

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 tradizionale Marlboro Gold Lotto: KS RCB 20 Codice interno: 3168/20-03
	Sigaretta tradizionale Camel Blue Lotto: KEJ17B13 Codice interno: 3169/20-03
DATA REPORT/REPORT DATE	24/11/2020
REPORT N./REPORT N.	REL/4068/2020/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	3
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
3.4	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 tradizionale Marlboro Gold Lotto: KS RCB 20	3168/20-03	Sigaretta tradizionale/ Traditional cigarette
Sigaretta tradizionale Camel Blue Lotto: KEJ17B13	3169/20-03	Sigaretta tradizionale/ Traditional 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

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.

**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

1.6 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: 19/08/2020
Fine/End: 28/08/2020

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 tradizionale 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, 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 traditional cigarette. 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 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 a ciascun tipo di sigaretta tradizionale.

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, le sigarette tradizionali esaurite sono state sostituite manualmente.

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 each kind of traditional cigarette.

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 cigarettes were replaced manually. 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: diluizione in medium 1:10 del condensato tal quale e sue successive diluizioni seriali 1:2 e 1:5.

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: 1:10 dilution of undiluted condensed and further 1:2 and 1:5 dilutions in medium 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:

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

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:

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

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

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

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 $0,10\text{mg/ml} \pm 0,03$
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 $0,10\text{mg/ml} \pm 0,03$
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	0,82 (3168/20-03)	$\geq 0,2$	Conforme/ Complies
	1,08 (3169/20-03)		
Bianco/blank: Dev. Standard % / % stand. Dev.	8,12 (3168/20-03)	≤ 18	Conforme/ Complies
	12,62 (3169/20-03)		
Bianco/blank: Differenza % due colonne di bianchi/ two blank column different %	0,51 (3168/20-03)	≤ 15	Conforme/ Complies
	7,78 (3169/20-03)		
CP: IC ₅₀	0,09	0,10 mg/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.

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

Sono stati misurati i valori di pH e conducibilità 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 and conductivity 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	Conducibilità/ Conductivity mS/cm
Terreno di controllo: Valori iniziali basali/ Control medium: initial baseline values	7.5	11.5
Sigaretta tradizionale Marlboro Gold 3168/20	7.0	11.5
Sigaretta tradizionale Camel Blue 3169/20	6.8	11.5

**Sede legale
e laboratori**

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

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

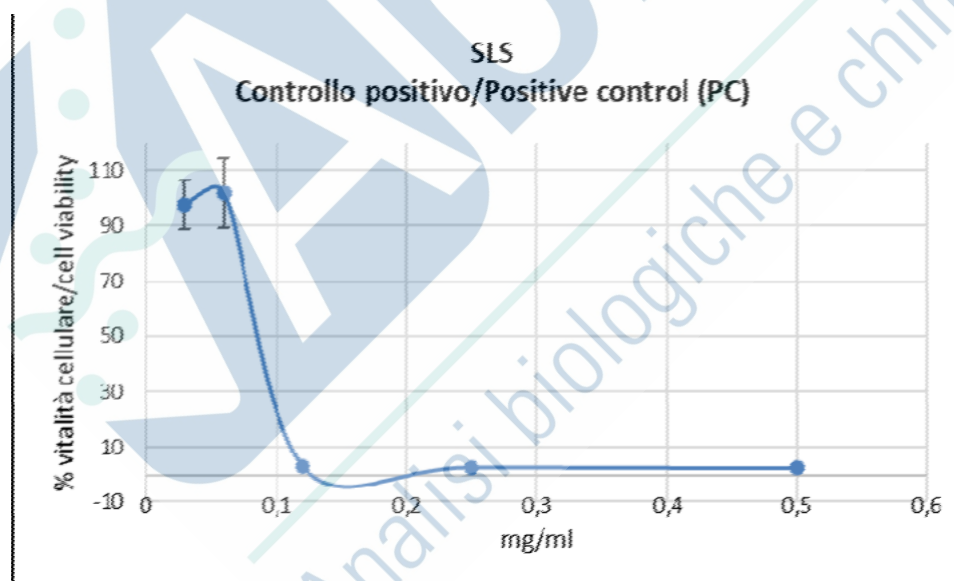
CF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici
e Cosmetologici**

Via Della Burrone 51, 20055
Vimodrone (MI), Italia
www.abich.it

Risultati/Results

SLS (controllo positivo/positive control)					
Dose mg/ml	0,50	0,25	0,13	0,06	0,03
Vitalità cellulare % % cell viability	2,62	2,89	3,32	101,72	97,69
stand. dev.	0,06	0,18	0,45	12,51	8,75
$IC_{50} = 0,09 \text{ mg/ml}$ Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime tre diluizioni testate come mostrato in tabella. A cell mortality > 30% is recorded for the first three tested dilutions as is shown in the table.					



**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

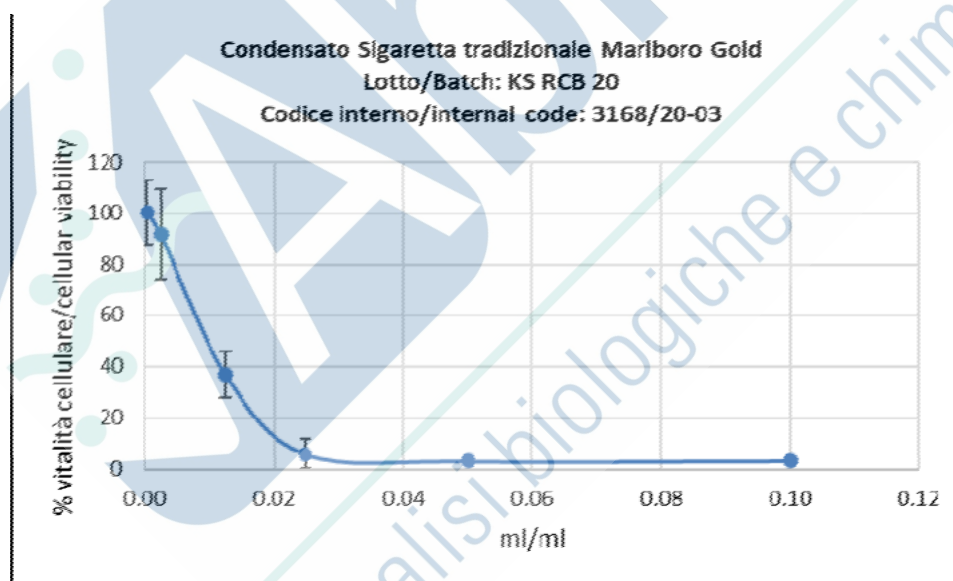
CF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

Centro Studi Clinici
e Cosmetologici

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

www.abich.it

Condensato da Sigaretta tradizionale Marlboro Gold Lotto/Batch: KS RCB 20 Codice interno/internal code: 3168/20-03						
Dose ml/ml	0,1 (1:10)	0,05 (1:20)	0,025 (1:40)	0,0125 (1:80)	0,0025 (1:400)	0,0005 (1:2000)
Vitalità cellulare % % cell viability	3,24	3,13	5,85	36,82	91,92	100,30
stand. dev.	0,39	0,30	5,80	9,07	17,58	12,46
IC₅₀ = 0,01 ml/ml Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime quattro diluizioni testate come mostrato in tabella. A cell mortality > 30% is pointed out at the first four tested dilutions as is shown in the table.						



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

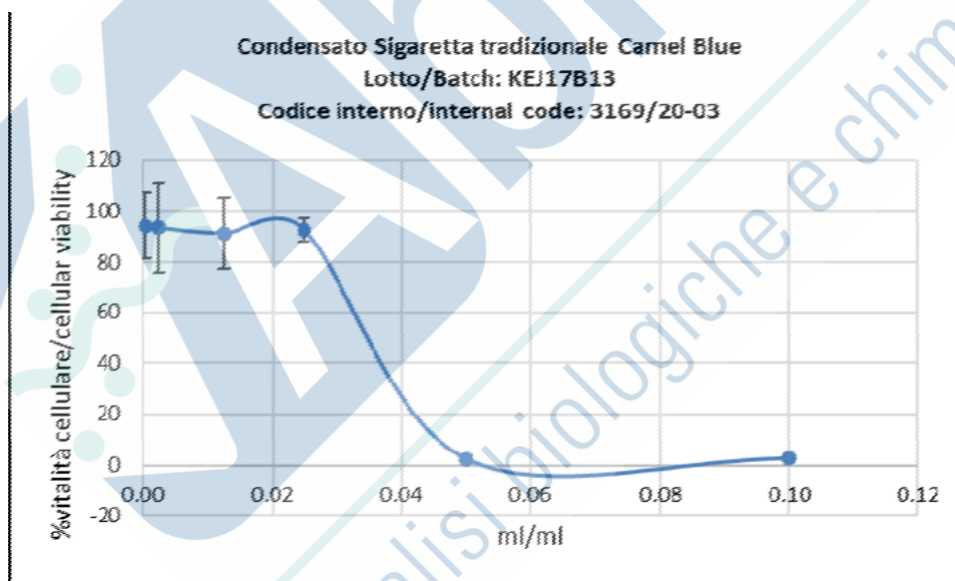
CF/VAT/Reg. Imp.
VCO: 01864020035
R.E.A: 189901
Cap. Soc. € 116.000 i.v.

**Centro Studi Clinici
e Cosmetologici**

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

www.abich.it

Condensato da Sigaretta tradizionale Camel Blue Lotto/Batch: KEJ17B13 Codice interno/internal code: 3169/20-03						
Dose ml/ml	0,1 (1:10)	0,05 (1:20)	0,025 (1:40)	0,0125 (1:80)	0,0025 (1:400)	0,0005 (1:2000)
Vitalità cellulare % % cell viability	2,73	2,43	92,61	91,31	93,41	94,25
stand. dev.	0,37	0,30	4,69	14,01	17,44	12,96
IC₅₀ = 0,04 ml/ml Viene evidenziata una mortalità cellulare > 30% alle prime due diluizioni testate come mostrato in tabella. A cell mortality > 30% is pointed out at the first two tested dilutions as is shown in the table.						



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

3.3 Conclusioni/Conclusions

Sulla base dei risultati ottenuti si può concludere che:/ On the basis of the results obtained, it can be concluded that:

La sigaretta tradizionale Marlboro Gold è risultata essere citotossica alle prime quattro concentrazioni di condensato testate con un valore di IC_{50} di 0,01 ml/ml / The traditional Marlboro Gold cigarette was found to be cytotoxic at the first four concentrations of the condensate tested with an IC_{50} value of 0.01 ml/ml.

La sigaretta tradizionale Camel Blue è risultata essere citotossica alle prime due concentrazioni di condensato testate con un valore di IC_{50} di 0,04 ml/ml / The traditional Camel Blue cigarette was found to be cytotoxic at the first two concentrations of the condensate tested with an IC_{50} value of 0.04 ml/ml.

Concentrazioni/ Concentrations	Marlboro Gold 3268/20-03	Camel Blue 3269/20-03
1:10	Citotossico / Cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:20	Citotossico / Cytotoxic	Citotossico / Cytotoxic
1:40	Citotossico / Cytotoxic	Non Citotossico / Not cytotoxic
1:80	Citotossico / Cytotoxic	Non Citotossico / Not cytotoxic
1:400	Non citotossico / Not cytotoxic	Non citotossico / Not cytotoxic
1:2000	Non citotossico / Not cytotoxic	Non citotossico / Not cytotoxic

Verbania Data/Date: 24/11/2020

Il Direttore dello Studio/ The 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 4068-20

A) DATI GREZZI/RAW DATA

SDS

Mode												
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	28/08/2020	13:01:36										
Temperature: 21.2 °C												
Dual wavelength measurement with measurement filter												
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	0,7007	0,9479	0,0602	0,0624	0,0688	0,96	0,8938	0,8501	0,8292	0,849		
C	0,6978	0,8251	0,0595	0,0604	0,062	0,7803	0,7933	0,7811	0,8444	0,8029		
D	0,4052	0,8077	0,0601	0,0626	0,0638	0,8088	0,7655	0,6824	0,6498	0,7744		
Dual wavelength measurement with reference filter												
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	0,0791	0,095	0,0403	0,0401	0,0403	0,0958	0,0917	0,0905	0,0893	0,09		
C	0,0801	0,0887	0,0404	0,0404	0,0399	0,0907	0,091	0,086	0,089	0,0872		
D	0,0621	0,0886	0,0405	0,0403	0,0402	0,0886	0,0859	0,0791	0,0787	0,0865		
Calculated difference between measurement and reference measurement												
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	0,6216	0,8529	0,0199	0,0223	0,0285	0,8642	0,8021	0,7597	0,7399	0,7591		
C	0,6177	0,7364	0,019	0,02	0,0221	0,6897	0,7023	0,6951	0,7554	0,7157		
D	0,3431	0,7191	0,0196	0,0223	0,0236	0,7202	0,6796	0,6034	0,5711	0,6879		

3168/20-03

Mode										
Measurement Wavelength										
Bandwidth										
Reference Wavelength										
Bandwidth										
Number of Flashes										
Settle Time										
Part of Plate										
Start Time	21/08/2020 12:46:51									
Temperature: 22.3 °C										
Dual wavelength measurement with measurement filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,8706	0,53	0,0676	0,0659	0,1925	0,3191	0,7041	0,8502	0,8414	0,8409
C	0,9273	0,6718	0,0643	0,0647	0,0633	0,3292	0,7971	0,7587	0,7924	0,8646
D	0,9692	1,195	0,0729	0,0659	0,0804	0,4751	1,1533	1,0427	0,9328	0,9033
E	0,907	1,1521	0,0715	0,0639	0,0642	0,3788	1,066	1,0023	0,9416	0,8668
F	0,91	0,7876	0,0671	0,0707	0,0735	0,2497	0,428	0,9927	1,0849	0,8535
G	0,9204	0,9458	0,0651	0,0705	0,0667	0,4158	0,8088	0,8565	0,8658	0,6732
Dual wavelength measurement with reference filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,0932	0,0704	0,0409	0,041	0,0488	0,0568	0,0827	0,0914	0,091	0,0918
C	0,0967	0,0822	0,0414	0,0408	0,0404	0,0584	0,0917	0,0853	0,0886	0,0924
D	0,1009	0,1168	0,0425	0,0413	0,0417	0,0692	0,1172	0,1085	0,0993	0,0956
E	0,0962	0,1212	0,0415	0,0411	0,0404	0,0617	0,1102	0,1051	0,0999	0,0931
F	0,0965	0,0914	0,0417	0,0426	0,0419	0,0543	0,0661	0,1065	0,1136	0,0925
G	0,0967	0,0986	0,0418	0,0415	0,0408	0,0635	0,0892	0,0924	0,0923	0,0805
Calculated difference between measurement and reference measurement										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,7774	0,4596	0,0267	0,0249	0,1437	0,2624	0,6214	0,7588	0,7505	0,7491
C	0,8307	0,5897	0,023	0,0239	0,0229	0,2708	0,7054	0,6735	0,7037	0,7722
D	0,8683	1,0782	0,0304	0,0245	0,0387	0,4059	1,0361	0,9343	0,8335	0,8077
E	0,8108	1,0309	0,03	0,0228	0,0237	0,3171	0,9558	0,8972	0,8417	0,7737
F	0,8136	0,6962	0,0254	0,0282	0,0315	0,1954	0,3618	0,8862	0,9713	0,7609
G	0,8237	0,8472	0,0232	0,029	0,0259	0,3523	0,7196	0,7641	0,7735	0,5927

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

3169/20-03

Mode										
Measurement Wavelength										
Bandwidth										
Reference Wavelength										
Bandwidth										
Number of Flashes										
Settle Time										
Part of Plate										
Start Time										
Temperature: 21.1 °C										
Dual wavelength measurement with measurement filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,7732	0,6912	0,0688	0,0621	0,7157	0,9899	0,9325	1,081	1,0453	1,045
C	0,9811	1,5038	0,0802	0,0695	1,0547	1,3387	1,3862	1,3127	1,2099	1,1274
D	1,0651	1,2531	0,0731	0,0725	1,0899	1,193	1,3285	1,2842	1,0995	1,0216
E	1,0123	1,3218	0,0709	0,0687	1,1546	1,1571	1,1832	1,0358	1,0843	0,9819
F	0,9564	1,3199	0,0711	0,0716	1,1699	1,0489	0,9854	1,1781	1,1153	1,0255
G	1,0442	1,0655	0,069	0,0656	0,7042	0,8795	0,945	0,9176	0,9428	0,9919
Dual wavelength measurement with reference filter										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,0859	0,0816	0,0418	0,0412	0,0836	0,1032	0,1055	0,1073	0,1055	0,1059
C	0,1025	0,1391	0,0427	0,042	0,1108	0,1232	0,1279	0,1284	0,118	0,1088
D	0,1021	0,1227	0,0434	0,043	0,11	0,1209	0,1283	0,1243	0,1116	0,1038
E	0,1033	0,1268	0,0423	0,0415	0,1177	0,1165	0,1188	0,1083	0,1087	0,1023
F	0,0992	0,1304	0,0427	0,0428	0,1162	0,1126	0,1069	0,1157	0,1135	0,1038
G	0,1045	0,105	0,0426	0,0416	0,0825	0,0933	0,0995	0,0967	0,0972	0,1009
Calculated difference between measurement and reference measurement										
<>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	0,6873	0,6095	0,0269	0,0209	0,6321	0,8866	0,827	0,9737	0,9398	0,9391
C	0,8786	1,3648	0,0375	0,0275	0,9439	1,2155	1,2583	1,1842	1,0919	1,0186
D	0,963	1,1304	0,0297	0,0295	0,9799	1,0721	1,2002	1,1599	0,9879	0,9177
E	0,909	1,1949	0,0287	0,0272	1,0369	1,0406	1,0644	0,9275	0,9756	0,8795
F	0,8572	1,1895	0,0284	0,0288	1,0537	0,9363	0,8786	1,0624	1,0018	0,9217
G	0,9397	0,9605	0,0264	0,024	0,6218	0,7861	0,8455	0,8209	0,8456	0,891

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