

## **CITOTOSSICITA' SU FIBROBLASTI DI ORIGINE POLMONARE SECONDO LA NORMA UNI EN ISO 10993-5**

<b>COMMITTENTE</b>	XXXXXXXXXX
<b>SPONSOR</b>	XXXXXXXXXX
<b>CAMPIONE</b>	<b>Sigaretta tradizionale Marlboro Gold</b> <b>Lotto: KS RCB 20</b> <b>Codice interno: 3168/20-03</b>
	<b>Sigaretta elettronica Zeep con liquido VaporArt MelaKiwi nicotina 8 mg/ml</b> <b>Lotto/Batch: Zeep BB0106280 MelaKiwi 20169 05/23</b> <b>Codice interno: 3170/20-07</b>
	<b>Dispositivo IQOS con sigarette HEETS turquoise selection</b> <b>Lotto: IQOS JT6072ZK2MRDA</b> <b>Codice interno: 3172/20-06</b>
<b>DATA REPORT</b>	<b>25/02/2021</b>
<b>REPORT N.</b>	<b>REL/0534/2021/CITO/ELB</b>

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)

## Indice

<b>1</b>	<b>PARTE PRIMA</b> .....	<b>3</b>
	<b>INFORMAZIONI GENERALI</b> .....	<b>3</b>
1.1	<b>COMMITTENTE</b> .....	3
1.2	<b>SPONSOR</b> .....	3
1.3	<b>CAMPIONE ANALIZZATO</b> .....	3
1.4	<b>TEST</b> .....	3
<b>2</b>	<b>PARTE SECONDA</b> .....	<b>4</b>
	<b>PROTOCOLLO SPERIMENTALE</b> .....	<b>4</b>
2.1	<b>SCOPO DEL TEST</b> .....	4
2.1.1	<b>Preparazione del campione</b> .....	4
2.1.2	<b>Trattamento ed Esposizione</b> .....	5
2.1.3	<b>Test di vitalità cellulare MTT</b> .....	5
2.1.4	<b>Espressione ed interpretazione dei risultati</b> .....	6
<b>3</b>	<b>PARTE TERZA - RISULTATI E CONCLUSIONI</b> .....	<b>6</b>
3.1	<b>RISULTATI</b> .....	6
3.2	<b>CONCLUSIONI</b> .....	8

### Nota:

Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)

## 1 PARTE PRIMA INFORMAZIONI GENERALI

1.1 **Committente**           XXXXXXXXXX

1.2 **Sponsor**               XXXXXXXXXX

### 1.3 **Campione Analizzato**

Campione	Descrizione
Sigaretta tradizionale Marlboro Gold Lotto: KS RCB 20	Sigaretta tradizionale / Traditional cigarette
Sigaretta elettronica Zeep con liquido VaporArt MelaKiwi nicotina 8 mg/ml Lotto: Zeep BB0 106280 MelaKiwi 20169 05/23	Dispositivo con liquido - 12 confezioni da 10 ml / Liquid device - 12 packs 10 ml each
Dispositivo IQOS con sigarette HEETS turquoise selection Lotto: IQOS JT6072ZK2MRDA	Dispositivo IQOS con sigarette stick / IQOS device with stick cigarette

### 1.4 **Test**

- Citotossicità attraverso il test MTT: test di sopravvivenza cellulare con fibroblasti umani di origine polmonare coltivati in monostrato per la valutazione della biocompatibilità del fumo con le mucose. Nella citotossicità su monostrato cellulare, le cellule utilizzate per il test sono adese al pozzetto della piastra e immerse nel loro medium di coltura. Per questo motivo non è possibile testare il campione tal quale, ma questo deve necessariamente essere condensato nel medium di coltura delle cellule, altrimenti queste morirebbero per mancanza di nutrienti.

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)

## 2 PARTE SECONDA PROTOCOLLO SPERIMENTALE

### 2.1 *Scopo del test*

Scopo del test è valutare la citotossicità del condensato del fumo aspirato ottenuto con la sigaretta tradizionale, elettronica e IQOS su una cultura cellulare di fibroblasti polmonari umani, secondo quanto descritto nella norma UNI EN ISO 10993-5 relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici, opportunamente modificata allo scopo.

La citotossicità del condensato ottenuto simulando l'esposizione a cui è soggetto l'utilizzatore della sigaretta tradizionale, elettronica o IQOS è un indicatore del rischio per la salute umana del dispositivo in oggetto e della sua tossicità globale nei confronti dell'epitelio respiratorio. Dal momento che non esistono dati pubblicati relativi a studi analoghi effettuati su simili dispositivi, è stato utilizzato come controllo di riferimento il condensato di fumo di tabacco ottenuto in condizioni analoghe con sigarette tradizionali Marlboro Gold.

La metodica utilizzata è quella dell'MTT, semplice e riproducibile, sviluppata originariamente da Mossman. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nell'assorbanza che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze in esame.

#### 2.1.1 *Preparazione del campione*

Il fumo di sigaretta viene campionato utilizzando una macchina del fumo composta da un sistema a depressione e tre beute da 100 mL collegate rispettivamente ad una sigaretta tradizionale, una sigaretta elettronica ed una sigaretta IQOS.

La sigaretta elettronica e la sigaretta IQOS sono posizionate verticalmente su un raccordo plastico inerte. Il posizionamento permette, per la sigaretta elettronica che la resistenza metallica presente all'interno del serbatoio ed utilizzata per riscaldare il liquido, rimanga sempre a contatto con il liquido stesso, come indicato dal produttore.

Per la sigaretta IQOS, ciò permette un supporto stabile per il campionamento.

Ogni beuta è collegata tramite tubi di silicone ad un flussimetro all'interno dello strumento, a sua volta collegato ad una pompa da vuoto e ad un PC con software di controllo appositamente creato. La presenza di un flussimetro per ogni sistema di aspirazione permette il settaggio costante del flusso di aspirazione (vedi Fig.1). Per la preparazione dei condensati sono stati usati 30 ml di medium sterile per ciascuna beuta. Viene eseguita una simulazione di aspirazione/inalazione con una durata di 3" con una pausa della durata di 45" tra un'aspirazione e l'altra, per favorire la raccolta del condensato nel medium, mantenendo costantemente in agitazione le beute durante l'esperimento, in accordo alla norma ISO 4387:2019.

Il flusso di aspirazione è regolato a 1 L/min. Per ogni campione sono eseguiti 150 cicli di aspirazione/inalazione, pari a 25 sigarette tradizionali. Ad intervalli di 6 cicli, la sigaretta tradizionale esaurita e la sigaretta IQOS sono state sostituite manualmente, mentre le sigarette elettroniche sono caricate con l'apposito liquido a inizio sessione e il rispettivo fumo campionato in continuo per il numero di cicli previsto.

Il medium con il condensato ottenuto da tale esperimento è stato sottoposto a test di citotossicità.

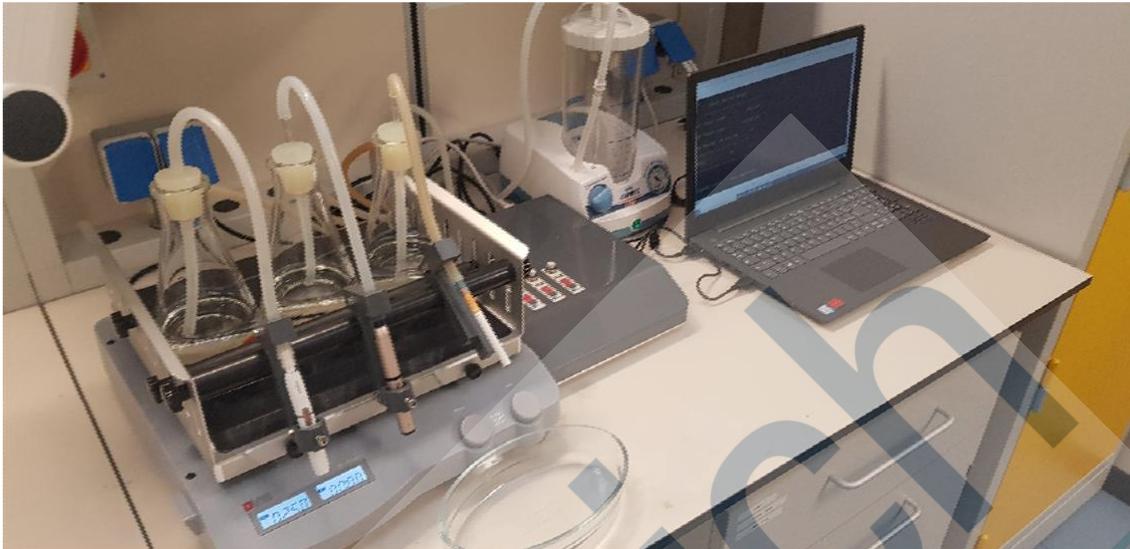


Fig.1 Foto esemplificativa dell'apparato per il campionamento del fumo di sigaretta.

### 2.1.2 *Trattamento ed Esposizione*

Le cellule polmonari umane sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il secondo giorno è stato rimosso il medium e sostituito con il condensato preparato fresco della sigaretta da testare.

Per poter determinare il valore di IC<sub>50</sub> (Inhibiting Concentration 50) alla fine dell'esperimento, le concentrazioni testate sono: condensato tal quale e sue successive diluizioni seriali 1:2 in medium.

Ogni campione è stato testato in sestuplicato. Cellule non trattate sono state utilizzate come bianco e come controllo positivo le cellule sono state trattate con un tensioattivo a tossicità nota (Sodio Lauril Solfato - SLS) disciolto nel terreno di coltura alle concentrazioni comprese tra 0,5mg/ml a 0,03mg/ml.

Dopo 24 ore di incubazione con il campione ed il controllo è stato quindi eseguito il test di citotossicità (MTT) per valutare la percentuale di sopravvivenza cellulare.

### 2.1.3 *Test di vitalità cellulare MTT*

Il medium di coltura viene aspirato e le cellule incubate in 100 µl/pozzetto di una soluzione 1mg/ml di MTT, per 2 ore a 37°C. La soluzione viene rimossa e sostituita con 200 µl/pozzetto di DMSO con successivi 30' di incubazione a temperatura ambiente e con agitazione a media velocità.

Viene letta l'assorbanza a 570 nm con un colorimetro (Tecan INFINITE F200) equipaggiato con un lettore di piastre sottraendo la lettura del fondo a 650 nm.

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)

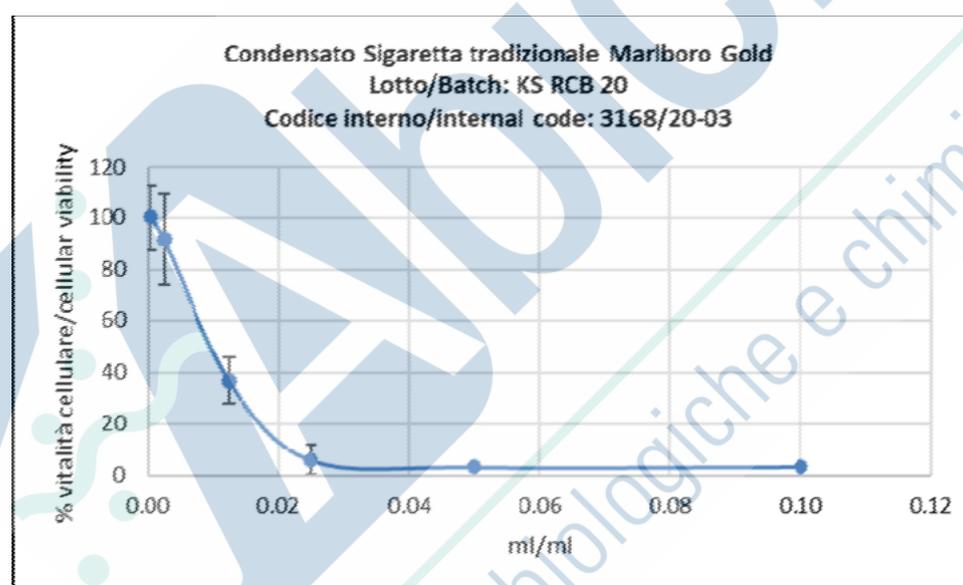
### 2.1.4 Espressione ed interpretazione dei risultati

Il risultato è espresso come vitalità cellulare in percentuale. Per ogni dispositivo è stato calcolato il valore di IC50 (Inhibiting Concentration 50) che indica la concentrazione di prodotto che inibisce la vitalità cellulare del 50%. Una riduzione della vitalità cellulare > 30% è considerato un effetto citotossico.

In ogni grafico è rappresentata la percentuale di vitalità cellulare dopo trattamento con diverse diluizioni del campione testato espresse in ml di fumo condensato su ml di terreno.

## 3 PARTE TERZA - RISULTATI E CONCLUSIONI

### 3.1 Risultati



IC<sub>50</sub> = 0,01 ml/ml

Per la sigaretta Marlboro Gold viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime quattro diluizioni testate come riportato sul grafico.

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

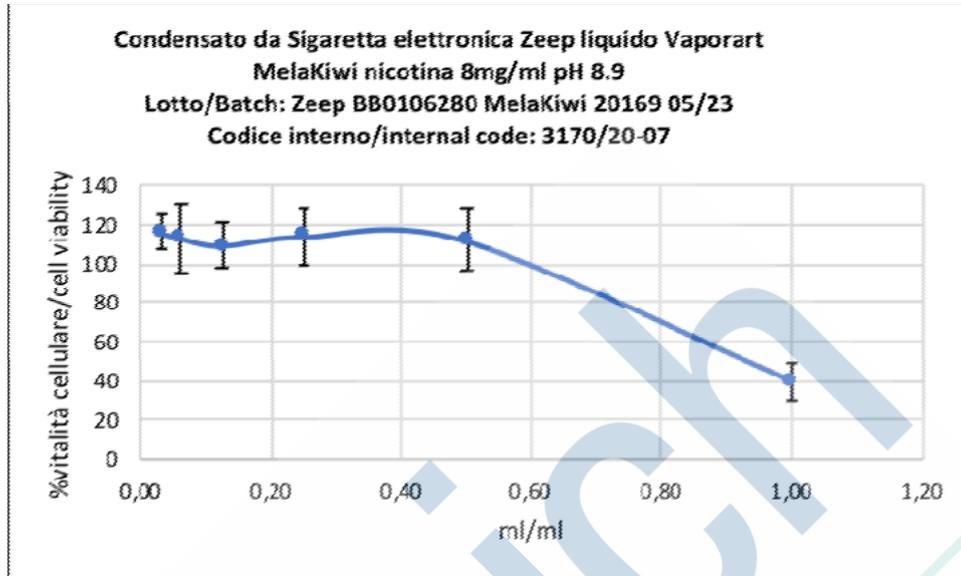
Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

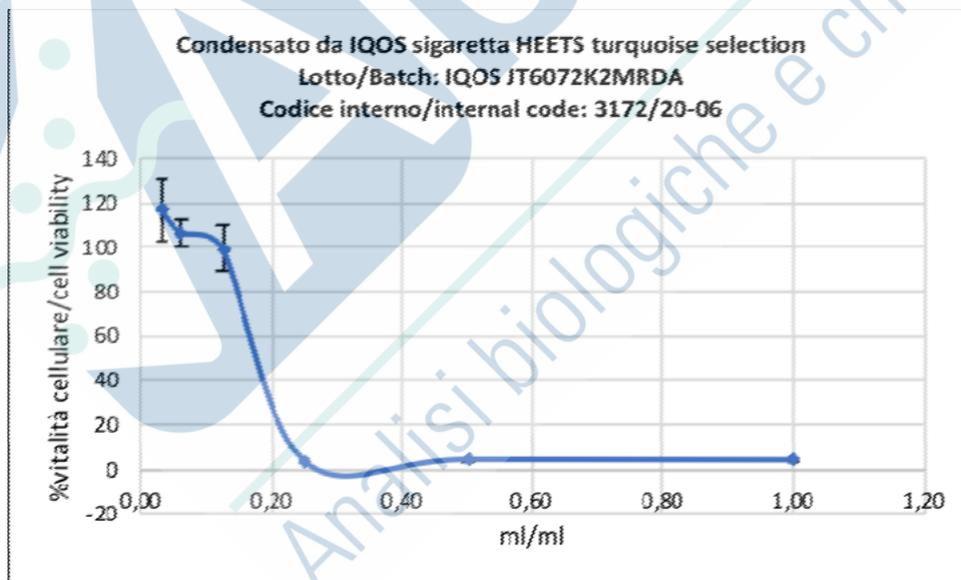
Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)



IC<sub>50</sub> = 0,93 ml/ml

Per la sigaretta elettronica con liquido Vaporart MelaKiwi viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% solo alla prima diluizione testata come riportato sul grafico.



IC<sub>50</sub> = 0,19 ml/ml

Per il dispositivo IQOS con sigaretta HEET turquoise selection viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate come riportato sul grafico.

Sede legale  
 e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
 Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
 Fax +39 0323 496877  
 info@abich.it

CF/VAT/Reg. Imp.  
 VCO: 01864020035  
 R.E.A: 189901  
 Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
 e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
 Vimodrone (MI), Italia

www.abich.it

### 3.2 Conclusioni

Comparando i valori di IC<sub>50</sub> dei diversi dispositivi, in confronto alla sigaretta tradizionale Marlboro Gold si può concludere che:

- **Il liquido Vaporart M elakiwi vaporizzato tramite il dispositivo sigaretta elettronica Zeep è risultato essere 93 volte meno citotossico.**
- **La sigaretta HEETS turquoise selection vaporizzata tramite il dispositivo IQOS è risultato essere 19 volte meno citotossica.**

Comparando i valori di IC<sub>50</sub> relativi al **liquido Vaporart Me laKiwi vaporizzato tramite il dispositivo sigaretta elettronica Zeep** in confronto con la **sigaretta HEETS turquoise selection vaporizzata tramite il dispositivo IQOS**, si può concludere che:

- **La sigaretta elettronica con liquido MelaKiwi è risultata essere circa 5 volte meno citotossica di IQOS.**

Data: 25/02/2021

Direttore dello Studio  
Dr. Elena Bocchietto

Documento con firma digitale

Sede legale  
e laboratori

Via Quarantadue Martiri 213/B 28924  
Verbania (VB), Italia

Tel. +39 0323 586239  
Fax +39 0323 496877  
[info@abich.it](mailto:info@abich.it)

CF/VAT/Reg. Imp.  
VCO: 01864020035  
R.E.A: 189901  
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici  
e Cosmetologici

Via Della Burrone 51, 20055  
Vimodrone (MI), Italia

[www.abich.it](http://www.abich.it)