



Prusa Research a.s.
Partyzánská 188/7A
170 00 Praha 7

VÁŠ DOPIS

ZN.:

ZE DNE:

NAŠE ZN.:

23.11.2022

SZÚ/15973/2022; EX 221436
3/22/119

VYŘIZUJE:

TEL.:

E-MAIL:

RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.

2 6708 2327

kristina.kejlova@szu.cz

DATUM:

14.12.2022

ODBORNÝ POSUDEK ke zkoušce stanovení cytotoxicity in vitro.

PŘEDMĚT ŽÁDOSTI:

K Vaší žádosti ze dne 23.11.2022 o provedení zkoušky stanovení cytotoxicity in vitro, Vám sdělujeme:

PŘEDLOŽENÝ VZOREK:

VZ 3/22/119: Prusament Resin Flex80 Transparent Clear – post cured 60 min

Výrobce:

Prusa Research a.s.
Partyzánská 188/7A
170 00 Praha 7
Česká republika

PŘEDLOŽENÁ DOKUMENTACE:

Dokumentace nebyla předložena.

PROVEDENÉ ZKOUŠKY:

Zkouška stanovení cytotoxicity byla provedena dle SOP č. 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: 2010 Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A).

Předložený vzorek byl spotřebován na uvedené vyšetření.

ODBORNÉ POSOUZENÍ:

Zkouška byla provedena ve Zkušební laboratoři č. 1206, akreditovaná ČIA, Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti.

ZÁVĚR:

Za podmínek testu extraktu, 100% extrakt ze vzorku VZ3/22/119 je mírně cytotoxický, 50%, 25%, 10% a 5% extrakty nejsou cytotoxické.

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV
Centrum toxikologie
a zdravotní bezpečnosti
Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10


MUDr. Dagmar Jírová, CSc.
vedoucí
Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti

PŘÍLOHA:

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č. 3/22/119 – Protokol o zkoušce stanovení cytotoxicity





Státní zdravotní ústav
Centrum laboratorních činností
Laboratoře toxikologie



Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
Tel.: +420 267082439 E-mail: hana.bendova@szu.cz

Zkušební laboratoř č. 1206, akreditovaná ČIA podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č.3/22/119

Zadavatel: Prusa Polymers a.s.

Adresa: Partyzánská 188/7A, 170 00 Praha 7

Referenční číslo: SZÚ/15973/2022

Vzorek

Název:

VZ 3/22/119: Prusament Resin Flex80 Transparent Clear - post cured 60 min

Vyšetření

SOP 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: 2010 Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A)

Datum příjmu vzorku: 28.11.2022

Datum provedení zkoušky: 30.11. - 7.12.2022

Datum vyhotovení protokolu: 13.12.2022

Celkový počet stran: 5

Schválil technický vedoucí: RNDr. Hana Bendová, Ph.D.



Zkoušky byly provedeny na adrese laboratoře. Výsledky zkoušek se vztahují ke vzorku, jak byl přijat od zákazníka a týkají se pouze předmětu zkoušky. Tento protokol o zkoušce nenahrazuje jiné dokumenty ani schválení výrobku. Bez písemného souhlasu zkušební laboratoře se nesmí protokol reprodukovat jinak než celý.

PROTOKOL O ZKOUŠCE STANOVENÍ CYTOTOXICITY

Zkušební pracoviště: Laboratoře toxikologie (Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav Praha, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10).

Zkouška byla provedena dle SOP 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: 2010 Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A).

Byl proveden: test cytotoxicity extraktu z materiálu vzorku - TEST EXTRAKTU.

ZPRÁVA O PROVEDENÍ TESTU (TEST REPORT)

TESTOVANÝ VZOREK (označ. VZ)

VZ 3/22/119: Prusament Resin Flex80 Transparent Clear - post cured 60 min

Zadavatel: Prusa Polymers a.s.

Partyzánská 188/7A

170 00 Praha 7

BUNĚČNÁ LINIE

Myší fibroblasty - linie Balb/c 3T3-L1 (Evropská sbírka buněčných kultur, Velká Británie, ECACC No.86052701), pasáž 86-88, bez mykoplazmat (qPCR).

KULTIVAČNÍ MEDIUM

D-MEM (Dulbeccova modifikace minimálního esenciálního media dle Eaglea, LONZA, číslo šarže 1018146) s obsahem antibiotik (PNC 100 IU/ml, STM 100 µg/ml, LONZA, číslo šarže 21MB 041) obohacené 10% inaktivovaného telecího séra (GIBCO, číslo šarže 2199647), pH 7.2, čerstvě připravené, ne starší než 1 týden.

KONTROLY

- **POZITIVNÍ KONTROLA (PK)**

Materiál, který vyvolává reprodukovatelnou cytotoxickou reakci:

Laurylsíran sodný (SLS - Dodecyl sulfate sodium salt, SIGMA), finální koncentrace v kultivačním mediu bez séra 1, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$.

- **NEGATIVNÍ KONTROLA (NK)**

Materiál, který nevyvolává cytotoxickou reakci: Hydron - poly[(2-hydroxyethyl) methakrylát] (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha). Extrakt byl připraven v poměru 3 cm^2 plochy vzorku na 1 ml extrakčního činidla (D-MEM se sérem) dle ČSN EN ISO 10993-12

- **KONTROLA REAGENCIÍ (RK)**

Extrakční činidlo bez zkoušeného materiálu podrobené extrakčním podmínkám: Kultivační medium se sérem.

- **KONTROLA BUNĚK (K/K bez séra)**

Kultivační medium se sérem/bez séra.

METODIKA TESTU

- **PROCEDURA TESTU EXTRAKTU**

Ke kultivaci byly použity destičky s plochým dnem pro tkáňové kultury 8x12 jamek (TPP). Jako buněčný substrát sloužila buněčná linie 3T3, suspenze 10^5 buněk v 1 ml kultivačního media, inokulace 0,1 ml suspenze (1×10^4 buněk) do 1 jamky. Kultivační podmínky: 37°C, 7,5% CO_2 (inkubátor pro tkáňové kultury HERAccl). Prekultivace k získání monolayeru buněčné kultury probíhala 24 hodin před expozicí testovanému materiálu. Kultury byly založeny v kvadrupletech pro extrakty z materiálu vzorku a kontroly. U kultur založených v kvadrupletech bylo po 24 hodinové prekultivaci odstraněno kultivační medium a přidáno 0,2 ml extraktu z experimentálního vzorku, resp. jeho ředění, resp. kontrolních vzorků (PK, NK, RK, K). Následovala kultivace 24 hodin (37°C, 7,5% CO_2) a obarvení neutrální červení dle protokolu INVITTOX č. 46 (0,2 ml roztoku neutrální červeně na jamku, inkubace 3 hod, fixační roztok ethanol/kyselina octová). Po ukončení kultivace byla stanovena cytotoxicita kvantitativně (fluorimetricky) na základě inkorporace vitálního barviva (neutrální červeně).

PŘÍPRAVA EXTRAKTU

Extrakt byl připraven v poměru 3 cm^2 plochy vzorku na 1 ml extrakčního činidla (D-MEM se sérem) dle ČSN EN ISO 10993-12. Extrakce probíhala 24 hodin, při 37°C, v uzavřených kultivačních lahvích za aseptických podmínek dle ČSN EN ISO 10993-5. Extrakt byl připraven čerstvý a použit do testu do 24 hodin po ukončení extrakce. Připravený 100% extrakt byl dále ředěn kultivačním mediem se sérem.

- **STANOVENÍ CYTOTOXICITY**

Po ukončení kultivace byl zjištěn stupeň cytotoxicity (kvantitativní snížení životaschopnosti buněk) fluorimetrickou metodou. Fluorimetrická metoda stanovení cytotoxicity je založena na inkorporaci vitálního barviva (neutrální červeně) do živých buněk (neutral red uptake) a detekci fluorescence v systému excitačního (530 nm) a



emisního filtru (590 nm) při průchodu studeného světla. Pro detekci emitované fluorescence a měření fluorescenčních jednotek byl použit fluorescenčně-luminiscenční reader BioTek FLX800TBI. Stupeň cytotoxicity je vyjadřován v % detekované fluorescence v kultuře s přítomností testované látky vůči kontrolní kultuře bez přítomnosti testované látky. (Ref.: Rat, P. et al. (1994). New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. Cell Biology and Toxicology, 10, 329-337).

VÝPOČET

Při kvantitativním stanovení fluorimetrickou metodou je životnost kultury určena výpočtem:

$$\text{životnost kultury (\%)} = \frac{\text{průměr FSU vzorku} - \text{průměr FSU blanku}}{\text{průměr FSU kontroly} - \text{průměr FSU blanku}}$$

Průměrné hodnoty fluorescence vyjadřují u každé skupiny průměrnou hodnotu fluorescence ze všech čtyř jamek po odečtu průměrné hodnoty fluorescence osmi jamek s fixačním roztokem (blank). Vlastní stanovení cytotoxicity vyjadřuje procento životnosti kultury ve skupině pokusné i kontrolní (VZ, PK, RK, NK) vůči souběžné kontrole (K).

Stupeň toxicity extraktu:

životnost 70% a více.....necytotoxický
 životnost vyšší nebo rovna 50% a nižší než 70%.....mírně cytotoxický
 životnost vyšší nebo rovna 30% a nižší než 50%.....středně cytotoxický
 životnost nižší než 30%.....silně cytotoxický

VÝSLEDKY

• CYTOTOXICITA - STANOVENÍ FLUORIMETRICKY

Test č.1

Vzorek č. ředění extraktu	Fluorescence (FSU) průměr	Relativně ke kontrole % kontroly
VZ 3/22/119		
5%	4546,1	87,7
10%	4510,9	87,1
25%	4356,3	84,1
50%	4412,4	85,2
100%	2813,9	54,1
K	5181,1	100,0



PK – SLS

1 µg/ml	5094,6	95,3
10 µg/ml	857,9	16,1
20 µg/ml	275,5	5,2
K bez séra	5344,8	100,0
NK	5739,1	99,7
RK	6225,6	108,1
K	5757,9	100,0

Test č.2

Vzorek č. ředění extraktu	Fluorescence (FSU) průměr	Relativně ke kontrole % kontroly
--------------------------------------	--------------------------------------	---

VZ 3/22/119

5%	4328,3	97,0
10%	4253,8	95,3
25%	4155,3	93,1
50%	3894,8	87,2
100%	2786,3	62,4
K	4464,3	100,0

PK – SLS

1 µg/ml	3409,1	89,2
10 µg/ml	395,9	10,4
20 µg/ml	373,3	9,8
K bez séra	3821,8	100,0
NK	4425,1	97,2
RK	4300,9	94,5
K	4550,9	100,0

Zkoušku provedli: RNDr. K. Kejlová, Ph.D., J. Losová

Za provedení testu: RNDr. K. Kejlová, Ph.D.

-----konec protokolu-----
3/22/119 - 5/5

