

**COMPARATIVE ASSESSMENT OF DIMETHYL SULFOXIDE TOXICITY  
IN 2D AND 3D CULTURES OF L929 CELL LINE**

V.N. Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)

[borozenets@karazin.ua](mailto:borozenets@karazin.ua)

*Monolayer and 3D cultures (spheroids, organoids) are widely used for in vitro drug testing, production of therapeutic products, and investigation of disease mechanisms. Cryopreservation is essential for the long-term maintenance of cell lines; Dimethyl sulfoxide (DMSO) is one of the most commonly used penetrating cryoprotectants for freezing and storing cells in cryobanks. At the same time, DMSO may exhibit cytotoxicity depending on its concentration, temperature, and incubation time. Cellular sensitivity to toxic agents differs between 2D and 3D models; however, direct comparisons of DMSO resistance between suspension cells and spheroids remain scarce. The purpose of this study was to perform a comparative analysis of DMSO cytotoxicity in 2D and 3D cultures of L929 cells. Following exposure to DMSO at concentrations of 5–15%, cell adhesion, proliferation, and the proportion of cells with mitotic abnormalities were evaluated. Model-specific sensitivity was identified: at 15% DMSO, the L929 monolayer culture exhibited sublethal effects, including reduced metabolic activity, decreased expression of adhesion molecules, and epigenetic alterations; whereas L929 cell spheroids were resistant to this concentration.*

**Key words:** dimethyl sulfoxide (DMSO), 3D-culture, L929 cell line, spheroids, cytotoxicity, cryopreservation.

**Connection of the publication with planned research work.**

The research was conducted as part of the research project “Age-related features of the mechanisms of liver fibrosis formation,” state registration number 0117U004826.

**Introduction.**

Cell culture technologies contribute to the advancement of personalized medicine, regenerative therapy, and efficient drug screening. Monolayer and 3D cultures (spheroids, organoids) are widely utilized for *in vitro* drug testing, production of therapeutic products, investigation of disease development mechanisms, among other applications [1-3].

Cryopreservation is an essential step in working with cell cultures. Prolonged cell culture without this step is associated with phenotypic drift, genetic and epigenetic instability, and replicative senescence, leading to alterations in the biological properties of the culture. Cryopreservation minimizes the need for continuous passaging and other culture manipulation procedures, thereby enabling significant savings in time, labor, and consumable resources. It ensures long-term preservation of biological material, allowing for its certification, standardization, safe transportation, and use as required. The establishment of frozen stocks of valuable cell cultures substantially reduces the risk of irreversible loss of biological material due to technical failures or microbial contamination.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is one of the most widely used penetrating cryoprotectants for cell cryopreservation in both research and clinical settings. Its widespread use is attributed to its low molecular weight and amphiphilic properties, which facilitate rapid penetration across the plasma membrane and effective protection of intracellular structures during cooling and freezing [4-6].

However, despite its high cryoprotective efficacy, DMSO exhibits cytotoxicity [7-9], which depends on concentration, temperature, and incubation time. At

increasing concentrations, DMSO may alter membrane fluidity, affect cellular metabolism, and induce oxidative stress, particularly during prolonged incubation at physiological temperatures [9-12]. Therefore, investigating DMSO cytotoxicity to optimize cell cryopreservation protocols remains an important task.

In cryopreservation protocols for most cell cultures, both in monolayer and spheroid formats, DMSO is used at concentrations ranging from 5 to 10% [13-15]. However, current trends in the development of cryoprotective media emphasize reducing DMSO concentrations to below 10% [14-17]. It remains unclear whether such an approach is necessary for spheroid cryopreservation, as spheroids exhibit increased resistance to toxic substances compared with monolayer or suspended cells [18-20]. Nevertheless, direct comparative data on DMSO resistance between cells treated in suspension and spheroids are largely lacking.

For the experiments, the L929 cell line was chosen due to its ability to form spheroids [21, 22] and, in accordance with the international standard ISO 10993-5, is commonly used to assess the biocompatibility and cytotoxicity of substances [23, 24].

**The aim of the study.**

To perform a comparative analysis of the cytotoxicity of dimethyl sulfoxide in 2D and 3D cultures of the L929 cell line.

**Object and research methods.**

L929 cells were cultured in basal nutrient medium consisting of DMEM/F12 («Biowest», France) supplemented with antibiotics (200 U/mL benzylpenicillin («Arterium», Ukraine), 200 µg/mL streptomycin («Arterium», Ukraine)) and 10% FCS at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Plastic flasks («SPL Life Sciences», Korea) were used to establish monolayer cultures. The seeding density was 2 × 10<sup>5</sup> cells/mL. To prepare cell suspensions, cells were detached from the culture surface using a 1:1 mixture of 0.5% trypsin («Sigma», USA) and Versene («PAA», USA). The cells were incubated in this mixture for 5 minutes at 37°C and

subsequently washed once with DMEM/F12 medium by centrifugation to remove the enzymatic solution.

To generate spheroids, L929 cells ( $2-5 \times 10^5$  cells/mL) were seeded in basal medium in 6-well low-adhesion plates (Corning, USA). Half of the culture medium was replaced every 3 days. During the first 3 days, loose cell aggregates formed, which by day 5 became compact and assumed a rounded shape. On day 7, spheroids were collected by centrifugation and used in subsequent experiments. The diameters of the resulting spheroids ranged from 150 to 200  $\mu\text{m}$ .

For cytotoxicity assessment, DMSO solutions were prepared at concentrations of 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, and 15% using DMEM/F12 as the base medium. To 0.5 mL of cell or spheroid suspension, 0.5 mL of a solution with twice the target DMSO concentration was slowly added and incubated for 20 minutes at room temperature, followed by centrifugation ( $300 \times g$ , 5 minutes). The control group consisted of cells or spheroids subjected to all treatment procedures in culture medium without DMSO.

The adhesion capacity of cells or spheroids was assessed after seeding them in basal medium on 24-well culture plates with a standard adhesive surface (SPL Life Sciences, Korea). Twenty-four hours after seeding, the supernatant containing unattached cells or spheroids from each well was collected, centrifuged, and the number of recovered cells or spheroids was determined using a Goryaev chamber. The relative number of attached bio-objects (RNAB) was calculated using the formula:

$$\text{RNAB} = (\text{AB} - \text{UB}) / \text{AB} \times 100\%$$

where UB is the number of unattached cells/spheroids; AB is the total number of cells/spheroids.

To assess proliferative properties following incubation with DMSO, cells or spheroids were seeded in 24-well culture plates with a standard adhesive surface (SPL Life Sciences, Korea). Monolayer confluency was evaluated on day 3 as a percentage, following the method described in [25]. For this purpose, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma, USA) for 15 minutes, stained with hematoxylin-eosin, and the well bottoms were scanned using a Kyocera scanner (Japan). The area of stained monolayer regions within each well and the total well area were determined using AxioVisionRel. 4.8 software (Carl Zeiss). The relative monolayer area was calculated using the formula:

$$S_{\text{monolayer}} = \Sigma S_{\text{stained areas}} / S_{\text{well}} \times 100\%$$

For cytological analysis, cells or spheroids treated with DMSO were cultured for 2 days, after which the resulting cell monolayers were fixed in an ethanol-acetic acid mixture (1:1), sequentially immersed in ethanol solutions of 96%, 80%, and 70%, and stained with hematoxylin. Microphotography was performed using an inverted AmScope XYL403 microscope (China). Image analysis was carried out using AxioVisionRel. 4.8 software (Carl Zeiss, Germany). In each sample, the total number of cells and the number of cells exhibiting mitotic abnormalities were counted separately across 50 fields of view at  $400\times$  magnification. The result was expressed as the ratio of cells with mitotic defects to the total number of cells.

Statistical analysis was performed using Statistica 10 software (StatSoft, USA). The normality of the data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk W test. Experimental results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical differences between groups were evaluated using Student's t-test, and differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

#### Research results and their discussion.

L929 cells were incubated in suspension with varying concentrations of DMSO (**fig. 1A**). Upon transfer to 2D culture conditions (monolayer), the cells adhered to the growth surface, spread out, and began to proliferate. By day 3 of culture, a monolayer was observed, with cells exhibiting oval or polygonal shapes, containing a large nucleus and one or more nucleoli (**fig. 1B**). Light vacuoles were visible in the cytoplasm of some cells. A few cells in the field of view were undergoing mitotic division. Following incubation with different DMSO concentrations, the cells showed no morphological differences compared with the control samples.

Spheroids derived from L929 cells were incubated with different concentrations of DMSO (**fig. 1C**). Incubation did not lead to any loss of the spheroids' morphological characteristics. When the treated spheroids were placed onto an adhesive surface, they adhered, and cell migration followed by proliferation was observed (**fig. 1D**). By day 3 of culture, monolayer foci formed around the spheroids. Morphologically, the monolayer derived from spheroids was indistinguishable from that formed by seeding individual cells.

The results on the adhesion capacity of 2D and 3D cell cultures are presented in **table 1**. In intact 2D cultures, the proportion of attached cells was  $92.2 \pm 2.1\%$ , while the area of the monolayer formed by day 3 was  $94.5 \pm 4.7\%$ . For cells treated with DMSO at concentrations of 5-12.5%, these parameters did not differ significantly from the control. However, both measures were markedly reduced following incubation in medium containing 15% DMSO.

No significant effect on the adhesive properties of spheroids was observed, as the proportion of attached spheroids averaged 90-93% across all samples. Cells began migrating from the attached spheroids; consequently, by day 3 of culture, the area of the resulting monolayer was  $50.4 \pm 6.7\%$  in intact samples, which did not differ significantly from that of the DMSO-treated spheroids. Even at the highest tested DMSO concentration (15%), the area of the formed monolayer remained comparable to the control.

In the next series of experiments, the effect of DMSO incubation on the formation of mitotic abnormalities in

**Table 1 – Adhesion and proliferative properties of 2D and 3D cultures of the L929 cell line after incubation with different concentrations of DMSO**

DMSO concentration	Attached cells in 2D culture, %	Monolayer area, %	Attached spheroids in 3D culture, %	Monolayer area, %
0% (control)	$92.2 \pm 2.1$	$94.5 \pm 4.7$	$93.1 \pm 3.7$	$50.4 \pm 6.7$
5%	$96.2 \pm 6.7$	$91.9 \pm 8.5$	$92.5 \pm 4.1$	$49.5 \pm 10.8$
7.5%	$97.6 \pm 3.1$	$93.5 \pm 10.8$	$92.3 \pm 5.1$	$51.3 \pm 7.1$
10%	$95.6 \pm 4.9$	$89.1 \pm 9.8$	$93.6 \pm 6.9$	$49.7 \pm 11.9$
12.5%	$96.0 \pm 3.3$	$87.3 \pm 13.5$	$91.0 \pm 4.4$	$47.1 \pm 11.1$
15%	$72.5 \pm 11.1^*$	$70.1 \pm 5.5^*$	$90.9 \pm 5.2$	$48.9 \pm 7.9$

Note: \* – values significantly different from the intact control,  $p < 0.05$ .

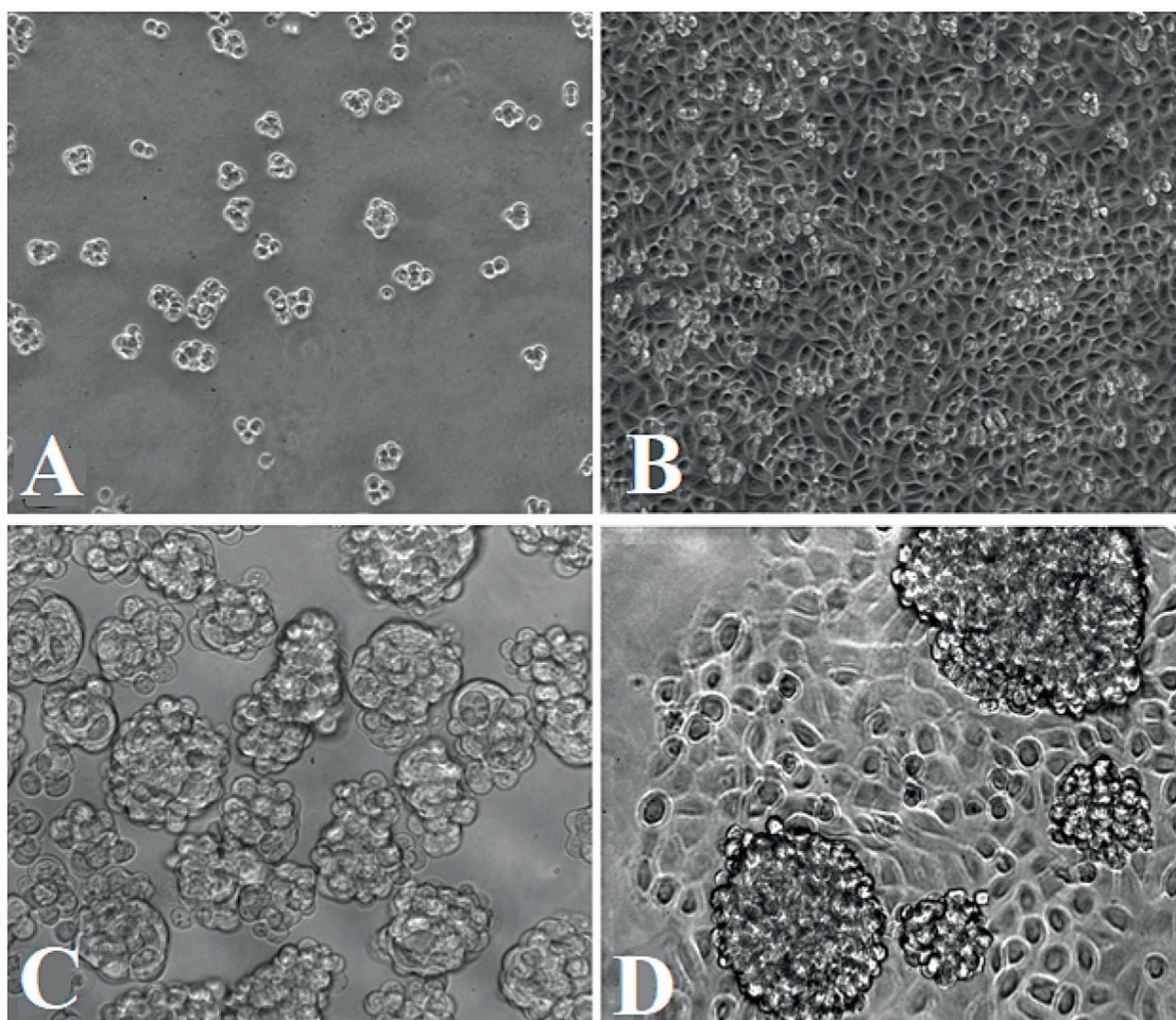


Figure 1 – Representative images of 2D and 3D cultures of the L929 cell line after incubation with DMSO (day 3 after transfer to culture conditions): A – cells in suspension following DMSO treatment; B – 2D cell culture (monolayer); C – floating spheroids after DMSO treatment; D – attached spheroids with cells migrating from them and forming a monolayer.

2D and 3D cultures of the L929 cell line was examined (fig. 2). Among the observed mitotic defects, multipolar mitoses with three or more spindle poles were the most frequent. Monopolar spindles were also present, characterized by a compact rosette-like arrangement of

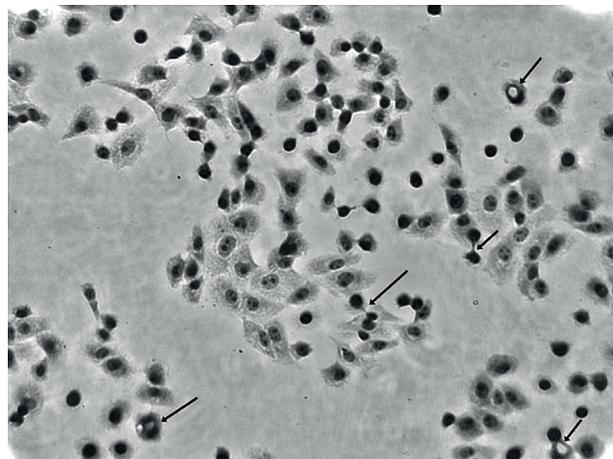


Figure 2 – Representative image of the cell culture showing mitotic defects (arrows indicate multipolar mitoses and chromosomal bridges).

condensed chromosomes surrounding a single microtubule-organizing center. In some samples, anomalies of the metaphase plate were detected, including dispersed chromosomes or chromosomes located far from the equatorial plane. Anaphase defects were frequently observed, such as chromosomal bridges and lagging chromosomes (condensed chromatin aggregates retained in the spindle midzone between separated chromosome masses). Defective cytokinesis was identified in certain fields of view by the presence of binucleated or multinucleated cells.

Cytomorphological analysis (table 2) showed that in the intact monolayer culture, an average of  $8.5 \pm 2.1\%$  of cells exhibited mitotic defects. The proportion of cells with mitotic abnormalities increased significantly to  $18.5 \pm 4.1\%$  following incubation in 15% DMSO. In the remaining samples, this parameter did not differ significantly from the control.

In the culture derived from cell migration from intact spheroids and subsequent proliferation, the proportion of cells exhibiting mitotic abnormalities was similar to that of the intact control. After treatment of spheroids with all tested DMSO concentrations, this parameter did not differ significantly.

The use of DMSO at concentrations of 5-10% for the cryopreservation of stem cells, cell lines, and multicellular constructs (spheroids, organoids, tissue-engineered constructs) is widely adopted in current protocols [13-15]. Increasing the concentration of DMSO is undesirable, as it leads to a pronounced decrease in cell viability and other biological properties [14, 26-28].

The results of this study demonstrate that L929 cells are relatively resistant to the toxic effects of DMSO, as their adhesive and proliferative properties were preserved even at concentrations up to 12.5%. In monolayer cultures of L929 cells, the cytotoxic effects of DMSO became evident at 15%, with a significant reduction in adhesive and proliferative capacities and an increase in the frequency of abnormal mitoses. The rise in mitotic defects induced by DMSO is attributed to its modulatory effect on microtubules and disruption of the mitotic spindle [29]. In contrast, 3D cultures exhibited greater resistance to DMSO-induced damage, as cells within spheroids treated with 15% DMSO retained their adhesive and proliferative properties, and the incidence of mitotic abnormalities did not increase.

Several studies have reported differences in phenotype, cell signaling, migration, and responses to toxins when the same cells are cultured under two-dimensional versus three-dimensional conditions [30]. Previous findings indicate that spheroids derived from various sources exhibit significantly higher resistance to xenobiotics than individual cells [18-20, 31]. This increased resistance is thought to result from limited substance diffusion due to extensive intercellular contacts and a dense extracellular matrix [31]. Consequently, the compact architecture of spheroids and the extracellular matrix create diffusion gradients that substantially affect the tolerance of 3D cultures to DMSO.

**Table 2 – Cytomorphological analysis of 2D and 3D cultures of the L929 cell line after incubation with different concentrations of DMSO (day 2 of culture)**

DMSO concentration	Cells with mitotic abnormalities in 2D culture, %	Cells with mitotic abnormalities in 3D culture, %
0% (control)	8,5±2,1	6,8±1,8
5%	7,5±2,0	8,5±3,2
7.5%	8,5±0,9	7,9±2,3
10%	8,9±2,5	6,5±1,4
12.5	9,4±3,1	8,8±1,5
15%	18,5±4,1*	7,4±2,1

Note: \* – values significantly different from the intact control, p<0.05.

It is well established that under monolayer conditions, cells undergo cytoskeletal rearrangements, acquiring artificial polarity, which leads to aberrant gene and protein expression [30]. In contrast, cells in 3D cultures display modified gene and protein expression and a partial shift toward a hypometabolic state [32, 33]. This heterogeneity within spheroids gives rise to distinct cellular phenotypes, which may contribute to the differing sensitivity of 2D and 3D cell cultures to xenobiotics.

**Conclusions.**

DMSO at high concentrations (15%) induces sublethal effects in monolayer cultures of the L929 cell line, including decreased metabolic activity, reduced expression of cell adhesion molecules, and epigenetic modifications. In contrast, spheroids derived from L929 cells are resistant to this concentration of DMSO.

**Prospects for further research.**

Future studies should focus on elucidating the primary mechanisms underlying the increased resistance of 3D cultures of the L929 cell line to the cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide.

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-162-171

УДК 576.32/.36.083.36:576.356

Борозенець В. В.

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ У 2D- ТА 3D-КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ЛІНІЇ L929**

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна (м. Харків, Україна)

[borozenets@karazin.ua](mailto:borozenets@karazin.ua)

Моношарові та 3D-культури (сфероїди, органоїди) широко застосовують для *in vitro* тестування ліків, виготовлення терапевтичних продуктів і вивчення механізмів захворювань. Кріоконсервування важливе для довготривалої підтримки клітинних ліній; диметилсульфоксид (ДМСО) – один із поширених проникальних кріопротекторів для заморожування та зберігання клітин у кріобанках. Водночас ДМСО може бути цитотоксичним залежно від концентрації, температури й часу інкубації. Чутливість клітин до токсичних агентів відрізняється між 2D і 3D моделями, але прямих порівнянь стійкості до ДМСО між суспензійними клітинами та сфероїдами небагато. Метою дослідження був порівняльний аналіз цитотоксичності ДМСО у 2D- і 3D-культурах клітин L929. Після обробки ДМСО в концентраціях 5-15% оцінювали адгезію, проліферацію та частку клітин із мітотичними патологіями. Встановлено специфічну чутливість моделей: при 15% ДМСО моношарова культура L929 виявляла сублетальні ефекти – зниження метаболічної активності, знижену експресію молекул адгезії та епігенетичні зміни; натомість сфероїди з клітин L929 були резистентні до цієї концентрації.

**Ключові слова:** диметилсульфоксид (ДМСО), 3D-культивування, клітини лінії L929, сфероїди, цитотоксичність, кріоконсервування.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Вікові особливості механізмів формування фіброзу печінки», номер державної реєстрації 0117U004826.

**Вступ.**

Технології клітинного культивування сприяють розвитку персоналізованої медицини, регенеративної терапії та ефективному скринінгу лікарських препаратів. Моношарові та 3D-культури (сфероїди, органоїди) широко використовуються для *in vitro* тестування ліків, виготовлення терапевтичних продуктів, вивчення механізмів розвитку захворювань тощо [1-3].

Кріоконсервування є необхідним етапом роботи з клітинними культурами. Тривале культивування клітин без цього етапу пов'язане з фенотиповим дрейфом, генетичною та епігенетичною нестабільністю та реплікативним старінням культури, що призводить до змін її біологічних властивостей. Кріоконсервування мінімізує необхідність постійного пасажування та інших процедур роботи з культурою, що сприяє суттєвій економії часу, людських та витратних ресурсів. Воно забезпечує довготривале збереження біологічного матеріалу, надає можливість його сертифікації, стандартизації, безпечного транспортування та використання за потреби. Створення заморожених резервів цінних клітинних культур значно знижує ризик незворотної втрати біологічного матеріалу внаслідок технічних збоїв або мікробного забруднення.

Диметилсульфоксид (ДМСО) є одним з широко використовуваних проникаючих кріопротекторів при кріоконсервуванні клітин як у дослідницьких, так і в клінічних цілях. Його широке застосування обумовлено низькою молекулярною масою та амфільними властивостями, що забезпечує швидке проникнення крізь плазматичну мембрану та ефективний захист внутрішньоклітинних структур під час охолодження та заморожування [4-6].

Однак незважаючи на високу кріозахисну ефективність ДМСО, цей кріопротектор проявляє цитотоксичність [7-9], яка залежить від концентрації, температури та часу інкубації. При підвищенні концентрації ДМСО може змінювати плинність мембран, впливати на клітинний метаболізм та викликати окислювальний стрес, особливо при тривалій інкубації при фізіологічних температурах [9-12]. Отже, вивчення токсичності ДМСО для оптимізації протоколів кріоконсервування клітин є актуальною задачею.

У протоколах кріоконсервування більшості клітинних культур як у вигляді моношару, так й у вигляді сфероїдів, ДМСО використовується у концентраціях від 5 до 10% [13-15]. Однак сучасні тенденції у розробці кріозахисних середовищ для клітин полягають у редукції концентрації ДМСО нижче 10% [14-17]. Остаточно неясно, чи потребується такий підхід для кріоконсервування сфероїдів, оскільки вони демонструють підвищену стійкість до токсичних речовин порівняно з моношаром або суспендованими клітинами [18-20]. Однак прямі порівняльні дані щодо стійкості до ДМСО клітин, оброблених у суспензії порівняно зі сфероїдами практично відсутні.

Для проведення експериментів було обрано клітинну лінію L929, яка має властивості утворювати сфероїди [21, 22] та відповідно до міжнародного стандарту ISO 10993-5 використовується для оцінки біосумісності та цитотоксичності речовин [23, 24].

**Мета дослідження.**

Провести порівняльний аналіз цитотоксичності диметилсульфоксиду у 2D- та 3D-культурах клітин лінії L929.

**Об'єкт і методи дослідження.**

Клітини лінії L929 культивували у базовому живильному середовищі, яке містило DMEM/F12 («Biowest», Франція) з додаванням антибіотиків (200 Од/МП бензилпеніциліну («Arterium», Україна), 200 мкг/мл стрептоміцину («Arterium», Україна) та 10% ФТС при 37°C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Для отримання моношарової культури використовували пластикові флакони («SPL Life Sciences», Корея). Посівна концентрація клітин для отримання культури становила 2×10<sup>5</sup> кл/мл. Для отримання суспензії клітини відкріпляли від поверхні культивування шляхом обробки сумішшю (1:1) 0,5% трипсину («Sigma», США) та Версену («РАА», США). Витримували 5 хвилин при температурі 37°C та відмивали одноразово від ферментного розчину середовищем DMEM/F12 шляхом центрифугування.

Для отримання сфероїдів клітини L929 (2-5×10<sup>5</sup> клітин/мл) висівали на базовому середовищі у 6-лункові планшети з низькою адгезією (Corning, США). Половину живильного середовища змінювали кожні 3 доби. У перші 3 доби спостерігалось утворення пухких агрегатів клітин, після чого на 5 добу вони ущільнювалися та набували округлої форми. На 7 добу сфероїди збирали центрифугуванням та використовували у подальших експериментах. Діаметр одержаних сфероїдів становив 150-200 мкм.

Для вивчення цитотоксичності готували розчини ДМСО в концентраціях 5%; 7,5%; 10; 12,5%; 15% на основі середовища DMEM/F12. До 0,5 мл суспензії клітин або сфероїдів повільно додавали 0,5 мл розчину з подвійною концентрацією ДМСО та витримували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі, після чого здійснювали центрифугування (300 g, 5 хв). Контролем були клітини або сфероїди, які були піддані усім процедурам обробки у живильному середовищі без ДМСО.

Здатність клітин або сфероїдів до адгезії визначали після посіву їх на базове середовище у 24-лункові культуральні планшети зі стандартною адгезивною поверхнею (SPL Life Sciences, Корея). Через 24 год після посіву з кожної лунки зібрали надосадок з клітинами або сфероїдами, що не прикріпилися, центрифугували та за допомогою камери Горяєва визначали кількість отриманих клітин або сфероїдів. Відносну кількість прикріплених біооб'єктів (ВКПБ) вираховували за формулою:

$$\text{ВКПБ} = (\text{ЗБ-НБ})/\text{ЗБ} \times 100\%$$

де НБ – кількість неприкріплених клітин/сфероїдів; ЗС – загальна кількість клітин/сфероїдів.

Для оцінки проліферативних властивостей після інкубації з ДМСО клітини або сфероїди висівали у 24-лункові культуральні планшети зі стандартною адгезивною поверхнею (SPL Life Sciences, Корея). Конфлюентність моношару оцінювали на 3 добу у відсотках за методом [25]. Для цього клітини фіксували у

4% розчині параформальдегіду (Sigma, США) впродовж 15 хв, забарвлювали гематоксином-еозином та сканували дно планшету на сканері Kyosera (Японія). Площу забарвлених ділянок моношару в лунці та загальну площу лунки визначали за допомогою програми «AxioVisionRel. 4.8» («CarlZeiss»). Відносну площу моношару розраховували за формулою:

$$S \text{ моношару} = \frac{\sum S \text{ забарвлених ділянок}}{S \text{ лунки}} \times 100\%$$

Для цитологічного аналізу проводили культивування оброблених ДМСО клітин або сфероїдів впродовж 2 діб, після чого утворені клітинні моношари фіксували у суміші етаноловий спирт-оцет (1:1), поспідовно занурювали у етанолові розчини (96%, 80%, 70%) та забарвлювали гематоксином. Мікроскофото знімали за допомогою інвертованого мікроскопу AmScope XYL-403 (КНР). Аналіз проводили за мікросфотографіями з використанням програми «AxioVisionRel. 4.8» (CarlZeiss, Німеччина). У кожному зразку у 50 полях зору на збільшенні  $\times 400$  підраховували загальну кількість клітин та окремо клітини з патологіями поділу. Результат визначали як відношення кількості клітин з дефектами мітозу до загальної кількості клітин.

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica 10 («StatSoft», США). Нормальність розподілу визначали за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлка. Результати експериментів представлені у вигляді середнього значення  $\pm$  стандартне відхилення. Статистичну значимість відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

#### Результати дослідження та їх обговорення.

Клітин лінії L929 інкубували у суспензії з різними концентраціями ДМСО (рис. 1А). Після приміщення їх до умов культивування в 2D-форматі (моношар) вони прикріплювалися до ростової поверхні, розпластувалися та починали проліферувати. На 3 добу культивування спостерігався моношар, клітини якого мали овальну або полігональну форму з крупним ядром та одним або декількома ядерцями (рис. 1Б). У цитоплазмі деяких клітин розрізнялися світлі вакуолі. У полі зору спостерігалися деякі клітини у стані мітотичного поділення. Після інкубації з різними концентраціями ДМСО клітини морфологічно не відрізнялися у порівнянні з контрольними зразками.

Сфероїди, отримані з клітин лінії L929, інкубували з різними концентраціями ДМСО (рис. 1В). Інкубація не призводила до втрати морфологічних особливостей сфероїдів. Після приміщення оброблених сфероїдів на адгезивну поверхню, вони прикріплювалися. З них починалася міграція клітин та подальша їх проліферація (рис. 1Г). На 3 добу культивування спостерігалось утворення осередків моношару навколо сфероїдів. Морфологічно, моношар, зформований зі сфероїдів, не відрізнявся від моношару, який формувался при посіві поодиноких клітин.

Результати щодо вивчення здібності 2D- та 3D-культур клітин до адгезії продемонстровано у таблиці 1. Кількість прикріплених клітин в інтактній 2D-культурі

була  $92,2 \pm 2,1\%$ , тоді як площа сформованого на 3 добу моношару становила  $94,5 \pm 4,7\%$ . Для клітин, оброблених концентраціями ДМСО від 5 до 12,5%, ці показники значуще не змінювалися порівняно з контролем. Однак помітно, що вони були значуще менше після інкубації у середовищі з 15% ДМСО.

Значного впливу на адгезивні властивості сфероїдів не було виявлено, оскільки кількість прикріплених сфероїдів становила від 90 до 93% в середньому в усіх вивчених зразках. З прикріплених сфероїдів починали мігрувати клітини, отже на 3 добу культивування площа сформованого моношару становила  $50,4 \pm 6,7\%$  в інтактних зразках, що значуще не відрізнялося від оброблених ДМСО сфероїдів. Навіть у найвищій використаній концентрації ДМСО (15%) площа сформованого моношару не відрізнялася від контрольних значень.

У наступній серії експериментів вивчено вплив інкубації з ДМСО на формування патологій поділу в 2D- та 3D-культурах клітин лінії L929 (рис. 2). Серед дефектів мітозу найчастіше зустрічалися мультиполярні мітози з трьома або більше полюсами веретена поділу. У зразках також були присутні монополярні веретена поділу, представлені як компактне розеткоподібне розташування конденсованих хромосом, що оточували один центр організації мікротрубочок. У деяких зразках виявлялися аномалії метафазної пластинки у вигляді розсіяних хромосом або хромосом, які були розташовані далеко від екваторіальної площини. Часто були присутні аномалії анафази – хромосомні мости і хромосоми, що відстають (конденсовані хроматинові агрегати, що зберігалися в середній зоні веретена поділу між розділеними масами хромосом). Дефектний цитокінез ідентифікувався у деяких полях зору за наявністю двоядерних або багатоядерних клітин.

Цитоморфологічний аналіз показав (таблиця 2), що в інтактній моношаровій культурі в середньому  $8,5 \pm 2,1\%$  клітин мають мітотичні дефекти. Кількість клітин з дефектам мітозу значуще зростала до  $18,5 \pm 4,1\%$  після інкубації у розчинах з ДМСО в концентрації 15%. У решті зразків цей показник значуще не відрізнявся від контролю.

У культурі, отриманої після міграції клітин з інтактних сфероїдів та їх проліферації, кількість клітин з патологією мітозу була подібною до інтактного контролю. Після обробки сфероїдів з усіма використаними концентраціями ДМСО цей показник значуще не змінювався.

Застосування ДМСО у концентраціях від 5 до 10% для криоконсервування стовбурових клітин, клітинних

Таблиця 1 – Адгезивні та проліферативні властивості 2D- та 3D-культур клітин лінії L929 після інкубації з різними концентраціями ДМСО

Концентрація ДМСО	Кількість прикріплених клітин у 2D-культурі, %	S моношару, %	Кількість прикріплених сфероїдів у 3D-культурі, %	S моношару, %
0% (контроль)	92.2±2.1	94.5±4.7	93.1±3.7	50.4±6.7
5%	96.2±6.7	91.9±8.5	92.5±4.1	49.5±10.8
7.5%	97.6±3.1	93.5±10.8	92.3±5.1	51.3±7.1
10%	95.6±4.9	89.1±9.8	93.6±6.9	49.7±11.9
12.5	96.0±3.3	87.3±13.5	91.0±4.4	47.1±11.1
15%	72.5±11.1*	70.1±5.5*	90.9±5.2	48.9±7.9

Примітка: \* – дані значущі в порівнянні з інтактним контролем,  $p < 0,05$ .

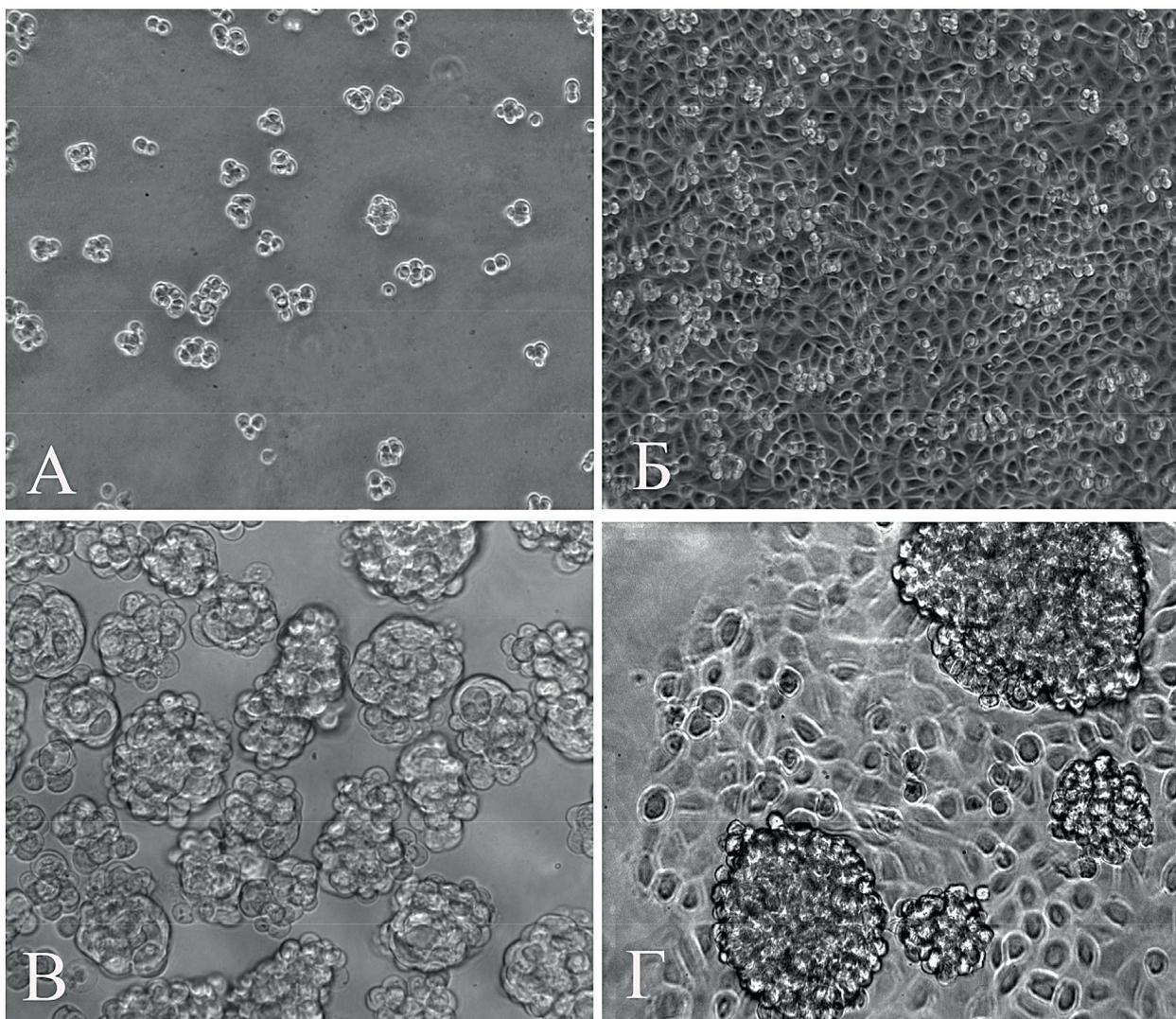


Рисунок 1 – Репрезентативні фотографії 2D- та 3D-культур клітин лінії L929 після інкубації з ДМСО (третя доба після приміщення в умови культивування): А – клітини у суспензії після обробки ДМСО; Б – 2D-культура клітин (моношар); В – флотуючі сфероїди після обробки ДМСО; Г – прикріплені сфероїди з клітинами, що мігрують з них та формують моношар.

ліній, багатоклітинних об'єктів (сфероїдів, органоїдів, тканино-інженерних біоконструкцій) є широко поширеним у сучасних протоколах [13-15]. Підвищення концентрації ДМСО є небажаним, оскільки призводить до різкого падіння життєздатності та інших біологічних властивостей клітин [14, 26-28].

Таблиця 2 – Цитоморфологічний аналіз 2D- та 3D-культур клітин лінії L929 після інкубації з різними концентраціями ДМСО (2 доба культивування)

Концентрація ДМСО	Кількість клітин з дефектами мітозу у 2D-культурі, %	Кількість клітин з дефектами мітозу у 3D-культурі, %
0% (контроль)	8,5±2,1	6,8±1,8
5%	7,5±2,0	8,5±3,2
7,5%	8,5±0,9	7,9±2,3
10%	8,9±2,5	6,5±1,4
12,5	9,4±3,1	8,8±1,5
15%	18,5±4,1*	7,4±2,1

Примітка: \* – дані значущі в порівнянні з інтактним контролем,  $p < 0,05$ .

Наведені у цьому дослідженні результати демонструють, що клітини лінії L929 є досить стійкими до токсичної дії ДМСО, оскільки адгезивні та проліферативні властивості їх зберігалися навіть при підвищенні концентрації до 12,5%. Для моношарової культури клі-

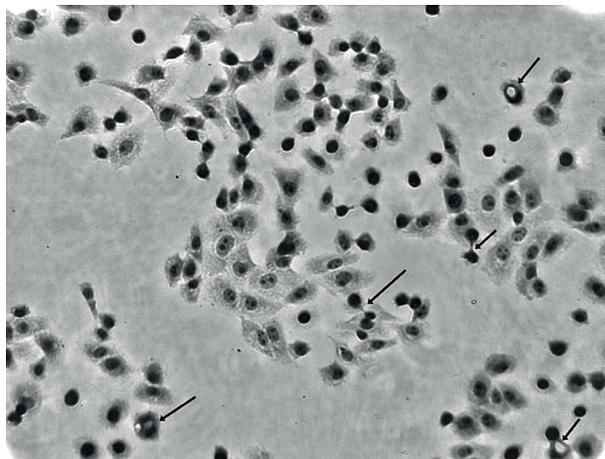


Рисунок 2 – Репрезентативна фотографія культури клітин з дефектами мітозу (стрілками позначено мультиполярні мітози та хромосомні мости).

тин лінії L929 цитотоксична дія ДМСО проявлялася у концентрації 15%. При цьому спостерігалось значуще зниження адгезивних та проліферативних властивостей клітин, а також підвищувалася кількість дефектних мітозів. Збільшення кількості патологічних мітозів під впливом ДМСО обумовлено його модифікуючим ефектом на мікротрубочки та порушенням веретена поділу [29]. При цьому 3D-культура виявилася більш стійкою до пошкоджуючої дії ДМСО порівняно з моношаровою, оскільки після обробки сфероїдів навіть у концентрації 15%, клітини не втрачали адгезивних та проліферативних властивостей, рівень патологій поділу не підвищувався.

Існує низка досліджень, які описують відмінності у фенотипі, клітинній сигналізації, міграції клітин та реакціях на токсини, коли ті самі клітини вирощуються в умовах двовимірної або тривимірної культури [30]. Попередні дані свідчать, що сфероїди, отримані з різних джерел, демонструють значно вищу резистентність до ксенобіотиків, ніж поодинокі клітини [18-20, 31]. Передбачається, що це відбувається завдяки обмеженню дифузії речовин внаслідок розвинених міжклітинних контактів та щільного позаклітинного матриксу [31]. Отже, компактна архітектура сфероїдів та міжклітинний матрикс створюють градієнти дифузії,

що суттєво впливає на толерантність 3D-культури до ДМСО.

Відомо, що у моношарових умовах клітини зазнають перебудови цитоскелета, досягаючи штучної полярності, що призводить до неприродної експресії генів та білків [30]. На відміну від цього, клітини у 3D-культури демонструють модифікацію експресії генів та білків, а також частковий перехід до гіпометаболічного стану [32, 33]. Подібна гетерогенність у сфероїдах призводить до появи різних клітинних фенотипів, що також може призводити до різної чутливості 2D- та 3D-культур клітин до ксенобіотиків.

#### Висновки.

ДМСО у високих концентраціях (15%) викликає сублетальні ефекти у моношаровій культурі клітин лінії L929, включаючи зниження метаболічної активності, експресії молекул клітинної адгезії та епігенетичні зміни. На відміну від цього, сфероїди, сформовані з клітин L929, є резистентними до такої концентрації ДМСО.

#### Перспективи подальших досліджень.

У подальших дослідженнях актуальним є визначення основних механізмів, які лежать в основі феномену підвищення резистентності 3D-культури клітин лінії L929 до цитотоксичної дії диметилсульфоксиду.

### References / Література

- Sharma K, Dey S, Karmakar R, Rengan AK. A comprehensive review of 3D cancer models for drug screening and translational research. *Cancer Innov.* 2023;3(1):e102. DOI: [10.1002/cai2.102](https://doi.org/10.1002/cai2.102).
- Wei F, Wang S, Gou X. A review for cell-based screening methods in drug discovery. *Biophys Rep.* 2021;7(6):504-516. DOI: [10.52601/bpr.2021.210042](https://doi.org/10.52601/bpr.2021.210042).
- Cardoso BD, Castanheira EMS, Lanceros-Méndez S, Cardoso VF. Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. *Advanced healthcare materials.* 2023;12(18):e2202936. DOI: [10.1002/adhm.202202936](https://doi.org/10.1002/adhm.202202936).
- Jandová M, Meřička P, Gregor J, Lánská M, Bezrouk A, Čížková D, et al. Post-thaw dimethyl sulfoxide reduction in autologous peripheral blood progenitor cell suspensions. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2025;47(4):103965. DOI: [10.1016/j.htct.2025.103965](https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.103965).
- Valeri CR, Pivacek LE. Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion.* 1996;36(4):303-308. DOI: [10.1046/j.1537-2995.1996.36496226141.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1996.36496226141.x).
- Cilloni D, Garau D, Regazzi E, Sammarelli G, Savoldo B, Caramatti C, et al. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing. *Bone marrow transplantation.* 1999;23(5):497-503. DOI: [10.1038/sj.bmt.1701601](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701601).
- Kaushal R, Jahan S, McGregor C, Pineault N. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation solutions for hematopoietic stem cell grafts. *Cytotherapy.* 2022;24(3):272-281. DOI: [10.1016/j.jcyt.2021.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.09.002).
- Ehn K, Wikman A, Uhlín M, Sandgren P. Cryopreserved platelets in a non-toxic DMSO-free solution maintain hemostatic function in vitro. *Int J Mol Sci.* 2023;24(17):13097. DOI: [10.3390/ijms241713097](https://doi.org/10.3390/ijms241713097).
- Sangweni NF, Dlodla PV, Chellan N, Mabasa L, Sharma JR, Johnson R. The implication of low dose dimethyl sulfoxide on mitochondrial function and oxidative damage in cultured cardiac and cancer cells. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2021;26(23):7305. DOI: [10.3390/molecules26237305](https://doi.org/10.3390/molecules26237305).
- Pakhomov O, Posokhov Y, Volkova N, Chernobai N, Bozhok G. Effects of cryoprotective agents on osmotic tolerance limit of testicular interstitial cells. *Biophysical Bulletin.* 2025;53:18-33. DOI: [10.26565/2075-3810-2025-53-02](https://doi.org/10.26565/2075-3810-2025-53-02).
- Giugliarelli A, Urbanelli L, Ricci M, Paolantoni M, Emiliani C, Saccardi R, et al. Evidence of DMSO-induced protein aggregation in cells. *The journal of physical chemistry.* 2016;120(27):5065-5070. DOI: [10.1021/acs.jpca.6b0178](https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b0178).
- Ding Y, Liu S, Liu J, Jin S, Wang J. Cryopreservation with DMSO affects the DNA integrity, apoptosis, cell cycle and function of human bone mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* 2024;114:104847. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2024.104847](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104847).
- Mitrus I, Smagur A, Fidyk W. Reduction of DMSO concentration in cryopreservation mixture from 10% to 7.5% and 5% has no impact on engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation: results of a prospective, randomized study. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53:274-280. DOI: [10.1038/s41409-017-0056-6](https://doi.org/10.1038/s41409-017-0056-6).
- Bennett B, Hanotaux J, Pasala AR, Hasan T, Hassan D, Shor R, et al. Impact of lower concentrations of dimethyl sulfoxide on cryopreservation of autologous hematopoietic stem cells: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical studies. *Cytotherapy.* 2024;26(5):482-489. DOI: [10.1016/j.jcyt.2024.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.02.006).
- Erol OD, Pervin B, Seker ME, Aerts-Kaya F. Effects of storage media, supplements and cryopreservation methods on quality of stem cells. *World J Stem Cells.* 2021;13(9):1197-1214. DOI: [10.4252/wjsc.v13.i9.1197](https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i9.1197).
- Ekpo MD, Bofo GF, Xie J, Liu X, Chen C, Tan S. Strategies in developing dimethyl sulfoxide (DMSO)-free cryopreservation protocols for biotherapeutics. *Front Immunol.* 2022;13:1030965. DOI: [10.3389/fimmu.2022.1030965](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1030965).
- Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity?. *Regenerative medicine.* 2020;15(3):1463-1491. DOI: [10.2217/rme-2019-0145](https://doi.org/10.2217/rme-2019-0145).
- Goodman TT, Ng CP, Pun SH. 3-D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers. *Bioconjug Chem.* 2008;19(10):1951-9. DOI: [10.1021/bc800233a](https://doi.org/10.1021/bc800233a).
- Dubois C, Dufour R, Daumar P, Aubel C, Szczepaniak C, Blavignac C, et al. Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget.* 2017;8(56):95316-95331. DOI: [10.18632/oncotarget.20517](https://doi.org/10.18632/oncotarget.20517).
- Mikhail AS, Eetezadi S, Allen C. Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines in vitro: a comparison of docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere®. *PLoS one.* 20138(4): e62630. DOI: [10.1371/journal.pone.0062630](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062630).

21. Ehrhart F, Schulz JC, Katsen-Globa A, Shirley SG, Reuter D, Bach, et al. A comparative study of freezing single cells and spheroids: Towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology*. 2009;58(2):119-127. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2008.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.005).
22. Moisieiev AI, Bozhok HA, Horina OL. Porivnialna kharakterystyka tryvymirnoho ta monosharovooho kultyvuvannia pereshcheplivuvanoi linii fibroblastiv L929. *Dopovidi Natsionalnoi akademii nauk Ukrainy*. 2019;(8):93-101. DOI: [10.15407/dopovidi2019.08.093](https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.08.093). [in Ukrainian]
23. Cannella V, Altomare R, Chiaramonte G, Di Bella S, Mira F, Russotto L, et al. Cytotoxicity evaluation of endodontic pins on L929 cell line. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3469525. DOI: [10.1155/2019/3469525](https://doi.org/10.1155/2019/3469525).
24. Sharma M, Sharma R, Jain DK. Nanotechnology based approaches for enhancing oral bioavailability of poorly water soluble antihypertensive drugs. *Scientifica*. 2016;2016:8525679. DOI: [10.1155/2016/8525679](https://doi.org/10.1155/2016/8525679).
25. Plaksina EM, Sidorenko OS, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2017;27(4):322-333. DOI: [10.15407/cryo27.04.322](https://doi.org/10.15407/cryo27.04.322).
26. Tamarina IV, Bozhok GA, Gurina TM, Gubina NF, Bondarenko TP. Cryopreservation of newborn mice adrenal cell suspension. II. Effect caused by concentration of serum as component of cryoprotective medium. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2013;22(1):66-74.
27. Siddiqui M, Parvin R, Giasuddin M, Chowdhury S, Islam M, Chowdhury E. The effect of different concentrations of Dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol as cryoprotectant in preserving Vero cells. *Bangladesh Veterinarian*. 2017;33(1):1-7. DOI: [10.3329/bvet.v33i1.33307](https://doi.org/10.3329/bvet.v33i1.33307).
28. Meyer TP, Hofmann B, Zaisserer J, Jacobs VR, Fuchs B, Rapp S, et al. Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytherapy*. 2006;8(3):265-276. DOI: [10.1080/14653240600735685](https://doi.org/10.1080/14653240600735685).
29. Li X, Wang YK, Song ZQ, Du ZQ, Yang CX. Dimethyl sulfoxide perturbs cell cycle progression and spindle organization in porcine meiotic oocytes. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158074. DOI: [10.1371/journal.pone.0158074](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158074).
30. Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*. 2006;42(8-9):242-247. DOI: [10.1290/0604027.1](https://doi.org/10.1290/0604027.1).
31. Ncube KN, van den Bout I, Willers C, Gouws C, Cordier W. Utility of multicellular spheroids for investigating mechanisms of chemoresistance in triple-negative breast cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 2025;26:7503. DOI: [10.3390/ijms26157503](https://doi.org/10.3390/ijms26157503).
32. Delarue M, Montel F, Vignjevic D, Prost J, Joanny JF, Cappello G. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical Journal*. 2014;107(8):1821-1828. DOI: [10.1016/j.bpj.2014.08.031](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.031).
33. Pradhan S, Sperduto JL, Farino CJ, Slater JH. Engineered in vitro models of tumor dormancy and reactivation. *J Biol Eng*. 2018;12:37. DOI: [10.1186/s13036-018-0120-9](https://doi.org/10.1186/s13036-018-0120-9).

### ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДУ У 2D- ТА 3D-КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ЛІНІЇ L929

**Борозенець В. В.**

**Резюме.** Моношарові та 3D-культури (сфероїди, органоїди) широко використовуються для *in vitro* тестування лікарських препаратів, виготовлення терапевтичних продуктів, вивчення механізмів розвитку захворювань тощо. Кріоконсервування є важливим етапом довготривалої підтримки клітинних ліній. Диметилсульфоксид (ДМСО) є одним з популярних проникальних кріопротекторів для заморожування та довготривалого зберігання клітинних культур у кріобанках. Однак ця речовина проявляє цитотоксичність, яка залежить від концентрації, температури та часу інкубації. Відомо, що в залежності від типу культури (2D або 3D) чутливість клітин до токсичних агентів може змінюватися. Однак прямі порівняльні дані щодо стійкості до ДМСО клітин, оброблених у суспензії порівняно зі сфероїдами практично відсутні. Метою роботи було провести порівняльний аналіз цитотоксичності диметилсульфоксиду у 2D- та 3D-культурах клітин лінії L929. Після обробки ДМСО у концентраціях від 5 до 15% у 2D- та 3D-культурах вивчали здібність клітин до адгезії та проліферації, а також кількість клітин з патологіями мітозу. Встановлено, що обрані моделі культивування продемонстрували специфічну чутливість до дії ДМСО. У високих концентраціях (15%) ДМСО викликав сублетальні ефекти у моношаровій культурі клітин лінії L929, включаючи зниження метаболічної активності, експресії молекул клітинної адгезії та епігенетичні зміни. На відміну від цього, сфероїди, сформовані з клітин L929, були резистентними до такої концентрації ДМСО.

**Ключові слова:** диметилсульфоксид (ДМСО), 3D-культивування, клітини лінії L929, сфероїди, цитотоксичність, кріоконсервування.

### COMPARATIVE ASSESSMENT OF DIMETHYL SULFOXIDE TOXICITY IN 2D AND 3D CULTURES OF L929 CELL LINE

**Borozenets V. V.**

**Abstract.** Monolayer and 3D-cultures (spheroids, organoids) are widely used for *in vitro* testing of drugs, production of therapeutic products, study of mechanisms of disease development etc. Cryopreservation is an important stage of long-term support of cell lines. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is one of the popular penetrating cryoprotectants for freezing and long-term storage of cell cultures in cryobanks. However, this substance exhibits cytotoxicity that depends on the concentration, temperature, and incubation time. It is known that depending on the type of culture (2D or 3D), the sensitivity of cells to toxic agents can change. However, direct comparative data on the resistance to DMSO of cells processed in suspension compared to spheroids are practically absent. The aim of the work was to conduct a comparative analysis of the cytotoxicity of dimethyl sulfoxide in 2D and 3D cultures of cells of the L929 line. After treatment with DMSO in concentrations from 5 to 15% in 2D and 3D cultures, the ability of cells to adhere and proliferate, as well as the number of cells with mitotic defects, was studied. It was established that the selected cultivation models demonstrated specific sensitivity to DMSO. In high concentrations (15%), DMSO released sublethal effects in a monolayer culture of L929 cells, including a decrease in metabolic activity, expression of cell adhesion molecules, and epigenetic changes. In contrast, spheroids formed from L929 cells were resistant to this concentration of DMSO.

**Key words:** dimethyl sulfoxide (DMSO), 3D-culture, L929 cell line, spheroids, cytotoxicity, cryopreservation.

### ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Borozenets V. V.: <https://orcid.org/0000-0002-3631-2466> <sup>ABCDEF</sup>

### Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Borozenets Viktoriia Viktorivna / Борозенець Вікторія Вікторівна

V.N. Karazin Kharkiv National University / Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна  
Ukraine, 61022, Kharkiv, 6 Svobody Square / Україна, 61022, м. Харків, майдан Свободи 6  
Tel.: +380976295237 / Тел.: +380976295237  
E-mail: [borozenets@karazin.ua](mailto:borozenets@karazin.ua)

**A** – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 29.09.2025 / Стаття надійшла 29.09.2025 року  
Accepted 09.02.2026 / Стаття прийнята до друку 09.02.2026 року  
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-171-181

UDC 678.744.7:612.111.014.43:57.086.13

Hvozdiuk Ya. V., Seliuta A. A., Poliakova H. L., Gurina T. M.

## USE OF POLYVINYL ALCOHOL AS A COMPONENT OF CRYOPRESERVATIVE SOLUTION TO CRYOPRESERVE HUMAN ERYTHROCYTES

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

[poliakova79ann@gmail.com](mailto:poliakova79ann@gmail.com)

*Cryopreservation of erythrocytes is the main method for long-term storage of blood cell components, but the effectiveness of this process is limited by damage caused by the formation and recrystallization of ice crystals. A promising approach to reducing cryodamage is the use of macromolecular impermeable cryoprotectants, in particular polyvinyl alcohol (PVA). The aim of the study was to investigate the effect of PVA with a molecular weight of 9 kDa at different concentrations on ice recrystallization processes and to evaluate its effectiveness in cryopreserving human erythrocytes. The study's objective was to examine human erythrocytes obtained from donor blood. PVA solutions in phosphate-saline buffer at concentrations ranging from 0.1 to 1.5% were used. Phase transformations and ice recrystallization were studied using thermomechanical analysis. The cryopreservation modes used differed in cooling rates and had the same heating rate. The preservation of human erythrocytes was assessed by hemolysis levels. It was found that an increase in PVA concentration contributes to the effective inhibition of ice recrystallization, and at a concentration of about 1%, this process is almost completely suppressed. It was shown that uncontrolled cooling leads to complete erythrocyte hemolysis. The best cell preservation was achieved with slow, controlled cooling at 3 degrees/min in a 1% PVA solution. Polyvinyl alcohol exhibits cryoprotective activity and is a promising component of cryopreservation media for human erythrocytes under slow, controlled cooling conditions.*

**Key words:** cryopreservation, phase transition, ice recrystallization, polyvinyl alcohol, human erythrocytes.

### Connection of the publication with planned research works.

The proposed study is a fragment of SRW “The influence of naturally occurring gel-forming polysaccharides on the cryoprotective effect of cryoprotective solutions” (state registration number 0125U004150) of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

### Introduction.

The preservation of biological material remains a fundamental focus for modern biotechnology and practical medicine. The basic principles of most preservation methods are usually based on lowering the temperature, which ensures long-term storage by slowing down the temperature-dependent metabolism of living organisms [1]. The fact remains that biological objects are mainly water, which forms ice crystals at low temperatures. This, in turn, leads to dehydration and lethal damage to biological material, which is currently one of

the biggest problems in cryopreservation of cells, tissues, and organs [2].

Cryopreservation, as one of the modern methods of preserving biological objects, is important for further practical application. However, the formation and growth of ice crystals during the freezing-thawing procedure decrease the viability of the biomaterial, which is the dominant factor in damage and the biggest problem in cryopreservation. Therefore, the introduction of methods to control the growth of ice crystals during cooling and inhibit their recrystallization during heating is crucial for minimizing cell damage [3].

To preserve the structural integrity and biological activity of the material being frozen, it is important to select highly effective cryoprotective solutions that contain modern cryoprotective agents [4]. The chemical composition of the cryoprotective solution plays an important role in the successful cryopreservation of various biological samples [5].