

İnsan Bağırsak Kök Hücrelerinden Elde Edilmiş Epitelyal Hücrelerdeki LPS'yle Uyarılmış Proinflamatuvar Gen İfadesi Profiline Ondamed Frekanslarıyla Tersine Döndürülmesi: Ondamed Cihazının Ağrı Yönetimindeki Güvenliği ve Verimliliğini Destekleyen in-Vitro Pilot Çalışma Özeti

Arkaplan:

Ağrı “gerçek bir doku hasarıyla ilişkilendirilmiş duyuşsal ve duygusal bir deneyim olarak veya böyle bir hasar üzerinden tarif edilen bir deneyim” olarak tanımlanır. Ağrı ya nosiseptif ya da nöropatik kaynaklı olabilir. Ağrı süreye bağılı olarak akut (<6 ay) veya kronik (>6 ay) olarak adlandırılır; ağrı mekanizmaları çok fazla ve komplekstirler. Ağrı genelde kaynağı veya doğasından bağımsız olarak doku hasarının sonucu olarak görülür. Buna genel olarak zarar görmüş dokunun hasarlı kısmında bulunan aktifleşmiş hücrelerde içsel olarak üretilmiş faktörlerin birikmesi eşlik eder. Bu içsel faktörler genellikle geniş bir sinyal molekülleri dizinini yansıtan inflamatuvar mediatörler olarak anılırlar. Bu moleküller ağrının patofizyolojik süreciyle ilişkilidirler. Bu yüzden inflamatuvar ağrıların farmakolojik yönetiminde ana strateji dokudaki proinflamatuvar sitokinlerin sentezi ve birikmesini engellemektir. Hatta farmakolojik ağrı yönetiminde kullanılan NSAID ve OPIOID ajanlarının birçoğu bu sitokinlerin engellenmesi veya ağrı reseptörlerinin bloklanması prensibiyle çalışır.

Bu nedenle Ondamed, farmakolojik olmayan bir cihaz geliştirilirken bir gen ifadesi analizi çalışması da içeren bütünsel bir yaklaşım sergiledi. Ondamed, bunu pulsatil EM Frekansların genlerin düzenlenmesindeki yararlı etkilerini göstermek için yaptı. Bu genler sadece yukarıda bahsedilen, ağrıyla bağılantılı mekanik inflamatuvar yollarla ilişkili olan genler değil; aynı zamanda bütün insan genomunda bilinen genlerdir. Bu da insan vücudundaki total homeostazın korunması konusunda yeni kavrayışlar sağlayabilir.

Deney Planı

Bir insan bağırsak primer epitelyal hücre (İBPEH) kültür sistemi (Panja, 2000) Ondamed cihazının ürettiğı pulsatil EM frekansların, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) ile karşılaştırılmış hücrelerdeki gen ifadelerini değıştirip değıştirmediğini test etmek için kullanılmıştır. Ondamed ya da LPS uygulanmamış kontrol hücreleri temel kontrol işlevi görmüşlerdir.

Kısaca, İBPEH'ler 6 adet doku kültürü yuvasına aşağıdaki 3 senaryoyu temsil etmek için konmuştur:(750K hücre/yuva/2 ml İBPEH ortamı)

1. Normal sağlıklı durum (tedavi uygulanmamış kontrol) – Hücreler sadece ortamda kültürlenmiştir.
2. Simüle edilmiş inflamatuvar durum – Kültür ortamına LPS eklenerek (1g/ml).
3. Simüle edilmiş inflamatuvar durum + pulsatil EM tedavisi durumu – 1g/ml LPS eklenmesini takip eden 30 saniye boyunca 100 hertzlik Ondamed tedavisi. Ondamed tedavisi, Ondamed cihazına bağlı elektro-manyetik alan elektrodunun üzerine 6 cm yüksekliğinde plastik bir köprü oluşturularak gerçekleştirilmiştir. LPS ile karşılaştırılmış hücre kültürü Ondamed cihazı çalıştırılmadan önce platformun üzerine yerleştirilmiştir.

LPS ve LPS+Ondamed uygulanan (2. ve 3. durumlar) veya herhangi bir şey uygulanmamış (1. durum) hücreler nemlendirilmiş bir CO2 inkübatöründe üremeleri için 18 saat bırakılmışlardır. Ardından hücresiz kültür süpernatantları protein analizleri için toplanmış ve 20°C de muhafaza edilmiştir. Levhaya yapışık hücrelerse daha sonra RNA'da çözülmüştür, böylece RNA ekstraksiyonun ve ardından RNAseq methoduyla yapılacak gen ifadesi analizinin endüstri kalite standartlarında kontrol edilmiş cihazlarla, standart operasyon prosedürlerle ve bilimsel protokollerle yapılması sağlanmıştır (New Jersey'deki bir CRO şirketi aracılığıyla).

LPS uygulanmasının (simüle edilmiş inflamatuvar durum) İBPEH'lerde yarattığı gen ifadesi profili değişimi LPS uygulanmış (2. durum) ve uygulanmamış kontrol (1. durum) hücrelerindeki 66,446 genin (bütün insan genomu) ifade seviyeleri karşılaştırılarak ve kıyaslanarak belirlenmiştir. Daha sonra Ondamed cihazı ile yapılan pulsatil EM frekans tedavisi (3. Durum) üç durumdaki sonuçların da karşılaştırılması ve kıyaslanmasıyla incelenmiştir.

İnflamatuvar Ağrı (Tablo-1) ve Toksikite (Tablo-2) ile ilişkili gen ifadeleri aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 1- Ondamed'in Pulsatil Elektro-Manyetik Frekansları doku kültürünün LPS ile uyarılmış AĞRI ile bağlantılı değişmiş gen ifadelerini tersine çeviriyor.

Gen İsmi	Genin ürettiği / Gen ifadesi	Kontrol	LPS uygulanmış	LPS + Ondamed uygulanmış
ACKR1	Atypical chemokine receptor 1	0.077015961	0.095365154	0.058116865
ACVR1	Activin receptor type-1	3.992309921	4.880035716	4.662633078
ADAM8	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8	0.132156743	0.163864468	0.155766573
ADIPOQ	Adiponectin	0.070321098	0.074013944	0.006633109
ADORA2A	Adenosine receptor A2a	0.048862072	0.050293576	0.048650178
ADRA2A	Alpha-2A adrenergic receptor	0.123091324	0.179655728	0.068087516
AGTR1	Type-1 angiotensin II receptor	0.034362437	0.049083716	0.023460632
AK7	Adenylate kinase 7	0.025604713	0.038151782	0.030592411
AOAH	cDNA FLJ51934, highly similar to Acyloxyacyl hydrolase (EC 3.1.1.77)	0.072962489	0.082967684	0.043587649
APCS	Serum amyloid P-component	0.046094013	0.075911075	0.011014589
APOA1	Truncated apolipoprotein A-I	0.119896225	0.126934771	0.121763812
APOC3	Apolipoprotein C-III variant 1	0.029572556	0.046383144	0.02355545
BDKRB1	B1 bradykinin receptor	0.052618706	0.054615396	0.022188926
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	1.569352026	1.834935739	1.54649608
BMPR1B	Bone morphogenetic protein rec. type 1B	0.078441612	0.087501155	0.027470163

BRD4	Bromodomain-containing protein 4	0.922628868	1.00228517	0.933668851
C1QTNF3	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	0.109810995	0.129174982	0.082714146
C3AR1	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor2	0.063676354	0.074904994	0.047550163
C5AR2	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 2	0.205822441	0.218495841	0.112461517
CAMK4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV	0.201294643	0.218020786	0.136384532
CARD8	cDNA FLJ60955, highly similar to Caspase	0.78584106	0.874699199	0.748768845
CASP12	Inactive caspase-12	0	0.016867778	0.005710812
CCL11	Eotaxin	0	0.00930672	0
CCL16	C-C motif chemokine 16	0.073422688	0.120917985	0.035090057
CCL20	C-C motif chemokine 20	0.044494623	0.059818024	0.022783715
CCL22	C-C motif chemokine 22	0.116580556	0.119995997	0.080091747
CCL23	C-C motif chemokine 23	0.046268896	0.054427917	0.027640948
CCL25	C-C motif chemokine 25	0.008631558	0.030460922	0
CCL4	C-C motif chemokine 4	0.226635697	0.244383757	0.180522298
CCL7	C-C motif chemokine 7	0	0.023272192	0
CCL8	C-C motif chemokine 8	0.027078862	0.031853928	0
CCR7	C-C chemokine receptor type 7	0.102112575	0.108107125	0.077269014
	Monocyte differentiation antigen CD14,			
CD180	CD180 antigen	0.072293109	0.088584604	0.044987252
CD44	CD44 antigen	1.943804291	2.344486464	2.299123879
	Chymotrypsin-like elastase family member			
CHIA	Acidic mammalian chitinase	0.035016324	0.039023125	0.030827534
CHST2	Carbohydrate sulfotransferase 2	0.057755336	0.065748259	0.022259952
CLEC7A	C-type lectin domain family 7 member A	0.032598038	0.033553057	0.014605503
CMA1	Chymase	0.009110578	0.01071713	0
CNR1	Cannabinoid receptor 1	0.042971773	0.053708719	0.01444008
CRHBP	Corticotropin-releasing factor-binding protein	0.0456829	0.046573443	0.032749051
CSF1R	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	0.21213089	0.239790321	0.209890904
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10	0.072590232	0.119547033	0.069384421
CXCL9	C-X-C motif chemokine 9	0.024924412	0.043979346	0.003722449
CXCR6	C-X-C chemokine receptor type 6	0.129102372	0.247784935	0.232729596
DEFB1	Beta-defensin 1	0.142872155	0.336132243	0.170703094
EIF2AK2	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	2.175236196	3.0313561	3.022955261

F3	Tissue factor	1.989401577	2.476432377	1.724160623
FABP4	Fatty acid-binding protein, adipocyte	0.006115051	0.035966872	0
FFAR4	Free fatty acid receptor 4	0.674938968	0.675234619	0.612975469
FOXP3	Forkhead box protein P3	0.045150192	0.068286783	0.019266169
FPR2	N-formyl peptide receptor 2	0.096902074	0.097705467	0.052375861
GJA1	Gap junction alpha-1 protein	0.047784785	0.056211117	0.033584162
GPR68	Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1	0.078126399	0.101093464	0.059118575
HDAC4	Histone deacetylase 4	0.139850229	0.156248186	0.147255042
IKBKB	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta	0.410197552	0.500185065	0.470179574
IL10	Interleukin-10	0.038842013	0.045691384	0.020625905
IL15	Interleukin-15	0.627755891	0.64646655	0.622870831
IL17RE	Interleukin-17 receptor E	0.124142336	0.137443295	0.135237299
IL1A	Interleukin-1 alpha	0.93243588	1.007031784	0.76832466
IL1R1	Interleukin-1 receptor type 1	0.134985241	0.14602865	0.129599871
IL1RAP	Interleukin-1 receptor accessory protein	0.38480485	0.448316888	0.374164404
IL1RL1	Interleukin-1 receptor-like 1	0.176793724	0.207969394	0.088753131
IL2	Interleukin-2	0	0.00897404	0
IL20RB	Interleukin-20 receptor subunit beta	1.398029743	1.421222306	0.775377215
IL21	Interleukin-21	0	0.013966552	0
IL27	Interleukin-27 subunit alpha	0.033608706	0.079070478	0.040155551
IL2RA	Interleukin-2 receptor subunit alpha	0.083323347	0.085369229	0.035325758
IL33	Interleukin-33	0.002624227	0.009260944	0.006270833
IL34	Interleukin-34	0.09939628	0.130414945	0.095920155
IL36A	Interleukin-36 alpha	0.028839903	0.090468025	0.011485935
IL37	Interleukin-37	0.091572707	0.17953428	0.085097222
IRGM	Immunity-related GTPase family M protein	0.076676149	0.080175255	0.071254061
ISL1	Insulin gene enhancer protein ISL-1	0.364331431	0.390249301	0.336208687
ITGA2	Integrin alpha-2	2.600914425	3.32615815	2.24621317
ITGAL	cDNA FLJ56671, highly similar to Integrin	0.056717287	0.079131565	0.044126433
ITGB6	Integrin beta	2.014301851	2.061467002	2.050491364
JAM3	Junctional adhesion molecule C	0.07047285	0.095795531	0.091685192
KCNJ10	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 10	0.085479009	0.106243953	0.092495083
KDM6B	Lysine-specific demethylase 6B	1.418455933	1.682421068	1.544400845
LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase	2.86063585	2.881425052	2.861413514
LTB4R	Leukotriene B4 receptor 1	0.158687286	0.213658527	0.15990273
LY86	Lymphocyte antigen 86	0.04084503	0.088087287	0.073202224
MAP2K3	Dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	2.367143853	2.641221517	2.127257013

MEP1B	Meprin A subunit beta	0.006609842	0.02332625	0.015794828
MYLK3	Myosin light chain kinase 3	0.043032697	0.054839471	0.034276866
NAIP	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1	0.140885942	0.209009382	0.139381508
NFATC4	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 4	0.174030714	0.251138036	0.205513414
NFKBID	NF-kappa-B inhibitor delta	1.182526198	1.227768213	1.071618297
NFKBIZ	NF-kappa-B inhibitor zeta	7.699149723	9.245672718	8.314104021
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4	0.207290781	0.343598756	0.289886732
NLRP1	NACHT, LRR and PYD domains-containing	0.195286313	0.203065681	0.19828841
NLRP4	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 4	0.188098531	0.200684642	0.120209442
NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1	0.840700682	0.894424763	0.69889354
NPY5R	Neuropeptide Y receptor type 5	0.025939262	0.039667384	0.009297639
OSMR	Oncostatin-M-specific receptor subunit beta	0.123753495	0.141376781	0.085303958
PARP4	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	19.95292474	22.32682406	19.48139934
PDPN	Podoplanin	0.052965217	0.059596147	0.013757094
PLA2G2E	Group IIE secretory phospholipase A2	0.010874664	0.051169176	0.025986012
PLA2G4B	Cytosolic phospholipase A2 beta	0.11520393	0.187467817	0.087175298
PLA2G7	Platelet-activating factor acetylhydrolase	0.00421353	0.00495654	0
PNMA1	Paraneoplastic antigen Ma1	2.429143818	2.531812294	2.327378504
PRKCA	Protein kinase C alpha type	0.886423585	1.173301814	0.902700523
PRKCD	Protein kinase C delta type	0.638486236	0.822044261	0.624704962
PRKD1	Serine/threonine-protein kinase D1	0.018103475	0.027103781	0.00393272
PROK2	Prokineticin-2	0.005295665	0.024917992	0.012654479
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	5.911955672	6.142571128	3.579216878
PXK	PX domain-containing protein kinase-like protein	0.234382117	0.251330108	0.24574837
RASGRP1	RAS guanyl-releasing protein 1	0.294027942	0.611048668	0.426582748
RORA	Nuclear receptor ROR-alpha	0.663791661	0.829757433	0.766160365
RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase	0.131161956	0.157550623	0.122132196
SCGB1A1	Uteroglobin	0.044003151	0.069016844	0
SCN9A	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	0.054362827	0.078483019	0.03050799
SCUBE1	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-	0.079492136	0.086889562	0.034460643
SEMA7A	Semaphorin-7A	0.762728088	0.806339048	0.743245787
SERPINC1	Antithrombin-III	0.0772544	0.102237055	0.040382675
SLC7A2	Low affinity cationic amino acid transporter 2	0.124188525	0.176575731	0.119994234

STAB1	Stabilin-1	0.040312671	0.043627667	0.029862562
TFF2	Trefoil factor 2	0.154276107	0.157283566	0.098308529
THBS1	Thrombospondin-1	5.712202852	6.841202308	4.105196914
TICAM2	TIR domain-containing adapter molecule 2	0.09473428	0.229070393	0.05973819
TLR1	Toll-like receptor 1	0.069648206	0.104073139	0.074219146
TLR10	Toll-like receptor 10	0.03643799	0.054769947	0.033861309
TLR4	Toll-like receptor 4	0.11369155	0.152845521	0.130016583
TNFAIP3	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	0.376888598	0.451301291	0.434150588
TNFAIP6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	0.016219021	0.025438761	0.019378423
TNFAIP8L2	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2	0.057973591	0.093770338	0.060608293
TYRO3	Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3	0.429540858	0.620255184	0.576016191
UACA	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	3.852348	4.061933121	3.728077577
UCN	Urocortin	0.322136273	0.783145845	0.769774329
VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1	0.005505715	0.032382943	0.019734621
ZYX	Zyxin	1.076270057	1.13916443	1.054515666

Bu birincil sonuçlar inflamutuar ağrıyla bağlantılı, bakteriyel LPS uyarılmasına cevap olarak başkalaşan genlerin Ondamed pulsatil EM frekanslarıyla değiştirilebileceğini açıkça ortaya koyuyor. Komisyonunun bu çalışmayı Ondamed cihazının ağrı yönetimindeki verimliliğini doğrulayıcı bir çalışma olarak görmesini umuyoruz.

Tablo 2- Ondamed'in Pulsatil Elektro-Manyetik Frekansları doku kültürünün LPS ile uyarılmış TOKSİSİTE bağlantılı değişmiş gen ifadelerini tersine çeviriyor.

Gen ismi	Gen ifadesi	Kontrol	LPS uygulanmış	LPS + Ondamed
AKR7L	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 4	0.200462331	0.297485535	0.224772435
ANTXR1	Anthrax toxin receptor 1	0.082393682	0.100603538	0.052337131
ANTXR2	Anthrax toxin receptor 2	1.191698468	1.343813361	1.036081598
C3AR1	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	0.063676354	0.074904994	0.047550163
C5AR2	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 2	0.205822441	0.218495841	0.112461517
NCR1	Natural cytotoxicity triggering receptor 1	0.10822962	0.127314748	0.043104109
NCR2	Natural cytotoxicity triggering receptor 2	0.021008887	0.032951438	0
NCR3LG	Natural cytotoxicity triggering receptor 3	1.860339481	3.303642698	3.008522712

Bu birincil sonuçlar Ondamed cihazının ağrı yönetimindeki verimliliğini ve güvenliğini - toksik maddelerle uyarılmış, toksisiteyi gösteren genlerin temel seviyelere geri döndürülmesi ve bakteriyal toksinlerin yol açabileceği potansiyel doku hasarlarında üstelenebileceği terapötik rolden dolayı- destekleyicidir.

Bunun yanı sıra, bu pilot insan genomu regülasyonu çalışmasındaki sonuçlar kullanılarak, Ondamed insan genomundaki her bir gene uyguladığı elektro-manyetik etkinin eylem mekanizmaları gösterilebilir. Böylece, Ondamed'in EM terapisi için ağrının temel mekanizmalarına yöneltmiş hassas tedavi protokolleri de geliştirilebilir.

Yukarıda anlatılan sağlam gen ifadesi analiz verileri aktif proinflamatuvar genlerin, bir in-vitro hücre sisteminde, herhangi bir olumsuz etki yaratmadan, toksik karşılaşma ile başkalaşmış gen ifadelerini tersine döndüğünü göstermektedir.

Yazar: Asit Panja M.D. Ph.D. Altagene Bioscience Inc.

Fords New Jersey

28 Haziran 2017