

## Studio sugli effetti positivi di Emiko San in coltura di cellule biologiche (non animali).

### 1 Sintesi dello studio e conclusioni.

Con i metodi di prova su culture di cellule biologiche (non animali) si sono dimostrati gli effetti positivi di Emiko San, una sostanza nutritiva a base di EM Microorganismi Effettivi e 14 estratti di erbe.

Il calcolo della concentrazione stabilisce in 50 ml la dose massima di somministrazione giornaliera raccomandata.

Presumendo un assorbimento del 100% distribuito in 3,5 lt di sangue, la concentrazione risulta di 15 mg/ml. Lo stesso assorbimento distribuito in 60 lt di liquidi corporei dà una concentrazione pari a 0,8 mg/ml. L'intervallo di concentrazione per il test è stato fissato tra 0 e 20 mg/ml.

La prova ha dato i seguenti risultati:

- **Effetto antiossidante su radicali liberi esogeni. (test cellfree).**

Inquinamento ambientale ed altri effetti esterni possono portare ad un eccesso di radicali liberi corporei. Questi radicali provocano danno ad importanti strutture biomolecolari come gli acidi nucleici (DNA, RNA), proteine, lipidi e carboidrati. Utilizzando perossido di potassio come fonte di radicali liberi nel Testsystem (cellfree) è stata confermata la capacità di Emiko San di inibire i radicali liberi di origine esogena. I risultati sperimentali hanno dimostrato il marcato effetto antiossidante di Emiko San con una inibizione dei radicali esogeni dosedipendente. La EC50, cioè la concentrazione che ha portato ad una inattivazione ovvero detossificazione dei radicali pari al 50% corrispondeva a 15 mg/ml e quindi esattamente nel range di concentrazione calcolato nel flusso sanguigno.

- **Effetto antiossidante sui radicali liberi endogeni (test su cellule).**

Da uno squilibrio metabolico accompagnato da infiammazione cronica organica si sviluppa un eccesso di radicali liberi endogeni. Lo stato infiammatorio determina una migrazione di granulociti neutrofili dal sangue verso i tessuti mantenendo attiva l'infiammazione e la formazione in loco di radicali liberi. In questo test cellulare con neutrofili funzionali Emiko San ha mostrato una inattivazione dosedipendente dei radicali liberi formati dalle cellule nel burst ossidativo. La EC50 cioè la concentrazione che ha inibito la formazione dei radicali liberi al 50% corrispondeva a 3,5 mg/ml. Di conseguenza Emiko San dimostra di avere una altissima capacità di neutralizzazione dei radicali liberi di formazione endogena. Inoltre l'uso di Emiko San inibisce il metabolismo energetico di queste cellule responsabili del processo infiammatorio. Così la migrazione di queste cellule dal sangue verso il tessuto infiammato diminuisce e la formazione di radicali liberi nel processo ossidativo si riduce.

- **Rigenerazione e vitalità cellulare.**

I processi di rigenerazione cellulare o di guarigione delle ferite sono caratterizzati da un aumento dell'attività metabolica delle cellule coinvolte nel trauma. Si è cercato di verificare se Emiko San è in grado di favorire il metabolismo energetico di cellule epiteliali fibroblastiche (cell line L/-929). La presenza nella coltura cellulare di Emiko San dopo 180' conferma l'incremento dose dipendente del metabolismo energetico cellulare. L'assorbimento del 100% dei principi attivi della dose consigliata del preparato determina il picco massimo pari a circa il 20% del processo di stimolo rigenerativo.

Le ricerche con Emiko San hanno dimostrato che questo prodotto possiede marcate qualità antiossidanti. Lo studio conferma inoltre l'attività antiossidante del prodotto come inibitore di radicali liberi sia esogeni che endogeni. Emiko San contribuisce alla diminuzione dell'esubero indesiderato di radicali liberi (stress ossidativo).

Inoltre è emerso in modo particolarmente significativo l'effetto rigenerativo e rivitalizzante di Emiko San quale risultato della coltura cellulare di cellule epiteliali dopo 180 ' di presenza del preparato

Prof. Dr. Peter C. Dartsch

## 2 Caratteristiche generali del prodotto

- Emiko San è un alimento a base di Microorganismi Effettivi e di estratti di 14 erbe.
- I microorganismi probiotici presenti in Emiko San dopo l'assunzione influenzano in modo positivo l'equilibrio della flora oro-gastro-enterica. La carenza di microorganismi nella normale alimentazione è efficacemente integrata dai microorganismi probiotici di Emiko San.
- L'equilibrio della flora oro-gastro-intestinale non è solo importante per una buona digestione ma assume un ruolo fondamentale nel metabolismo delle sostanze presenti nei cibi e nell'attività del sistema immunitario.

## 3 EMIKO® SAN - Concentrazioni per i test - presupposti

Per essere in grado di valutare la concentrazione di EMIKO® SAN usata per il test nelle analisi cellulari qui eseguite (senza l'impiego di animali), si è partiti dai seguenti presupposti:

- La dose giornaliera consigliata è al massimo di 50 ml ovvero 50 gr. Con un assorbimento presunto del 50% e una distribuzione in 3,5 litri di flusso sanguigno, si ottiene una concentrazione di 15mg/ml nel test. Se si parte da una distribuzione in 60 litri di flusso sanguigno, allora si ottengono concentrazioni di 0,8 mg/ml, con un assorbimento del 100%.
- Le analisi sono state eseguite perciò in un ambito di concentrazioni tra 0 e 20 mg/ml e sono state indicate in questo modo: 0 - 0,5 – 1 -2,5 – 5 – 10 – 20 mg/ml. La concentrazione "0" caratterizza il controllo non trattato.

## 4 Quesiti relativi ai test eseguiti

- EMIKO® SAN è in grado di inibire i radicali liberi esogeni (reattivi) e in questo modo prevenire un danno dell'organismo dovuto a stress ossidativo?
- EMIKO® SAN è in grado di inibire/disattivare i radicali liberi endogeni in eccesso che si sono formati per un disequilibrio metabolico? Un esubero localizzato di radicali si può formare ad esempio in presenza di processi infiammatori a causa di granulociti neutrofilici (che provengono) dal sangue.
- EMIKO® SAN è in grado di ridurre il metabolismo energetico e quindi la migrazione e lo "scoppio" (Burst) ossidativo delle cellule che trasmettono infiammazioni?
- EMIKO® SAN è in grado di stimolare il metabolismo di cellule epiteliali e quindi attivare una rigenerazione e/o rivitalizzazione cellulare?

## 5 Radicali liberi reattivi e stress ossidativi

Senza ossigeno non possiamo vivere, ma l'ossigeno sotto forma di radicali liberi (ROS= reactive oxygen species) può causare dei cambiamenti fisiopatologici e anche attivare un processo di invecchiamento precoce.

I radicali liberi sono prodotti di continuo nel nostro corpo come "prodotti" naturali del metabolismo e hanno fondamentalmente dei compiti vitali. Inoltre essi si trovano in un equilibrio continuo con i meccanismi naturali che regolano la detossificazione come gli enzimi perossido-dismutasi, catalasi e glutazione.

Danni ambientali, mancanze nutrizionali, stress fisico o psichico, ma anche medicinali, ferite e infiammazioni possono portare ad una sovrapproduzione incontrollata di radicali liberi. Il sistema di autodifesa presente nel nostro corpo viene quindi distrutto.

Se la formazione dei radicali liberi supera la capacità di detossificazione propria dell'organismo, si parla di "stress ossidativo". I radicali liberi che agiscono velocemente e in modo aggressivo disturbano e distruggono importanti funzioni e strutture del nostro corpo; essi possono causare cambiamenti ossidativi e insieme danni a tutte le biomolecole come acidi nucleici (DNA e RNA), proteine, lipidi e carboidrati.



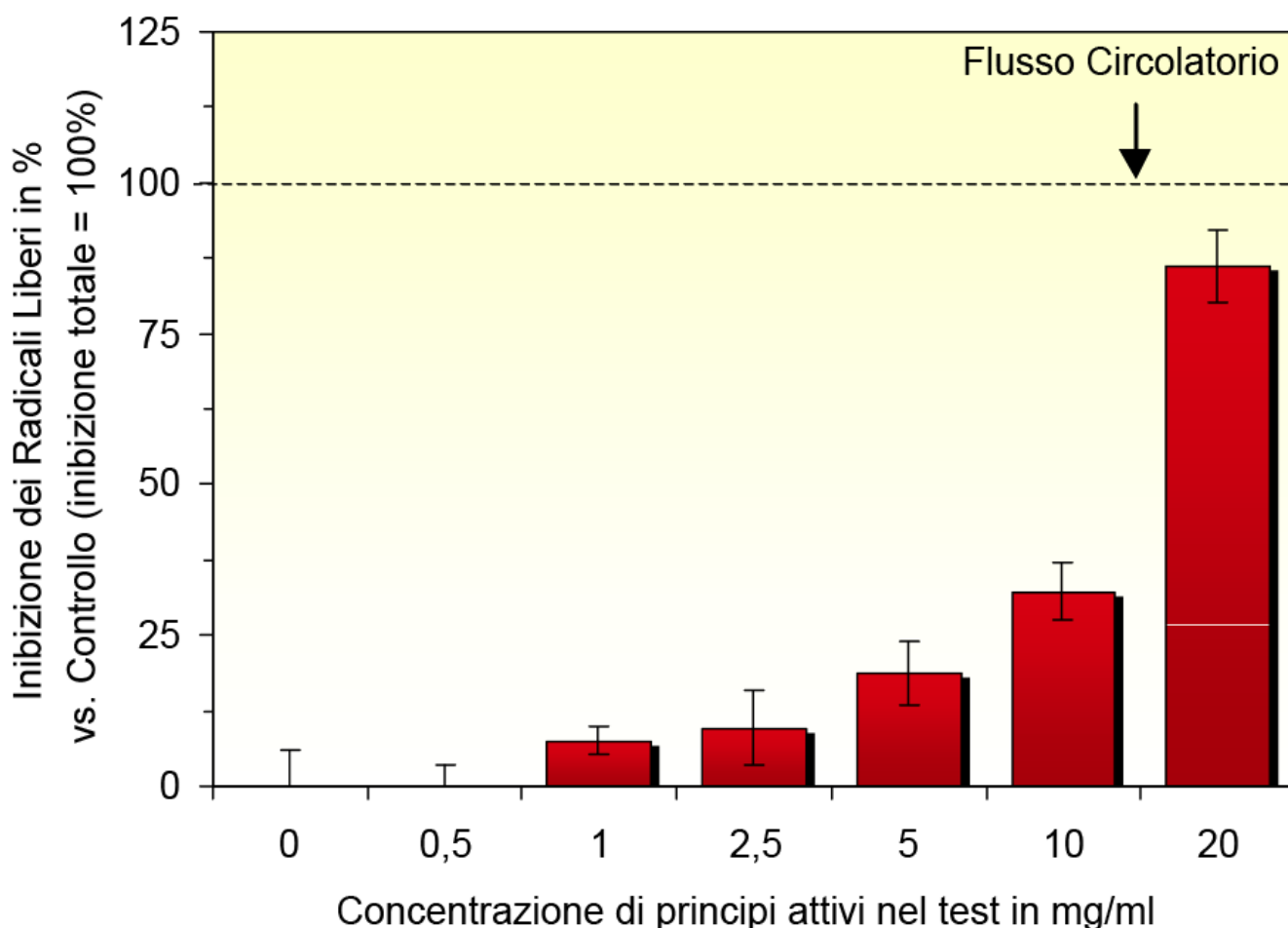
**Immagine 1:** Effetti fisiopatologici di stress ossidante e dei diversi radicali liberi reattivi, sull'organismo umano.

## 6 Effetto antiossidante di EMIKO® SAN sottoposto a test non cellulari, in presenza di radicali liberi esogeni

Principio su cui si basa il test: in questa serie di test non cellulari si è cercato di provare se concentrazioni diverse della sostanza da esaminare(EMIKO® SAN) sono in grado di disattivare/inibire i radicali liberi.

Per fare questa analisi, sono state messe in acqua distillata diverse concentrazioni della sostanza da analizzare ed è stata aggiunta con pipetta una soluzione di perossido di potassio in acqua distillata (1mg/ml; laboratorio di analisi chimiche Sigma-Alrich di Taufkirchen).

I radicali che non si sono disattivati/inibiti attraverso il principio attivo e che quindi sono rimasti aggressivi e reattivi hanno portato ad una dissociazione/ scissione e quindi ad un cambiamento della densità "ottica" (=che si può visualizzare) del colorante idrosolubile al tetrazolo(WST-1Roche diagnostics, Mannheim) , che è stato aggiunto al composto. Tale densità ottica è stata evidenziata in modo continuativo come misura differenziale  $\Delta OD$  (densità ottica delta)= 450-690nm e dopo la regressione naturale delle curve ottenute è stato valutata in forma di salita(ascesa) in  $mOD(=densità\ ottica)/min$ . I risultati ottenuti sono stati rappresentati poi come valori relativi in confronto con il "controllo non trattato" e riferiti alla concentrazione. EC50 è stato calcolato come grandezza di paragone così come risulta dalle curve ottenute e rappresenta la concentrazione con la quale si arriva ad una inattivazione del 50% dei radicali liberi.



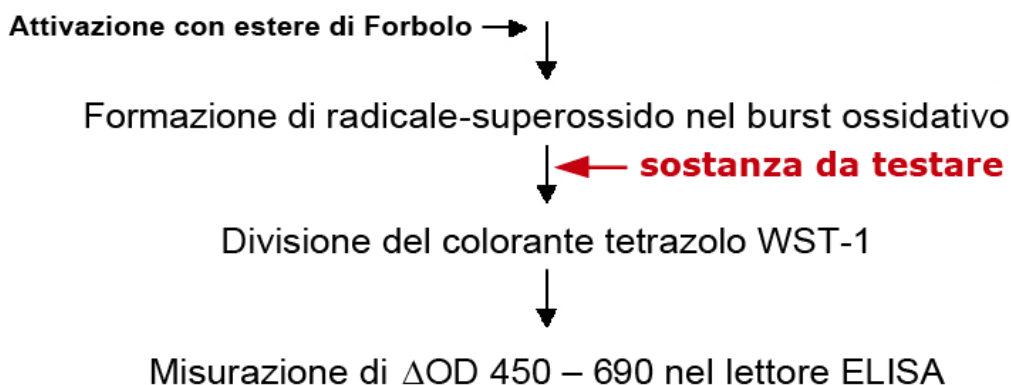
**Figura 2:** Effetto antiossidante di EMIKO® SAN con una inattivazione dosedipendente dei radicali liberi esogeni(EC50=15 mg/ml). In questo modo si può diminuire lo stress ossidativo dovuto ad un eccesso di radicali liberi dannosi provenienti dall'ambiente.

## 7 Effetto antiossidante di EMIKO® SAN in un test basato su cellule(=cellulare) in presenza di soprannumero di radicali liberi endogeni a causa di cellule portatrici di infiammazione.

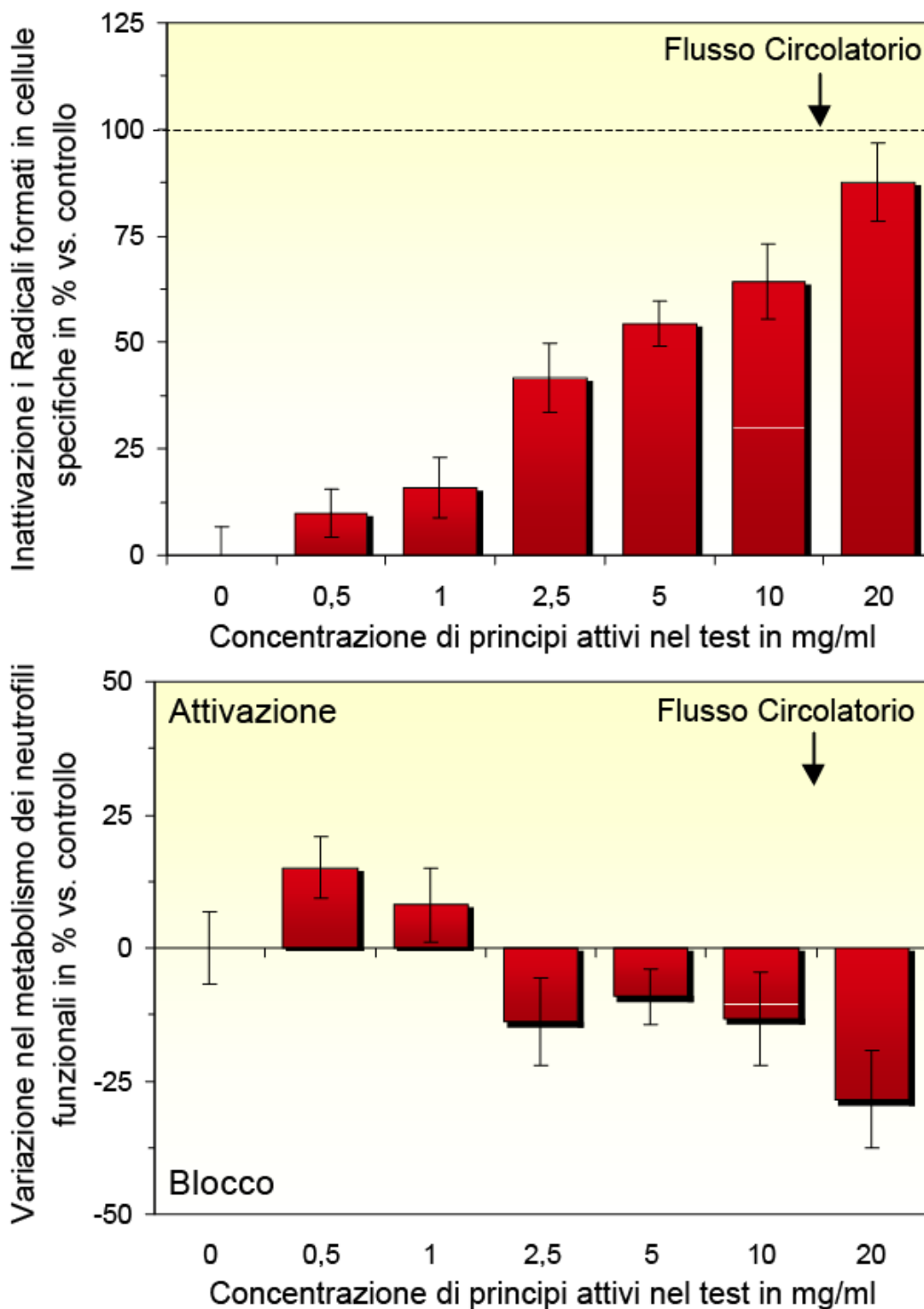
Principio su cui si basa il test: In primo luogo sono state differenziate dei promielociti umani ("linea cellulare" HL60, ECACC 98070106) in cosiddetti neutrofili funzionali, come "linea cellulare " permanente in una coltura di routine, per mezzo di un trattamento di sei giorni con "ossido di zolfo dimetile". Queste sono cellule, che possiedono le caratteristiche delle cellule fagociti e portatrici di infiammazioni nel sangue (granulociti neutrofili). Queste cellule differenziate sono state indotte a formare dei radicali "superossidanti" attraverso l'aggiunta di estere di Forbolo (Phorbol-12-myristat-13-acetato; laboratorio di analisi chimiche di Taufkirchen). I radicali hanno portato ad una scissione del colorante di tetrazolo WST-1 aggiunto ulteriormente al composto. Così la quantità dei radicali liberi formati è direttamente proporzionale alla scissione del colorante, cioè più radicali reattivi sono presenti, tanto più forte è la scissione del colorante ed anche il cambiamento della densità ottica(=visibile). Se i radicali formati dalle cellule vengono inattivati dal colorante, cambia anche la densità ottica,diventando meno forte. La densità visibile(ottica) è stata evidenziata in modo continuativo come misura differenziale  $\Delta OD$  (densità ottica delta)= 450-690nm e dopo la regressione naturale delle curve ottenute è stato valutata in forma di salita(ascesa) in  $mOD$ (=densità ottica)/min. I risultati ottenuti sono stati rappresentati poi come valori relativi in confronto con il "controllo non trattato" e riferiti (rapportati) alla concentrazione.  $EC_{50}$  è stato calcolato come grandezza di paragone così come risulta dalle curve ottenute e rappresenta la concentrazione con la quale si arriva ad una inattivazione del 50% dei radicali liberi. Senza stimolazione per mezzo di estere di Forbolo si è potuto inoltre misurare il metabolismo energetico basale dei neutrofili funzionali seguendo la stessa metodologia.



Cellula neutrofila funzionale  
(ottenuta da differenziazione chimica di promielociti umani)



**Figura 3:** raffigurazione del principio con cui si è cercato di misurare i neutrofili funzionali in un Burst ossidativo (stato di infiammazione ossidante). In questo modo si può valutare il potenziale di un colorante per l'inattivazione dei radicali endogeni e dei radicali che si formano ad esempio in presenza di processi infiammatori.

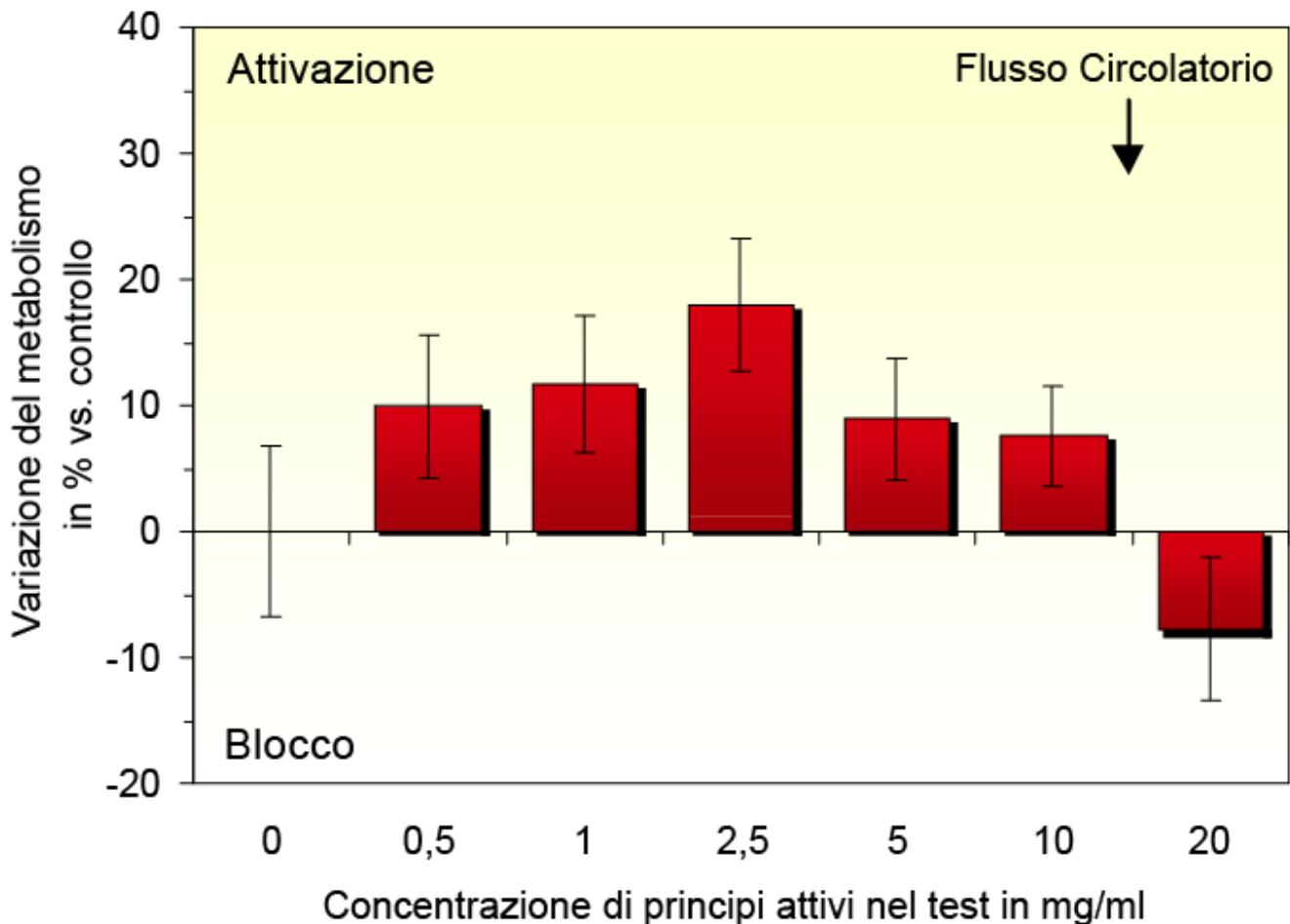


**Figura 4:** L'inattivazione dosedipendente di radicali liberi esogeni, che si sono formati dalle cellule trasmettitrici di infiammazione in un Burst ossidativo(stato di infiammazione ossidante) EC50=3,5 mg/ml; grafico superiore.

Grafico inferiore: Blocco/paralisi dosedipendente del metabolismo energetico dei neutrofili funzionali attraverso EMIKO® SAN. Per mezzo di EMIKO® SAN si può diminuire il passaggio di queste cellule nel tessuto infiammato e si può anche ridurre la formazione di radicali liberi reattivi in uno stato di ossidazione(Burst ossidativo).

## 8 Effetto di EMIKO® SAN sul metabolismo energetico di cellule del tessuto connettivo (effetto di rigenerazione e rivitalizzazione cellulare)

I processi di rigenerazione cellulare o processi di guarigione delle ferite sono caratterizzati tra l'altro da un aumento temporaneo del metabolismo energetico delle cellule interessate. Se un principio attivo/miscuglio di principi attivi è in grado di stimolare il metabolismo energetico cellulare, allora si può verificare come conseguenza il fatto che questo principio sia in grado di attivare la rigenerazione e la rivitalizzazione delle cellule. Per un'analisi di questo genere sono stati usati fibroblasti di tessuto connettivo (linea cellulare L-929, DSMZ) a una densità di 20.000 cellule per unità in 96 pozzetti. Dopo 48 ore, che servono alle cellule per aderire e per normalizzare il loro metabolismo energetico, le cellule sono state stimulate attraverso l'aggiunta di un tampone di fosfato con 10 mM di glucosio. Il metabolismo energetico con i suoi diversi processi di riduzione ha portato così ad una scissione e anche ad un cambiamento della densità ottica del colorante idrosolubile al tetrazolo (WST-1 Roche diagnostics, Mannheim), che è stato aggiunto al composto. Tale densità ottica è stata evidenziata in modo continuativo come misura differenziale  $\Delta OD$  (densità ottica delta) = 450-690nm e dopo la regressione naturale delle curve ottenute è stata valutata in forma di crescita in mOD densità ottica/min.



**Figura 5:** Stimolazione dosedipendente del metabolismo energetico di fibroblasti del tessuto connettivo attraverso EMIKO® SAN con un effetto massimo nelle concentrazioni che sono già al di sotto della concentrazione calcolata nel flusso sanguigno, in presenza di un riassorbimento del principio attivo indicato del 100%. Attraverso l'attivazione di questo effetto si può arrivare ad un miglioramento della rigenerazione e della rivitalizzazione delle cellule della pelle al vivo. Viene indicato il valore medio $\pm$  la deviazione standard dalle tre misurazioni(n=3).