

Е.А. Мысина¹, Н.Р. Попова¹, А.Е. Шемяков^{1,2}, И.В. Савинцева¹, Н.Н. Чукавин¹, А.Л. Попов¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПУЧКА ПРОТОНОВ НА ДИНАМИКУ РОСТА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛИНИИ 4Т1

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино² ФТЦ Физического института РАН, Протвино

Контактное лицо: А.Л. Попов, e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

РЕФЕРАТ:

Актуальность: Протонная терапия рассматривается как один из наиболее перспективных методов в лечении сложно локализованных опухолей, при этом до сих пор имеет некоторые недостатки, что требует разработки новых подходов к повышению ее эффективности. Одним из наиболее перспективных подходов является использование радиосенсибилизаторов, способных усиливать радиационно-индуцированные эффекты пучка протонов. При этом использование 2D моделей опухолевых клеток для скрининга потенциальных радиосенсибилизаторов является недостаточным для эффективной трансляции полученных экспериментальных данных на уровень *in vivo*. 3D клеточные сфероиды являются удобной и релевантной моделью для исследования новых подходов в терапии солидных опухолей, так как позволяют смоделировать условия микроокружения опухолевых клеток и смоделировать условия *in vivo*, включая наличие межклеточного матрикса и формирование определенной зональности.

Цель: Создание экспериментальной модели опухолевого сфероида на основе опухолевых клеток линии 4Т1 при их облучении пучком протонов для скрининга потенциальных нанорадиосенсибилизаторов.

Материал и методы: Оценка биологического действия *in vitro* выполнялась на культуре клеток линии 4Т1 (карцинома мыши). Для формирования клеточных сфероидов использовался метод «висячей капли». Облучение клеточных сфероидов проводили пучком протонов в пике Брэгга на терапевтической протонном комплексе «Прометеус» в дозе 0–12 Гр. Клоногенный тест использовали для анализа жизнеспособности и митотической активности клеток после облучения. Оценку динамики роста облученных 3D сфероидов оценивали путем анализа микроморфометрии в течение 8 дней после облучения.

Результаты: Показано дозозависимое снижение миграционной активности клеток после облучения пучком протонов в дозе от 1 до 12 Гр в модифицированном пике Брэгга. Установлено, что дозы 8, 10 и 12 Гр являются оптимальными для анализа веществ потенциального радиосенсибилизатора методом микроморфометрии для сфероидов, сформированных из клеток карциномы линии 4Т1.

Заключение: Определен дозовый ответ клеточных сфероидов, сформированных из опухолевых клеток линии 4Т1, на облучение пучком протонов в модифицированном пике Брэгга через анализ клоногенной активности и микроморфометрии. При этом стоит отметить, что данный метод анализа не всегда может быть использован, так как облучение ионизирующим излучением может приводить и к обратному эффекту: увеличению размеров сфероидов с повышением дозы облучения за счет разрушения межклеточных контактов, снижению плотности сфероида и увеличению его общего объема.

Ключевые слова: клеточный сфероид, модель опухоли, адронная терапия, протоны

Для цитирования: Мысина Е.А., Попова Н.Р., Шемяков А.Е., Савинцева И.В., Чукавин Н.Н., Попов А.Л. Исследование влияния пучка протонов на динамику роста и жизнеспособность 3D клеточных сфероидов, сформированных из клеток карциномы линии 4Т1 // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 4. С. 16–20. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-4-16-20

Е.А. Mysina¹, N.R. Popova¹, A.E. Shemyakov^{1,2}, I.V. Savintseva¹, N.N. Chukavin¹, A.L. Popov¹

Study of Proton Beam Influence on the Growth Dynamics and Viability of 3D Cell Spheroids Formed From 4T1 Carcinoma Cells

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia² PTC LPI, Protvino, Russia

Contact person: A.L. Popov, e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

ABSTRACT

Background: Proton therapy is considered one of the most promising methods in the treatment of complex localized tumors, but still has some shortcomings, which requires the development of new approaches to improve its effectiveness. One of the most promising approaches is the use of radiosensitizers that can enhance the radiation-induced effects of a proton beam. However, the use of 2D tumor cell models for screening potential radiosensitizers is insufficient for the effective translation of the experimental data to the *in vivo* level. 3D cellular spheroids are a convenient and relevant model for studying new approaches in the therapy of solid tumors, since they allow simulating the conditions of the microenvironment of tumor cells and simulating *in vivo* conditions, including the presence of an intercellular matrix and the formation of a certain zonality.

Purpose: To create an experimental model of a tumor spheroid based on 4T1 tumor cells irradiated with a proton beam for screening potential nanoradiosensitizers.

Material and methods: In vitro biological activity was assessed using a 4T1 cell line (mouse carcinoma) culture. The hanging drop method was used to form cell spheroids. The spheroids were irradiated with a proton beam at the Bragg peak on at a dose of 0–12 Gr using the “Prometheus” therapeutic proton complex. The clonogenic test was used to analyze the viability and mitotic activity of the cells after irradiation. The growth dynamics of irradiated 3D spheroids has been assessing by analyzing micromorphometry for 8 days after irradiation.

Keywords: *cell spheroid, tumor model, hadron therapy, protons*

For citation: Mysina EA, Popova NR, Shemyakov AE, Savintseva IV, Chukavin NN, Popov AL. Study of Proton Beam Influence on the Growth Dynamics and Viability of 3D Cell Spheroids Formed From 4T1 Carcinoma Cells. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(4):16–20. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-4-16-20

Введение

3D клеточные сфероиды являются удобной экспериментальной моделью для исследования влияния ионизирующего излучения на опухолевые клетки, а также тестирования потенциальных терапевтических веществ или новых подходов к лечению в онкологии [1–5]. Такие структуры дают возможность обеспечить формирование определенной зональности как в опухолях *in vivo*, формируют внеклеточный матрикс в трехмерном пространстве, а также дают возможность быть сформированными из нескольких типов клеток, включая иммунные клетки, всего чего лишены 2D культуры. При этом стоит отметить, что 3D клеточные сфероиды также имеют некоторые недостатки (например, отсутствие микрокапиллярной сети), однако несмотря на них все равно значительно выигрывают у монослойных экспериментальных моделей. Несмотря на имеющиеся недостатки, 3D клеточные сфероиды остаются одним из наиболее релевантных и продвинутих подходов к моделированию солидных опухолей.

Использование 3D клеточных сфероидов для исследования радиосенсибилизирующих эффектов различных веществ широко применяется [6]. При этом существует несколько ключевых принципов, которые учитываются при разработке таких моделей, включая тип ионизирующего излучения, тип клеточной культуры, использование моно или гетерокультуры при формировании сфероида, наличие или отсутствие внеклеточного матрикса, условия оксигенации и т.д.

Анализ биологического действия ионизирующего излучения на опухолевые ткани при разработке экспериментальных моделей требует детального изучения, так как подбор схемы, дозы и энергии облучения являются ключевыми параметрами при разработке новых технологий лучевой терапии, включая бинарные технологии с использованием наночастиц [7–9]. Был проведен сравнительный анализ влияния фотонов, протонов и ионов углерода на 2D и 3D клеточных моделях, который подтвердил отличительные эффекты при воздействии на монослой культуры клеток или в ее 3D сфероиде. При этом максимальный повреждающий эффект наблюдался при облучении пучком ионов, что подтверждает перспективность адронной терапии опухолевых новообразований [10]. Также, используя гамма-облучение сфероидов, сформированных из опухолевых клеток линии BON1 и HCT116, показано, что облучение в дозе 6 Гр приводит к уменьшению размера сфероида в 2 раза через 7 дней после облучения. При этом авторами показано, что доля апоптотических клеток в сфероиде растет с увеличением дозы облучения, а вот увеличения уровня сенесцентных клеток не наблюдалось [11]. Сверхвысокая мощность дозы облучения (FLASH) недавно появилась как многообещающий подход к улучшению терапевтического соотношения лучевой терапии. Эффект FLASH обусловлен, по крайней мере частично, радиохимическим истощением кислорода из облученной ткани. В отличие от опухолевых ксенотрансплантатов *in vivo*, опухолевые сфероиды являются аваскулярными. Таким образом, их реакция на ионизирующее излучение не зависит от состояния сосудистой сети, циркуляции иммунных клеток в облученном поле и радиационного повреждения окружающих нормальных тканей, что делает их идеальной

моделью для исследования прорывных технологий радиотерапии таких как FLASH-облучение, молекулярный механизм которого обусловлен истощением кислорода под воздействием высоких доз в короткий промежуток времени [12].

Интересной является разработка новых подходов радиотерапии, где используется сочетанное действие двух разных видов излучений. Brünink S.C. et al разработали модели сочетанного воздействия различных факторов, например, гамма-излучения + гипертермии [13]. Используя 2 типа опухолевых клеток (HCT116 и CAL27) с однократным и комбинированным воздействием фотонного облучения (0–20 Гр) и гипертермии при 47 °C, они продемонстрировали реакцию 3D клеточных с точкой зрения динамики их роста, жизнеспособности клеток и распределения доли живых/мертвых клеток. Было обнаружено, что чувствительность к теплу у сфероидов значительно ниже, чем у монослойных культур. Сфероиды демонстрировали различные закономерности уплотнения и повторного роста при воздействии тепла или радиации: нагретые сфероиды «сбрасывали» мертвые клетки в течение четырех дней после нагревания и демонстрировали более быстрый рост после воздействия, чем образцы, которые подвергались облучению или не подвергались лечению. Облученные сфероиды сохраняли плотную структуру и демонстрировали более длительную задержку роста, чем сфероиды, подвергавшиеся гипертермии или комбинированному воздействию. Авторами выдвинуто предположение о том, что в отличие от ионизирующего излучения, которое убивает активно делящиеся клетки, гибель клеток, вызванная гипертермией, влияет на клетки независимо от их статуса пролиферации. Это вызывает изменения микросреды, которые способствуют росту сфероидов.

Также существует подход, когда для формирования экспериментальных моделей на основе 3D клеточных сфероидов используют клинический материал пациентов с последующим анализом их ответа на облучение [14]. Такой персонализированный подход дает возможность оценить эффективность отклика конкретного пациента на лучевую терапию. Таким образом, использование 3D клеточных сфероидов как экспериментальной модели является актуальным и применимым для эффективного скрининга новых подходов к терапии онкологических заболеваний, включая бинарные технологии с использованием различных наноформуляций.

В рамках данной работы была создана экспериментальная модель реакции 3D опухолевого сфероида, сформированного на основе опухолевых клеток линии 4T1, при их облучении пучком протонов для скрининга потенциальных нанорадиосенсибилизаторов или разработки новых подходов к адронной терапии опухолей.

Материал и методы

Культура клеток

В качестве объекта исследований была использована культура клеток линии 4T1 (линия аденокарциномы молочной железы). Данная культура характеризуется относительно высокой радиочувствительностью и широко используется при исследовании влияния ионизирующего излучения *in vitro* и *in vivo*.

Формирование сфероидов

Клеточные сфероиды готовили с использованием техники «висячей капли». Клетки открепляли от субстрата с помощью раствора трипсин-ЭДТА (0,05 %), а затем промывали три раза центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Затем к клеткам добавляли ростовую среду DMEM/F12 с 10 % сыворотки. Затем к клеточной суспензии добавляли метилцеллюлозу (1 % в среде DMEM/F12) для того, чтобы увеличить межклеточные контакты в структуре сфероида. Количество клеток составляло 100 тыс. клеток/мл. Клетки высевали для формирования сфероида на крышку 60-миллиметровой пластиковой чашки Петри каплями объемом 20 мкл. Для предотвращения высыхания капель на дно чашки помещали 10-мл буфер Хэнкса. Затем крышку чашки аккуратно переворачивали и инкубировали в течение 72 ч в инкубаторе CO₂. После 24 ч инкубации клетки собирались в центре капли, сформировав сферическую структуру будущего сфероида.

Облучение клеточных сфероидов

Облучение проводили в центре коллективного пользования на базе комплекса протонной терапии «Прометеус» (ФТИЦ ФИАН, Россия) в модифицированном пике Брэгга, сформированного методом сканирования пучками протонов с энергией от 110 до 125 МэВ. При облучении пробирки типа эппендорф (2 мл), содержащие сфероиды, полностью заполняли питательной средой и помещали в специально разработанный водный фантом. Подготовку и дозиметрический контроль облучения осуществляли с использованием радиохромной пленки ЕВТЗ (США) и ионизационной камеры РТW PinPoint (Германия).

Анализ динамики роста сфероидов

Анализ динамики роста клеточных сфероидов проводили путем получения микрофотографий на инвертированном микроскопе Celena S. (Ю. Корея) при увеличении $\times 40$ и последующим анализом их диаметра для получения среднего значения по 4–5 сфероидам.

Клоногенный анализ

Анализ клоногенной активности клеток проводили сразу после облучения протонным пучком. Сфероиды дезагрегировали на единичные клетки с помощью раствора трипсин-версен 0,025 % (ПанЭко, Россия). Клет-

ки высевали на 6-луночный планшет (SPL, Ю. Корея) с плотностью 1000 клеток на лунку. Через 8 сут образовавшиеся колонии клеток фиксировали 4 % параформальдегидом (ПанЭко, Россия) и окрашивали 0,1 % раствором кристаллического фиолетового (ПанЭко, Россия). Затем вручную подсчитывали количество колоний. Колониями считали клеточные агрегаты численностью 50 и более клеток.

Статистическая обработка

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Значимость отклонений между экспериментальной и контрольной группами подтверждалась с помощью t-критерия Стьюдента с значениями: $p < 0,0001$.

Результаты и обсуждение

Схема проведения дозиметрических исследований и облучения клеточных сфероидов продемонстрирована на рис. 1.

На рис. 2 представлены данные микроморфометрического анализа 3D клеточных сфероидов при облучении пучком протонов в широком диапазоне доз (0–12 Гр). На начальном этапе (1 день облучения) размер сфероидов составлял порядка 250 мкм (257 ± 13 мкм), а к окончанию эксперимента на 8 сут размер сфероида в необлученной контрольной группе удвоился ($453,3 \pm 27$ мкм). Выявлено, что облучение в дозе 4 Гр не приводит к статистически значимому снижению размера сфероида на протяжении всех 8 дней наблюдения. Облучение протонами дозой от 6 Гр и выше показало статистически значимое снижение размера сфероида на 8 день наблюдения. При этом стоит отметить, что дозы 8, 10 и 12 Гр приводили к практически полному отсутствию роста размера сфероида в течение 8 дней наблюдения, что говорит о ярко выраженных повреждениях ДНК, которые препятствуют митотической активности опухолевых клеток. Для клеточной культуры данного типа мы наблюдаем четкую динамику уменьшения размера сфероида и снижения жизнеспособности клеток после облучения. Однако стоит отметить, что ответ клеточного сфероида на облучение в виде уменьшения его диаметра не является универсальным, так как подобные виды воздействия, наоборот, могут увеличивать его диаметр, что связано с нарушением межклеточных контактов и разрыхлением его струк-

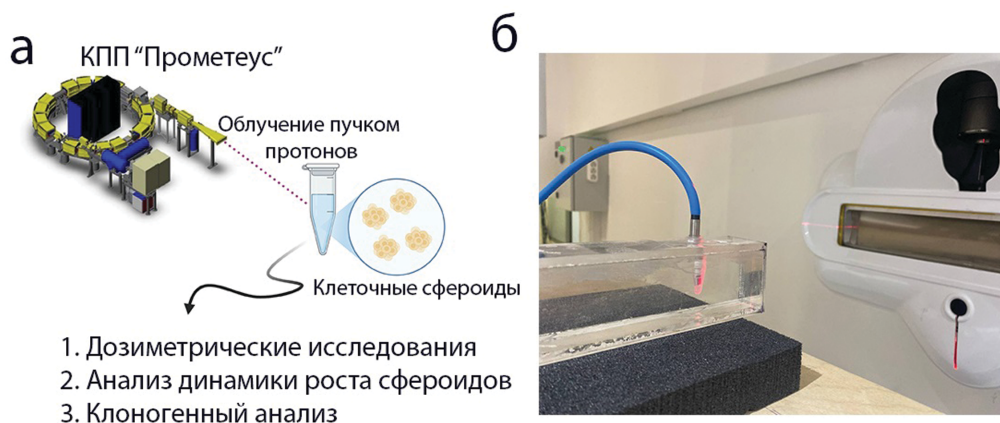


Рис. 1. Схема облучения клеточных сфероидов на протонном терапевтическом комплексе «Прометеус» (а) и демонстрация схемы проведения дозиметрических исследований для пробирки типа эппендорф объемом 2 мл (б)

Fig. 1. Scheme of irradiation of cellular spheroids on the Prometheus (a) proton therapeutic complex and demonstration of the scheme for conducting dosimetric studies for a 2 ml Eppendorf test tube (b)

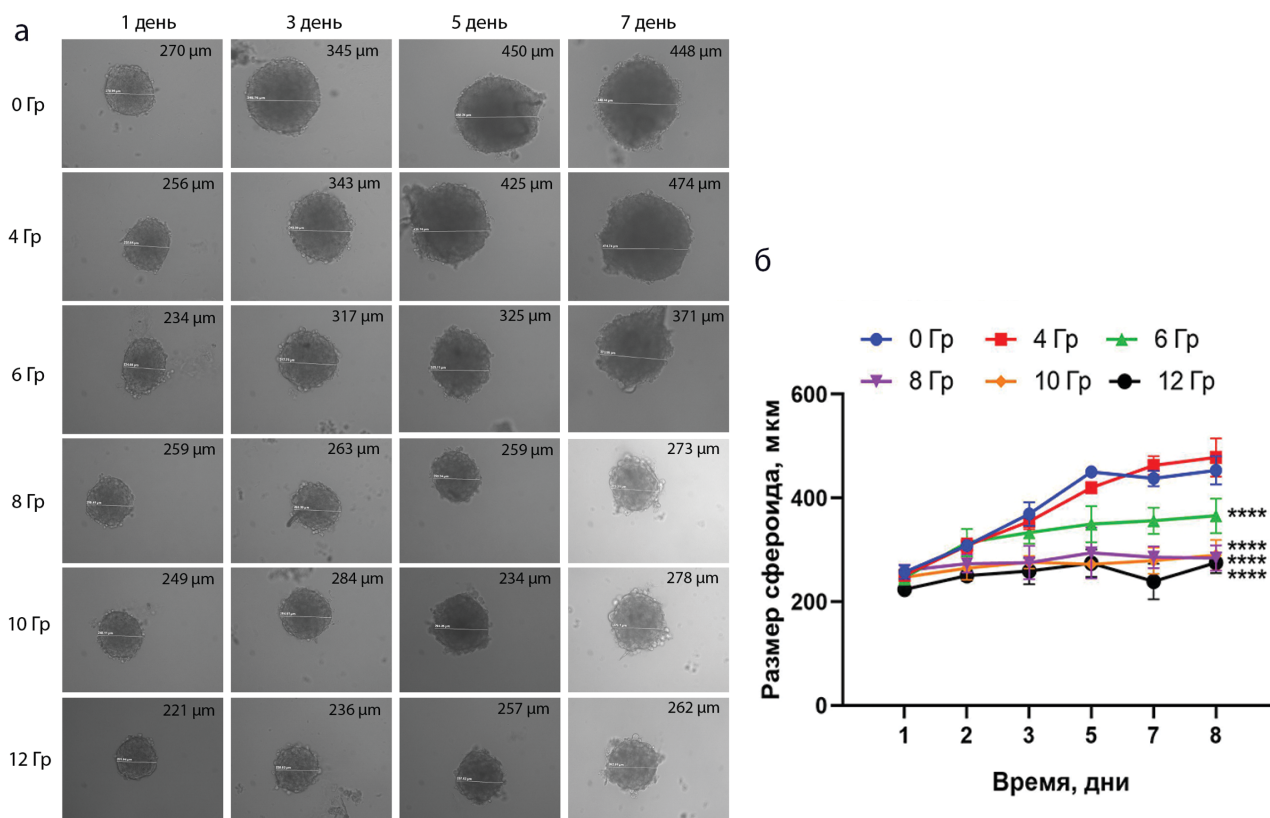


Рис. 2. Динамика роста 3D клеточных сфероидов в течение 8 дней после облучения пучком протонов в дозах 0–12 Гр. Данные представлены как $SD \pm \text{mean}$, **** $p \leq 0,005$

Fig. 2. Dynamics of growth of 3D cell spheroids formed from cells for 8 days after irradiation with a proton beam at doses of 0–12 Gy. Data are presented as $SD \pm \text{mean}$, **** $p \leq 0.005$

туры, но при этом анализ жизнеспособности клеток в таком сфероиде значительно снижен.

Клоногенный тест является «золотым стандартом» радиобиологических исследований, который дает возможность оценить действие ионизирующего излучения на митотическую активность клеток и способность клонального размножения [15]. Мы провели анализ клоногенной активности клеток, выделенных из сфероида, после облучения пучком протонов, который также показал статистически значимые отличия от контрольной необлученной группы, начиная с дозы 4 Гр (рис. 3). Максимальные дозы в 10 и 12 Гр вовсе не давали сформироваться

ни одной колонии. Стоит отметить, что и клоногенный тест дает возможность оценить митотическую активность всех клеток, включая клетки, находящиеся в зоне гипоксии и зоне некроза, жизнеспособность которых минимальная.

Анализ клоногенной активности клеток в различных зонах сфероида является технически сложной задачей и может быть связан с различными артефактами при выполнении процедуры разделения с использованием поэтапной трипсинизации. При этом важным аспектом сравнительного анализа радиочувствительности 2D и 3D культур является тот факт, что радиочувствитель-

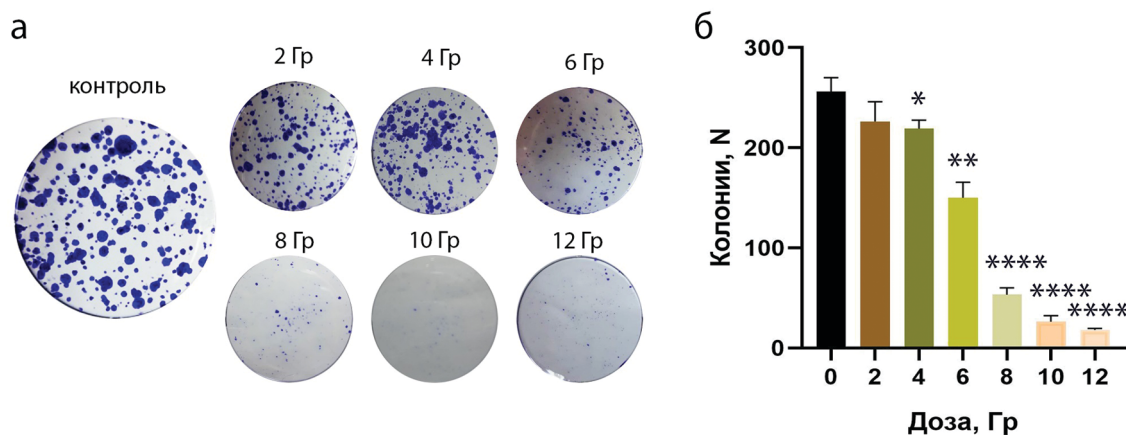


Рис. 3. Клоногенный анализ клеток 3D клеточного сфероида после облучения пучком протонов в дозах 0–12 Гр (а); $p: 0,01 < p < 0,05$ (*), $0,001 < p < 0,01$ (**) и $p < 0,0001$ (****) (б)

Fig. 3. Clonogenic analysis of 3D cell spheroid cells after proton beam irradiation at doses of 0–12 Gy (a) colony photographs (б) quantitative analysis

ность опухолевых клеток в сфероиде гораздо ниже, чем у 2D культур, что видно по анализу клоногенной активности. Например, для клеток данной линии доза 2 Гр обеспечивает 2-кратное снижение числа колоний, а доза выше 4 Гр вообще ингибирует образование колоний, чего мы не видим при тестировании этих доз в 3D клеточных сфероидах. Лишь только дозы выше 8 Гр полностью ингибируют образование колоний. Таким образом, можно говорить о том, что 3D культуры в большей степени отражают биологический ответ на воздействие ионизирующего излучения.

Заключение

Нами выявлено, что облучение пучком протонов в модифицированном пике Брэгга 3D клеточных сфероидов, сформированных из культуры клеток линии 4T1, приводит к дозозависимому уменьшению их диаметра, начиная с дозы 8 Гр, а снижение клоногенной активности наблюдается уже с дозы 4 Гр. Показано, что данные параметры могут быть использованы для тестирования веществ, способных модулировать эффекты действия ионизирующего излучения на клетку.

Работа выполнена на базе ЦКП «Комплекс протонной терапии Прометеус».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Krukowski K., Grue K., Becker M., Elizarraras E., Frias E.S., Halvorsen A., Koenig-Zanoff McK., Frattini V., Nimmagadda H., Feng X., Jones T., Nelson G., Ferguson A.R., Rosi S. The Impact of Deep Space Radiation on Cognitive Performance: from Biological Sex to Biomarkers to Countermeasures. *Sci Adv.* 2021;7;42:eabg6702. doi:10.1126/sciadv.abg6702.
2. Weydert Z., et al. 3D Heterotypic Multicellular Tumor Spheroid Assay Platform to Discriminate Drug Effects on Stroma Versus Cancer Cells. *Slas Discovery: Advancing the Science of Drug Discovery.* 2020;25;3:265-276. doi: 10.1177/2472555219880194.
3. Zanoni M., et al. 3D Tumor Spheroid Models for in vitro Therapeutic Screening: a Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained. *Scientific Reports* 2016;6;1:19103. doi: 10.1038/srep19103.
4. Barbosa Mélanie A.G., et al. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers* 2021;14;1:190. doi: 10.3390/cancers14010190.
5. Mittler F., et al. High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. *Frontiers in Oncology.* 2017;7:293. doi: 10.3389/fonc.2017.00293.
6. Kolmanovich D.D., Chukavin N.N., Pivovarov N.A., Ivanov V.K., Popov A.L. Cellular Uptake of FITC-Labeled $\text{Ce}_{0.8}\text{Gd}_{0.2}\text{O}_2$ Nanoparticles in 2D and 3D Mesenchymal Stem Cell Systems. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2024;15;3:352-360. doi: 10.17586/2220-8054-2024-15-3-352-360.
7. Brüningk S.C., Ziegenhein P., Rivens I., et al. A Cellular Automaton Model for Spheroid Response to Radiation and Hyperthermia Treatments. *Sci Rep.* 2019;9:17674. doi: 10.1038/s41598-019-54117-x.
8. Zavestovskaya I.N., Filimonova M.V., Popov A.L., Zelepukin I.V., Shemyakov A.E., et al. Bismuth Nanoparticles-Enhanced Proton Therapy Concept and Biological Assessment. *Materials Today Nano.* 2024;100508. doi: 10.1016/j.mtnano.2024.100508.
9. Popov A.L., Kolmanovich D.D., Chukavin N.N., et al. Boron Nanoparticle-Enhanced Proton Therapy: Molecular Mechanisms of Tumor Cell Sensitization. *Molecules.* 2024;29;16:39369. doi: 10.3390/molecules291639369.
10. Kolmanovich D.D., Romanov M.V., Khaustov S.A., Ivanov V.K., Shemyakov A.E., Chukavin N.N., Popov A.L. Proton Beam-Induced Radiosensitizing Effect of $\text{Ce}_{0.8}\text{Gd}_{0.2}\text{O}_2$ -x Nanoparticles against Melanoma Cells in vitro. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2024;15;5:675-682. doi: 10.17586/2220-8054-2024-15-5-675-682.
11. Charalampopoulou A., Barcellini A., Magro G., Bellini A., Borgna S.S., Fulgini G., Ivaldi G.B., Mereghetti A., Orlandi E., Pullia M.G., et al. Advancing Radiobiology: Investigating the Effects of Photon, Proton, and Carbon-Ion Irradiation on PANC-1 Cells in 2D and 3D Tumor Models. *Curr. Oncol.* 2025;32:49. doi: 10.3390/curroncol32010049.
12. Al-Ramadan A., Mortensen A.C., Carlsson J., Nestor M.V. Analysis of Radiation Effects in Two Irradiated Tumor Spheroid Models. *Oncol Lett.* 2018 Mar;15;3:3008-3016. doi: 10.3892/ol.2017.7716.
13. Khan S., Bassenne M., Wang J., Manjappa R., Melemenidis S., Breikreutz D. Y., Pratz G. Multicellular Spheroids as in vitro Models of Oxygen Depletion during Flash Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics.* 2021;110;3:833-844. doi: 10.1016/j.ijrobp.2021.01.050.
14. Brüningk S.C., Rivens I., Box C., et al. 3D Tumour Spheroids for the Prediction of the Effects of Radiation and Hyperthermia Treatments. *Sci Rep.* 2020;10:1653.
15. Roohani S., Loskutov J., Heufelder J., Ehret F., Wedeken L., Regenbrecht M., Sauer R., Zips D., Denker A., Jousen A.M., Regenbrecht C.R.A., Kaul D. Photon and Proton irradiation in Patient-Derived, Three-Dimensional Soft Tissue Sarcoma Models. *BMC Cancer.* 2023 Jun 22;23;1:577. doi: 10.1186/s12885-023-11013-y.
16. Franken N., Rodermond H., Stap J. et al. Clonogenic Assay of Cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1:2315-2319. doi: 10.1038/nprot.2006.339.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Статья подготовлена в рамках гранта РФФИ №22-73-10231, <https://rscf.ru/project/22-73-10231/>.

Участие авторов. Е.А. Мысина – работа со сфероидами (культивирование, облучение, анализ жизнеспособности), Н.Р. Попова – научное редактирование текста, А.Е. Шемяков – облучение и дозиметрия на протонном терапевтическом комплексе «Прометеус», И.В. Савинцева – культивирование клеток, Н.Н. Чукавин – научное редактирование текста, А.Л. Попов – разработка дизайна исследования, научное руководство.

Поступила: 20.03.2025. **Принята к публикации:** 25.04.2025.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The article was prepared within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 22-73-10231, <https://rscf.ru/project/22-73-10231/>.

Contribution. E.A. Mysina – work with spheroids (cultivation, irradiation, viability analysis), N.R. Popova – scientific text editing, A.E. Shemyakov – radiation and dosimetry at the proton therapeutic complex Prometheus, I.V. Savintseva – cell culture, N.N. Chukavin – scientific text editing, A.L. Popov – research design development, scientific guidance.

Article received: 20.03.2025. **Accepted for publication:** 25.04.2025.