



VÁŠ DOPIS  
ZN.:  
ZE DNE: 23.11.2022  
NAŠE ZN.: SZÚ/15973/2022; EX 221436  
3/22/118  
VYŘIZUJE: RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.  
TEL.: 2 6708 2327  
E-MAIL: kristina.kejlova@szu.cz  
DATUM: 14.12.2022

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

**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 3/22/118: Prusament Resin Biobased60 Natural Yellow – post cured 10 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.

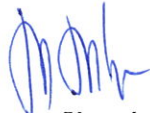
**ODBORNÉ POSOUZENÍ:**

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

**ZÁVĚR:**

**Za podmínek testu extraktu je vzorek VZ3/22/118 necytotoxický.**

**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. 3/22/118 – 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.3/22/118

Zadavatel: Prusa Polymers a.s.

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

Referenční číslo: SZÚ/15973/2022

### Vzorek

Název:

VZ 3/22/118: Prusament Resin Biobased60 Natural Yellow - post cured 10 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 3/22/118: Prusament Resin Biobased60 Natural Yellow - post cured 10 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 µg/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<sup>2</sup> 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<sup>5</sup> buněk v 1 ml kultivačního media, inokulace 0,1 ml suspenze (1 x 10<sup>4</sup> buněk) do 1 jamky. Kultivační podmínky: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> (inkubátor pro tkáňové kultury HERAcCell). 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<sub>2</sub>) 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<sup>2</sup> 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.<br>ředění extraktu | Fluorescence (FSU)<br>průměr | Relativně ke kontrole<br>% kontroly |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>VZ 3/22/118</b>           |                              |                                     |
| 5%                           | 4240,5                       | 79,1                                |
| 10%                          | 4291,0                       | 80,0                                |
| 25%                          | 4212,3                       | 78,5                                |
| 50%                          | 4036,3                       | 75,3                                |
| 100%                         | 4514,5                       | 84,2                                |
| K                            | 5363,5                       | 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   |
| <b>K bez séra</b> | 5344,8 | 100,0 |
| <b>NK</b>         | 5739,1 | 99,7  |
| <b>RK</b>         | 6225,6 | 108,1 |
| <b>K</b>          | 5757,9 | 100,0 |

**Test č.2**

| <b>Vzorek č.<br/>ředění extraktu</b> | <b>Fluorescence (FSU)<br/>průměr</b> | <b>Relativně ke kontrole<br/>% kontroly</b> |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|

**VZ 3/22/118**

|          |        |       |
|----------|--------|-------|
| 5%       | 3744,0 | 88,6  |
| 10%      | 3762,9 | 89,1  |
| 25%      | 3707,6 | 87,8  |
| 50%      | 3682,1 | 87,2  |
| 100%     | 3350,4 | 79,3  |
| <b>K</b> | 4224,6 | 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   |
| <b>K bez séra</b> | 3821,8 | 100,0 |
| <b>NK</b>         | 4425,1 | 97,2  |
| <b>RK</b>         | 4300,9 | 94,5  |
| <b>K</b>          | 4550,9 | 100,0 |

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

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

-----konec protokolu-----  
3/22/118 - 5/5

