

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

**Cytotoxicity on Human Pulmonary Fibroblast according to
the UNI EN ISO 10993-5 standard**

COMMITTENTE/CUSTOMER	XXXXXXXXXX
SPONSOR	XXXXXXXXXX
CAMPIONE/SAMPLE	Sigaretta elettronica Zeep con liquido VaporArt MelaKiwi nicotina 8 mg/ml Lotto/Batch: Zeep BB0106280 MelaKiwi 20169 05/23 Codice interno: 3170/20-07
	Dispositivo IQOS con sigarette HEETS turquoise selection Lotto: IQOS JT6072ZK2MRDA Codice interno: 3172/20-06
DATA REPORT/REPORT DATE	16/11/2020
REPORT N./REPORT N.	REL/3975/2020/CITO/ELB

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

Indice/Table of contents

1	PARTE PRIMA/PART ONE	3
	INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	3
1.1	COMMITTENTE/CUSTOMER	3
1.2	SPONSOR	3
1.3	CAMPIONE ANALIZZATO/TESTED SAMPLE	3
1.4	CONTROLLI/ CONTROLS	3
1.5	TEST/ASSAY	4
1.6	LABORATORIO INCARICATO/ENTRUSTED LABORATORY	4
1.7	DATE DELLO STUDIO/STUDY DATES	4
1.8	RICERCATORE PRINCIPALE/MAIN INVESTIGATOR	4
1.9	DIRETTORE DELLO STUDIO/STUDY DIRECTOR	4
1.10	RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITÀ / QUALITY ASSURANCE MANAGER	4
2	PARTE SECONDA/PART TWO	5
	PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN	5
2.1	SCOPO DEL TEST/PURPOSE OF THE TEST	5
2.2	ESECUZIONE DEL TEST/ASSAY PROCEDURES	5
2.2.1	Modello cellulare/Cell model	5
2.2.2	Preparazione del campione/Sample preparation	5
2.2.3	Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure	6
2.2.4	Test di vitalità cellulare MTT/ MTT cell vitality assay	7
2.2.5	Espressione dei risultati/ Expression of results	7
2.3	CRITERI DI ACCETTABILITÀ DEL METODO/ACCEPTANCE CRITERIA OF METHOD	8
2.4	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI/RESULTS INTERPRETATION	8
3	PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS	9
3.1	REQUISITI DI ACCETTABILITÀ DEL TEST /ASSAY VALIDITY REQUIREMENTS	9
3.2	CARATTERIZZAZIONE CHIMICO FISICA DEGLI ESTRATTI/ PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE EXTRACTS	10
3.3	RISULTATI/RESULTS	11
3.2	CONCLUSIONI/CONCLUSIONS	14
4	PARTE QUARTA/PART FOUR	15
	RIFERIMENTI/REFERENCES	15

ALLEGATI/ ENCLOSURES:

- A) DATI GREZZI/ RAW DATA
- B) FOTO ESEMPLIFICATIVA DELL' APPARATO PER IL CAMPIONAMENTO DEL FUMO DI SIGARETTA/ ILLUSTRATIVE PHOTO OF THE SYSTEM FOR THE CIGARETTES CONDENSED PRODUCTION

Nota/Note:

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. The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters

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

1 PARTE PRIMA/PART ONE

INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION

1.1 Committente/Customer XXXXXXXXXXXX

1.2 Sponsor XXXXXXXXXXXX

1.3 Campione Analizzato/Tested Sample

Campione/Sample	Codice interno/ Internal code	Descrizione/Description
Sigaretta elettronica Zeep con liquido VaporArt MelaKiwi nicotina 8 mg/ml Lotto: Zeep BB0 106280 MelaKiwi 20169 05/23	3170/20-07	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	3172/20-06	Dispositivo IQOS con sigarette stick / IQOS device with stick cigarette

1.4 Controlli/ Controls

Controllo/Control	Fornitore/ Supplier	Lotto/Batch
Sodium lauryl sulfate 10% Controllo positivo/ Positive control (PC)	SIGMA	BCBX5190
Terreno di coltura/ Culture medium MEM Bianco/ Blank	EUROCLONE	EUM00CX

**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

1.5 Test/Assay

- 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.
- Cytotoxicity by MTT test: cell survival assay using human pulmonary fibroblasts in monolayer cultures to assess biocompatibility of the smoke with the mucosae.

1.6 Laboratorio incaricato/Entrusted laboratory

ABICH S.r.l.
Via 42 Martiri 213/B– 28924 Verbania ITALY
Tel +39 (0)323 586239 – Fax +39 (0)323 496877

1.7 Date dello Studio/Study Dates

Inizio/Start: 03/11/2020
Fine/End: 05/11/2020

1.8 Ricercatore principale/Main investigator

Dr. Stefano Acquadro, PhD, Scienze Farmaceutiche e Biomolecolari/ PhD, Pharmaceutical and Biomolecular Sciences
ABICH S.r.l.

1.9 Direttore dello Studio/ Study Director

Dr. Elena Bocchietto, Biologa specialista in Biotecnologie/
Biologist, biotechnology specialist.
ABICH S.r.l.

1.10 Responsabile Assicurazione Qualità / Quality assurance manager

Dr. Emanuele Caravati, PhD
ABICH S.r.l.

2 PARTE SECONDA/PART TWO

PROTOCOLLO SPERIMENTALE/ STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test/Purpose of the test

Scopo del test è valutare la citotossicità del condensato del fumo aspirato ottenuto con la sigaretta elettronica e con sigaretta 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 elettronica o IQOS è un indicatore della sicurezza d'uso del dispositivo in oggetto e della sua tossicità globale nei confronti dell'epitelio respiratorio.

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. Le cellule vengono anche esaminate al microscopio dopo il contatto con il campione per valutare eventuali cambiamenti nella loro morfologia, l'integrità della membrana o eventuali fenomeni di lisi.

Aim of the test is to evaluate the cytotoxicity towards fibroblasts of the condensed inspired smoke obtained with the electronic cigarettes and the IQOS cigarettes. As no specific official methods are available, we followed the UNI EN ISO 10993-5 rule concerning the biological evaluation of medical devices, modified for the purpose.

The cytotoxicity of the condensed smoke obtained by simulating the use conditions of the electronic cigarettes, may be considered as a good indicator of its general toxicity towards the cells of the respiratory epithelia.

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. Mossman has developed this method originally. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the absorbance, indicating the degree of cytotoxicity caused by the test material. After sample contact, cells are analysed on microscope to evaluate any change in morphology, membrane integrity and any sign of cell lysis.

2.2 Esecuzione del test/Assay procedures

Il test è stato condotto in accordo con il metodo descritto nella norma UNI EN ISO 10993-5 (1) (2) e ISO 4387:2019 (3).

The test is performed according to the method described in UNI EN ISO 10993-5 standard (1) (2) and e ISO 4387:2019 (3).

2.2.1 Modello cellulare/Cell model

È stata utilizzata una linea di Fibroblasti Polmonari Umani (HPF). Fonte: Innoprot. Le cellule sono coltivate in MEM contenente 10% FBS e antibiotici.

The test is performed on a Human Pulmonary Fibroblast (HPF) cell line. Source: Innoprot. Cells are maintained in MEM containing 10% FBS and antibiotics.

2.2.2 Preparazione del campione/Sample preparation

Il fumo di sigaretta viene campionato utilizzando una macchina del fumo composta da un sistema a depressione e due beute da 100 ml collegate rispettivamente ad 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. La sigaretta elettronica caricata con l'apposito liquido è stata lasciata riposare circa 20 minuti prima dell'aspirazione, in modo che il cotone all'interno del serbatoio risultasse correttamente inumidito di liquido, dopodiché sono stati scartati i primi 2/3 puff. La sigaretta IQOS è stata inserita nel dispositivo già riscaldato. 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 allegato B). 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 IQOS esaurita è stata sostituita 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.

Cigarette smoke is sampled using a smoking machine consisting of a vacuum system and two 100 mL flasks connected respectively to an electronic cigarette and an IQOS cigarette.

The electronic cigarette and the IQOS cigarette are positioned vertically on an inert plastic joint. This position allows the metal resistance inside the tank and used to heat the liquid to remain in contact with the liquid itself of the electronic cigarette, as indicated by the manufacturer. For the IQOS cigarette, this allows the stability of the sampling support. The electronic cigarette loaded with the proper liquid was left to rest for about 20 minutes before aspiration, so that the cotton inside the tank was properly moistened with the liquid, after which the first 2/3 puffs were discarded. The IQOS cigarette has been inserted into the already heated device.

Each flask is connected via silicone tubes to a flow meter inside the instrument, which in turn is connected to a vacuum pump and to a PC with a specially created control software. The presence of a flow meter for each system allows the constant setting of the flow (see annex B). In order to prepare the condensate, 30 ml of sterile medium were used for each flask. A simulation of aspiration / inhalation is performed with a duration of 3" with a pause lasting 45" between one aspiration and the other, to facilitate the collection of the condensate in the medium the flasks are kept constantly stirring during the experiment, in accordance with ISO 4387:2019.

The draft flow is regulated at 1 L/min. For each sample 150 aspiration/inhalation cycles are performed, equal to 25 traditional cigarettes. At intervals of 6 cycles, the exhausted traditional cigarette and the IQOS cigarette were replaced manually, while the electronic cigarettes are loaded with the appropriate liquid at the beginning of each session and the respective smoke is sampled continuously for the expected number of cycles. The medium with the condensate obtained from this experiment was subjected to cytotoxicity tests.

2.2.3 *Trattamento ed Esposizione/Treatment and Exposure*

Le cellule polmonari umane sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e lasciate crescere per 24h a 37°C e 5% CO₂. 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 IC₅₀ (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.

Human pulmonary cells are seeded in 96 wells plates and allowed to grow for 24 h at 37°C and 5% CO₂. On the next day the medium is replaced with the freshly prepared condensed of the cigarette to be tested. In order to calculate the IC₅₀ value (Inhibiting Concentration 50) the tested concentrations are: undiluted condensed and further 1:2 dilutions from that.

Six replicates of each dilution are tested. Cells treated with a known irritating surfactant (Sodium Lauryl Sulfate – SLS) in concentration ranging from 0.5mg/ml to 0.03mg/ml are used as positive control. Untreated cells are used as blank control. After 24 hours of incubation with sample and control, the cells are tested for viability by MTT assay.

2.2.4 Test di vitalità cellulare MTT/ MTT cell vitality assay

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.

The culture medium is removed and the cells incubated for 2 hours in 100 µl/well of 1mg/ml MTT solution at 37°C. The solution is then removed and replaced with 200 µl/well of DMSO, with further 30' incubation at room temperature under medium speed shaking.

The absorbance at 570 nm is measured with a microplate reader (Tecan INFINITE F200), deducting background at 650 nm.

2.2.5 Espressione dei risultati/ Expression of results

Il risultato è espresso come vitalità cellulare in percentuale secondo la formula:

$$\% \text{ di vitalità cellulare} = [\text{OD}(570 \text{ nm} - 650 \text{ nm}) \text{ prodotto testato} / \text{OD}(570 \text{ nm} - 650 \text{ nm}) \text{ bianco}] \times 100$$

Nel caso sia possibile calcolare il valore di IC₅₀ (Inhibiting Concentration 50) che indica la concentrazione di prodotto che inibisce la vitalità cellulare del 50%.

$$\text{IC}_{50} = \text{Conc} > 50 - \frac{(\text{Conc} > 50 - \text{Conc} < 50) \times (\% > 50 - 50)}{(\% > 50 - \% < 50)}$$

Conc > 50 = prima concentrazione che ha dato una vitalità cellulare maggiore del 50%

Conc < 50 = prima concentrazione che ha dato una vitalità cellulare minore del 50%

% > 50 = prima vitalità cellulare ottenuta maggiore del 50%

% < 50 = prima vitalità cellulare ottenuta minore del 50%

The results are expressed in terms of viability, calculated as follow:

$$\% \text{ of cell viability} = [\text{OD}(570 \text{ nm} - 650 \text{ nm}) \text{ test product} / \text{OD}(570 \text{ nm} - 650 \text{ nm}) \text{ blank}] \times 100$$

If it is possible calculate the IC₅₀ value (Inhibiting Concentration 50) which indicates the concentration of test compound which inhibits the cell viability of 50%.

$$IC_{50} = Conc_{>50} - \frac{(Conc_{>50} - Conc_{<50}) \times (\%_{>50} - 50)}{(\%_{>50} - \%_{<50})}$$

Conc_{>50} = first concentration with a cell viability > 50%

Conc_{<50} = first concentration with a cell viability < 50%

%_{>50} = cell viability > 50%

%_{<50} = cell viability < 50%

2.3 Criteri di accettabilità del metodo/ Acceptance criteria of method

per il bianco: il valore medio di OD delle repliche deve essere $\geq 0,2$,
la deviazione standard deve essere $\leq 18\%$
la media di due colonne di bianchi non deve differire per più del 15%

per il controllo positivo (CP): l'IC₅₀ del controllo positivo SLS deve risultare 0,10mg/ml $\pm$ 0,03
la deviazione standard deve essere $\leq 18\%$

per il campione: la deviazione standard deve essere $\leq 18\%$

for blank: the mean OD value of the replica has to be ≥ 0.2 ,
the standard deviation has to be $\leq 18\%$
medium of two blank columns have not to be more differ than 15%

for positive control (CP): IC₅₀ of positive control SLS have to be 0,10mg/ml $\pm$ 0,03
the standard deviation has to be $\leq 18\%$

for the sample: the standard deviation has to be $\leq 18\%$

2.4 Interpretazione dei risultati/Results interpretation

Una riduzione della vitalità cellulare > 30% è considerato un effetto citotossico. / Reduction of cell viability by more than 30% is considered a cytotoxic effect.

3 **PARTE TERZA/PART THREE - RISULTATI E CONCLUSIONI/RESULTS AND CONCLUSIONS**

3.1 **Requisiti di accettabilità del test /Assay validity requirements**

	Valore/Value	Limiti/ Limits	Risultato/Result
Bianco/blank: OD media / mean OD	0,74 (3170/20-07) 0,65 (3172/20-06)	$\geq 0,2$	Conforme/ Complies
Bianco/blank: Dev. Standard % / % stand. Dev.	8,44 (3170/20-07) 12,37 (3172/20-06)	≤ 18	Conforme/ Complies
Bianco/blank: Differenza % due colonne di bianchi/ two blank column different %	1,33 (3170/20-07) 4,86 (3172/20-06)	≤ 15	Conforme/ Complies
CP: IC ₅₀	0,09	0,10mg/ml $\pm$ 0,03	Conforme/ Complies
CP: Dev. Standard % % stand. Dev. A tutte le concentrazioni/ at all concentrations	Tutte le diluizioni<18/ All dilutions<18	≤ 18	Conforme/ Complies
Campione/sample: Dev. Standard % / %stand. Dev. A tutte le concentrazioni/ at all concentrations	Tutte le diluizioni<18/ All dilutions<18	≤ 18	Conforme/ Complies

I criteri di accettabilità del test (vedi § 2.3) sono conformi, quindi il test è considerato valido.
Acceptance criteria of the assay (see § 2.3) comply, hence the assay is valid.

3.2 Caratterizzazione chimico fisica degli estratti/Physico-chemical characterization of the extracts

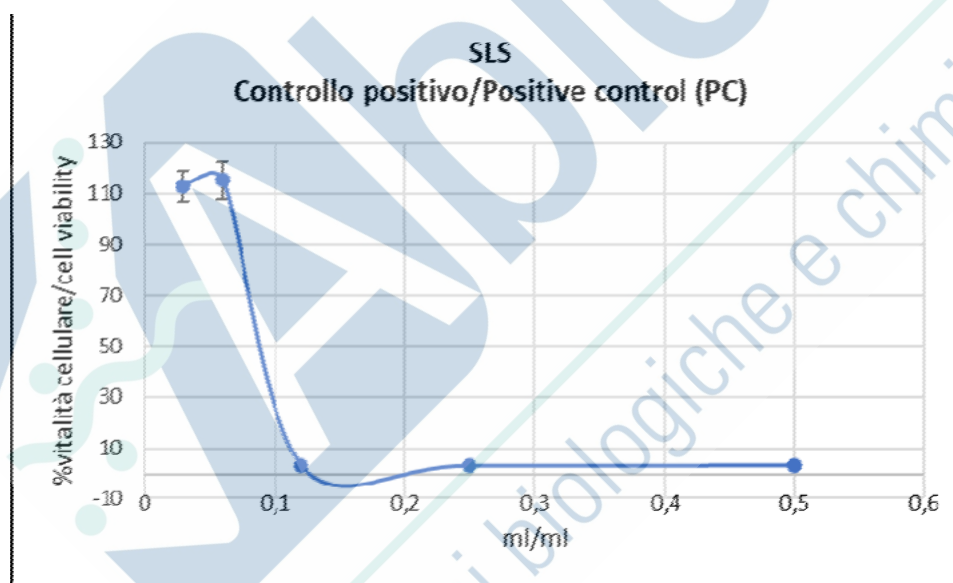
È stato misurato il valore di pH per i diversi campioni di condensato in relazione al medium di partenza. E' stato così possibile valutare gli effetti dei differenti dispositivi e sigarette su questo liquido di raccolta che possiede un sistema tampone carbonato simile a quello fisiologico umano./ The following pH values were measured for the different condensate samples in relation to the starting medium in order to evaluate the effects of the different devices and cigarettes on this collection liquid which possesses a carbonate buffer system similar to the physiological one in human.

Estratto del condensato corrispondente al campione/Condensate extract corresponding to the sample	pH
Terreno di controllo: Valori iniziali basali/ Control medium: initial baseline values	7.5
Sigaretta elettronica Zeep liquido MelaKiwi nicotina 8mg/ml 3170/20-07	8.9
IQOS sigaretta HEETS turquoise selection 3172/20-06	7.9

**Sede legale
e laboratori**Via Quarantadue Martiri 213/B 28924
Verbania (VB), ItaliaTel. +39 0323 586239
Fax +39 0323 496877
info@abich.itCF/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), Italiawww.abich.it

3.3 Risultati/Results

SLS (controllo positivo/positive control)					
Dose mg/ml	0,50	0,25	0,13	0,06	0,03
Vitalità cellulare % % cell viability	3,11	3,09	3,45	115,16	112,74
stand. dev.	0,23	0,21	0,30	7,26	5,91
$IC_{50} = 0,09 \text{ mg/ml}$ Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate. A cell mortality > 30% is recorded for the first three higher tested dilutions.					



Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con dosi crescenti di SLS/
Cell viability expression after treatment with increasing amount of SLS

**Sede legale
e laboratori**

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

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

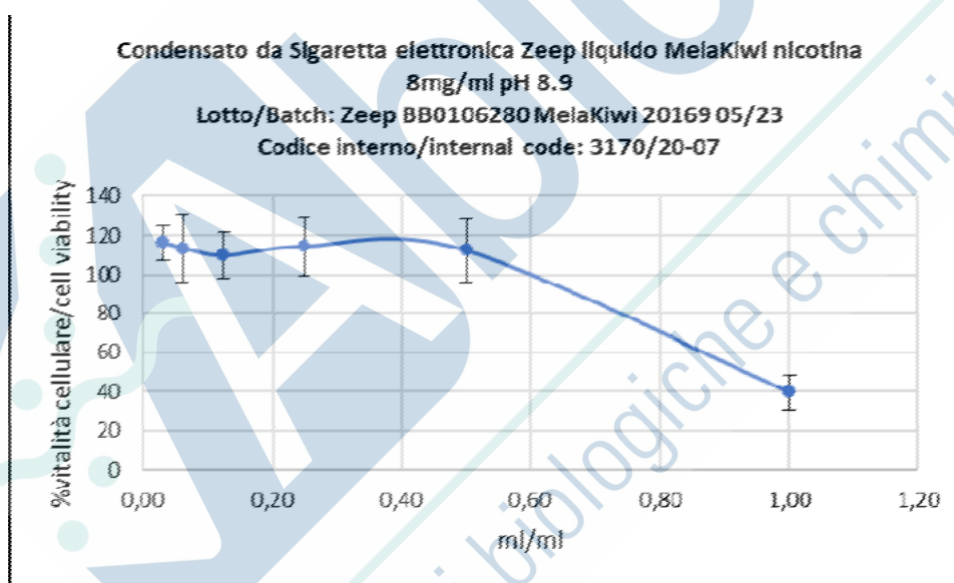
CF/VAT/Reg. Imp.
 VCO: 01864020035
 R.E.A: 189901
 Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici
e Cosmetologici**

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

www.abich.it

Condensato da Sigaretta elettronica Zeep liquido MelaKiwi nicotina 8mg/ml Lotto/Batch: Zeep BB0106280 MelaKiwi 20169 05/23 Codice interno/internal code: 3170/20-07						
Dose ml/ml	Tal quale, undiluted	0,5 (1:2)	0,25 (1:4)	0,125 (1:8)	0,063 (1:16)	0,031 (1:32)
Vitalità cellulare % % cell viability	39,68	112,17	114,24	109,66	113,41	116,19
stand. dev.	8,97	15,88	14,59	11,69	17,44	8,68
$IC_{50} = 0,93 \text{ ml/ml}$ Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alla prima diluizione testata. A cell mortality > 30% is pointed out at the first tested dilution.						



Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con diverse diluizioni del campione testato/
Cell viability expression after treatment with different dilutions of the tested sample

**Sede legale
e laboratori**

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

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

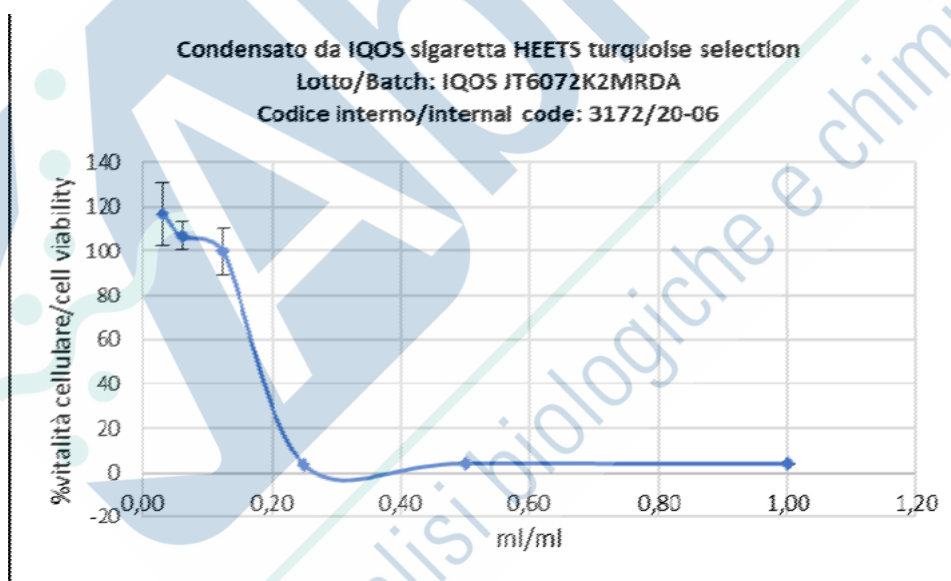
CF/VAT/Reg. Imp.
 VCO: 01864020035
 R.E.A: 189901
 Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici
e Cosmetologici**

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

www.abich.it

Condensato da IQOS sigaretta HEETS turquoise selection Lotto/Batch: IQOS JT6072K2MRDA Codice interno/internal code: 3172/20-06						
Dose ml/ml	Tal quale, undiluted	0,5 (1:2)	0,25 (1:4)	0,125 (1:8)	0,063 (1:16)	0,031 (1:32)
Vitalità cellulare % % cell viability	3,89	4,04	3,77	99,86	106,58	116,78
stand. dev.	0,41	0,65	0,34	10,32	6,29	13,94
IC ₅₀ = 0,19 ml/ml Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate. A cell mortality > 30% is pointed out at the first three tested dilutions.						



**Espressione della vitalità cellulare dopo trattamento con diverse diluizioni del campione testato/
 Cell viability expression after treatment with different dilutions of the tested sample**

**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/Conclusions

Comparando i diversi valori di IC₅₀ si può evincere che:/ Comparing the different IC₅₀ values it can be conclude that:

La sigaretta elettronica con liquido MelaKiwi è risultata essere circa 5 volte meno citotossica rispetto al dispositivo IQOS con sigaretta HEETS turquoise selection. /

The e-cigarette with MelaKiwi liquid was found to be 5 times less cytotoxic than the IQOS device with HEETS turquoise selection cigarette.

Concentrazioni/ Concentrations	Elettronica MelaKiwi 3170/20-07	IQOS Turquoise 3172/20-06
Non diluito/ Not diluted	Citotossico / Cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:2	Non Citotossico / Not cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:4	Non Citotossico / Not cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:8	Non Citotossico / Not cytotoxic	Non Citotossico / Not cytotoxic
1:16	Non citotossico / Not cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:32	Non citotossico / Not cytotoxic	Non citotossico / Not cytotoxic

Data/Date: 16/11/2020

Direttore dello Studio/ Study Director
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

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

4 PARTE QUARTA/PART FOUR **RIFERIMENTI/REFERENCES**

1. Norma UNI EN ISO 10993-5 Valutazione biologica dei dispositivi medici/ biological evaluation of medical devices – Prove per la citotossicità in vitro/ assays for the in vitro cytotoxicity- Settembre 2009.
2. Norma UNI EN ISO 10993-12 Valutazione biologica dei dispositivi medici – Parte 12: Preparazione dei campioni e materiali di riferimento - Settembre 2012.
3. ISO 4387:2019 “Cigarettes — Determination of total and nicotine-free dry particulate matter using a routine analytical smoking machine”;

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

ALLEGATO ALLA RELAZIONE/ENCLOSURE TO THE REPORT 3918/20

A) DATI GREZZI/RAW DATA

SDS

Mode					Absorbance						
Measurement Wavelength					570 nm						
Bandwidth					10 nm						
Reference Wavelength					650 nm						
Bandwidth					10 nm						
Number of Flashes					25						
Settle Time					0 ms						
Part of Plate					B2-D11						
Start Time					05/11/2020 12:36:23						
					Temperature: 21.5 °C						
Dual wavelength measurement with measurement filter											
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
B	0,5737	0,6712	0,0551	0,053	0,0559	0,7194	0,7244	0,7063	0,687	0,6691	
C	0,6433	0,6786	0,0542	0,0554	0,0587	0,6524	0,6583	0,6513	0,675	0,6377	
D	0,5771	0,6651	0,0568	0,0558	0,0566	0,7305	0,6783	0,6633	0,6741	0,5876	
Dual wavelength measurement with reference filter											
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
B	0,0717	0,0769	0,0386	0,0377	0,0384	0,0796	0,0795	0,079	0,0783	0,0777	
C	0,0758	0,0775	0,0384	0,0381	0,0382	0,0749	0,0754	0,0758	0,0767	0,0758	
D	0,0718	0,0778	0,0385	0,0384	0,0385	0,0806	0,0781	0,0772	0,0783	0,073	
Calculated difference between measurement and reference measurement											
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
B	0,502	0,5944	0,0164	0,0154	0,0175	0,6398	0,6448	0,6273	0,6087	0,5915	
C	0,5675	0,6011	0,0158	0,0173	0,0205	0,5775	0,5829	0,5756	0,5984	0,5619	
D	0,5053	0,5872	0,0182	0,0174	0,018	0,6499	0,6002	0,5862	0,5957	0,5146	

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

3170/20-07

Mode				Absorbance						
Measurement Wavelength				570 nm						
Bandwidth				10 nm						
Reference Wavelength				650 nm						
Bandwidth				10 nm						
Number of Flashes				25						
Settle Time				0 ms						
Part of Plate				B2-G11						
Start Time	05/11/2020	12:40:32								
Temperature: 21.9 °C										
Dual wavelength measurement with measurement filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,645	0,8275	0,3255	0,8537	0,8538	0,7879	0,7405	0,8781	0,8537	0,8
C	0,8572	0,7185	0,2315	0,7944	0,9774	0,8482	0,9	0,9385	0,786	0,8575
D	0,8929	1,09	0,3971	0,9583	1,0193	1,031	1,0798	1,0815	1,0112	0,8356
E	0,8733	0,9825	0,341	0,9857	1,1159	0,9651	1,117	0,9599	0,9772	0,8184
F	0,8579	1,1286	0,4277	1,139	0,7986	0,9749	0,91	1,0009	0,7065	0,8392
G	0,7885	0,8854	0,3947	0,8432	0,9117	0,8454	0,8924	0,9096	0,8497	0,8942
Dual wavelength measurement with reference filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,0757	0,0875	0,0551	0,0885	0,0889	0,0851	0,0827	0,0903	0,0893	0,0873
C	0,0905	0,0825	0,0529	0,0934	0,1037	0,0895	0,1001	0,0986	0,0947	0,0905
D	0,0918	0,1074	0,0616	0,1021	0,1054	0,105	0,1073	0,1122	0,1029	0,0906
E	0,0904	0,1029	0,0579	0,1001	0,1101	0,1001	0,1084	0,1027	0,0999	0,0885
F	0,0915	0,1119	0,0641	0,1119	0,0949	0,1036	0,1033	0,1046	0,0819	0,0891
G	0,0863	0,0918	0,0613	0,0893	0,0925	0,092	0,0936	0,0927	0,089	0,0922
Calculated difference between measurement and reference measurement										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,5693	0,74	0,2704	0,7652	0,7649	0,7028	0,6577	0,7879	0,7644	0,7127
C	0,7667	0,636	0,1786	0,701	0,8737	0,7588	0,7999	0,8399	0,6914	0,767
D	0,8011	0,9825	0,3356	0,8562	0,9139	0,926	0,9724	0,9693	0,9083	0,745
E	0,7829	0,8795	0,2832	0,8856	1,0058	0,865	1,0085	0,8572	0,8773	0,7299
F	0,7664	1,0167	0,3636	1,0271	0,7036	0,8713	0,8067	0,8963	0,6246	0,7501
G	0,7021	0,7936	0,3334	0,7539	0,8192	0,7533	0,7988	0,8169	0,7607	0,802

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

3172/20-06

Mode				Absorbance						
Measurement Wavelength				570 nm						
Bandwidth				10 nm						
Reference Wavelength				650 nm						
Bandwidth				10 nm						
Number of Flashes				25						
Settle Time				0 ms						
Part of Plate				B2-G11						
Start Time	05/11/2020 12:42:54									
	Temperature: 21.6 °C									
Dual wavelength measurement with measurement filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,4692	0,7069	0,0627	0,0623	0,0601	0,6511	0,7848	0,8031	0,787	0,7739
C	0,7554	0,8729	0,0662	0,0641	0,0624	0,7889	0,7502	0,7727	0,702	0,7879
D	0,7537	0,7084	0,0658	0,0644	0,0638	0,7053	1,0508	1,0622	0,9403	0,7712
E	0,7326	0,7276	0,064	0,0675	0,0668	0,7928	1,0586	1,1003	1,0172	0,792
F	0,7366	0,5409	0,0708	0,0762	0,0683	0,7962	1,1676	0,9897	1,0542	0,7555
G	0,7299	0,6483	0,0624	0,0647	0,0641	0,6427	0,7692	0,8285	0,7568	0,7069
Dual wavelength measurement with reference filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,0644	0,0784	0,039	0,039	0,0387	0,0755	0,084	0,086	0,0845	0,084
C	0,0822	0,0949	0,0405	0,0403	0,0391	0,0857	0,0812	0,0894	0,0815	0,0854
D	0,0838	0,0807	0,0402	0,0404	0,0399	0,0802	0,104	0,1049	0,1003	0,0854
E	0,0821	0,0845	0,0396	0,0399	0,0403	0,0873	0,1037	0,1072	0,1024	0,0867
F	0,0814	0,0741	0,0409	0,0421	0,0407	0,0873	0,1113	0,1015	0,1065	0,0843
G	0,0818	0,0777	0,0404	0,0405	0,0402	0,0756	0,0852	0,0881	0,0843	0,0815
Calculated difference between measurement and reference measurement										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,4048	0,6285	0,0238	0,0233	0,0214	0,5755	0,7008	0,7171	0,7025	0,6899
C	0,6732	0,778	0,0256	0,0238	0,0233	0,7033	0,6691	0,6833	0,6205	0,7025
D	0,6699	0,6278	0,0256	0,0239	0,0239	0,6251	0,6468	0,9574	0,84	0,6857
E	0,6505	0,643	0,0244	0,0277	0,0265	0,7055	0,7549	0,9931	0,9148	0,7052
F	0,6552	0,4668	0,0299	0,0341	0,0275	0,7089	1,0563	0,8882	0,9478	0,6712
G	0,6481	0,5706	0,022	0,0242	0,0239	0,567	0,684	0,7404	0,6725	0,6253

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

**B) Foto esemplificativa dell'apparato per il campionamento del fumo di sigaretta/
Illustrative photo of the system for the cigarettes condensate production**



**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