGEN-D™ 150) in healing diabetic foot ulcer. *Wounds* 2006; 18(7): 186-196.
54. Mohan VK. Recombinant human epidermal growth factor (REGEN-D™ 150): effect on healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 78(3): 405-411.
55. Loot MA, Kenter SB, Au FL, et al. Fibroblast derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to control. *Eur J Cell Biol* 2002; 81(3): 153-160.
56. Hehenberger K, Hansson A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. *Cell Biochem Funct* 1997; 15(3): 197-201.
57. Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2006; 14(5): 558-565.

58. Acosta JB, Savigne W, Valdez C, et al. Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *Int Wound J* 2006; 3(3): 232-239.
59. Fernandez-Montequin JI, Infante-Cristia E, Valenzuela-Silva C, et al. Intralesional injection of Citoprot-P (recombinant human epidermal growth factor) in advanced diabetic foot ulcers with risk of amputation. *Int Wound J* 2007; 4(4): 333-343.
60. Fernandez-Montequin JI, Betancourt BY, Leyva-Gonzalez G, et al. Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot-P) in chronic diabetic foot ulcer: treatment up to complete wound closure. *Int Wound J* 2009; 6(1): 67-72.
61. Fernandez-Montequin JI, Valenzuela-Silva CM, Diaz OG, et al. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J* 2009; 6(6): 432-443.
62. Velazquez W, Valles A, Curbelo W. Impact of epidermal growth factor on the treatment of diabetic foot ulcer. *Biotechnologia Aplicada* 2010;27: 136-141.
63. Ertuğrul BM. Yara onarımında epidermal büyüme faktörü. 2. Ulusal Diyabetik Ayak İnfeksiyonları Simpozyumu. 24-26 Mayıs 2012, Mariott Otel Asya, İstanbul.
64. Ertuğrul BM. Epidermal growth factor; the first three cases in Turkey. II International Congress addressed to the Integral Care of Diabetic Foot Ulcer Patient. 12-14 Nov 2013, Memories Varadero Hotel, Cuba.
65. Aktaş Ş, Demir L, Yanar F, Baktıroğlu S, Güven E, Kılıçoğlu Ö: İskemik karakterli diyabetik ayak olgularında yüksek seviyeden amputasyonun önlenmesinde intralezyonel epidermal büyüme faktörü (Heberprot-p) kullanımı. 7. Ulusal Yara Bakımı Kongresi. 29 Kasım-2Aralık 2012. Concorde de Luxe Otel, Antalya.
66. Ertuğrul BM, Baktıroğlu S, Sakarya S, ve ark. Intralesional epidermal growth factor; the first experiences in Turkey. Diabetic Foot Global Conference (DFCon). 21-23 March 2013, Los Angeles, USA.