DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-19-24

Е.А. Мысина[1], Н.А. Пивоваров[1], Б.А. Бокль[1], А.Е. Шемяков[1, 2], А.Л. Попов[1]

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ТИПА ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ 3D КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ, СФОРМИРОВАННЫХ ИЗ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЛИНИИ B_{16}/F_{10}

[1] Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия
[2] ФТЦ ФИАН им. П.Н. Лебедева, Протвино, Россия

Контактное лицо: Антон Леонидович Попов, e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

РЕФЕРАТ

Актуальность: Протонная терапия рассматривается как один из наиболее перспективных методов в лечении сложно локализованных опухолей, но 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 при скрининге 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, путем создания экспериментальной модели опухолевого сфероида на основе опухолевых клеток линии B_{16}/F_{10} при их облучении рентгеновскими лучами и пучком протонов для дальнейшего использования в скрининге потенциальных нанорадиосенсибилизаторов.
Цель: Исследовать влияние рентгеновского излучения и облучения протонами в пике Брэгга в широком диапазоне доз (0–12 Гр) на жизнеспособность 3D клеточных опухолевых сфероидов, сформированных из клеток меланомы мыши линии B_{16}/F_{10}.
Материал и методы: 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 и с использованием терапевтической рентгеновской установки РУТ-15 в дозе 0–12 Гр. Клоногенный тест использовали для анализа жизнеспособности клеток после облучения. Оценку внешнего вида сфероидов после облучения оценивали путем анализа микроморфометрии через 24 ч после облучения.
Результаты: Показано дозозависимое снижение клоногенной активности клеток после облучения рентгеновским излучением и пучком протонов в дозе от 1 до 12 Гр в модифицированном пике Брэгга. Установлено, что доза 6 Гр является оптимальной для анализа эффективности потенциальных радиосенсибилизаторов методом клоногенного теста для сфероидов, сформированных из клеток линии B_{16}/F_{10}.
Заключение: Определен дозовый ответ клеточных сфероидов, сформированных из опухолевых клеток линии B_{16}/F_{10}, на воздействие рентгеновского излучения и облучения протонами в модифицированном пике Брэгга путем анализа их клоногенной активности и проведения микроморфометрического анализа. Определена оптимальная доза облучения для экспресс-скрининга или исследования потенциальных веществ-радиосенсибилизаторов.

Ключевые слова: *клеточные сфероиды, фотонная терапия, протонная терапия, меланома, зависимость доза–эффект*

Для цитирования: Мысина Е.А., Пивоваров Н.А., Бокль Б.А., Шемяков А.Е., Попов А.Л. Анализ влияния типа излучения на жизнеспособность 3D клеточных сфероидов, сформированных из клеток меланомы линии B_{16}/F_{10} // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 6. С. 19–24. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-19-24

DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-19-24

E.A. Mysina[1], N.A. Pivovarov[1], B.A. Bokl[1], A.E. Shemyakov[1, 2], A.L. Popov[1]

Influence of Different Type of Radiation on the Cell Survival from 3D Tumour Spheroids Formed from B_{16}/F_{10} Melanoma Cells

[1] Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia
[2] P.N. Lebedev Physical Institute, Protvino, Russia

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

ABSTRACT

Relevance: Proton therapy is considered one of the most promising methods for treating difficult-to-localize tumors, although it still has some drawbacks, which requires the development of new approaches to improve its effectiveness. One of the most promising approaches is the use of radiosensitizers capable of enhancing the radiation-induced effects of a proton beam. At the same time, the use of 2D tumor cell models for screening potential radiosensitizers is insufficient for effectively translating the obtained experimental data to the *in vivo* level. 3D cell spheroids are a convenient and relevant model for studying new approaches to the therapy of solid tumors, as they allow simulating the microenvironment of tumor cells and modeling *in vivo* conditions, including the presence of the intercellular matrix and the formation of a specific zonality.
The main goal of this study was to create an experimental model of a tumor spheroid based on tumor cells of the B_{16}/F_{10} line, which would be irradiated with X-rays and a proton beam, for subsequent use in screening potential nanoradiosensitizers.
Purpose: To investigate the effect of X-ray radiation and proton irradiation at the Bragg peak over a wide dose range (0–12 Gy) on the viability of 3D cellular tumor spheroids formed from B_{16}/F_{10} mouse melanoma cells.

Material and methods: The biological effect of the radiation was assessed *in vitro* using a culture of B_{16}/F_{10} cells (mouse melanoma). The hanging drop method was used to form cellular spheroids. The cell spheroids were irradiated with a proton beam at the Bragg peak using the Prometeus therapeutic proton complex at a dose of 0–12 Gy, and with the RUT-15 therapeutic X-ray unit at a dose of 0–12 Gy. The clonogenic test was used to analyze cell viability after irradiation. The appearance of the spheroids after irradiation was assessed by analyzing micromorphometry 24 hours after irradiation.
Results: A dose-dependent reduction in the clonogenic activity of cells was demonstrated after irradiation with X-rays and a proton beam at doses ranging from 1 to 12 Gy in the modified Bragg peak. It has been established that a dose of 6 Gy is optimal for analyzing the effectiveness of potential radiosensitizers using the clonogenic assay method for spheroids formed from B_{16}/F_{10} cells.
Conclusion: The dose response of cell spheroids formed from tumor cells of the B_{16}/F_{10} line to X-ray irradiation and proton irradiation in a modified Bragg peak has been determined by analyzing their clonogenic activity and conducting micromorphometric analysis. The optimal radiation dose has been determined for rapid screening or for studying potential radiosensitizing substances.

Keywords: *cellular spheroids, photon therapy, hadron therapy, melanoma, dose response*

For citation: Mysina EA, Pivovarov NA, Bokl BA, Shemyakov AE, Popov AL. Influence of Different Type of Radiation on the Cell Survival from 3D Tumour Spheroids Formed from B_{16}/F_{10} Melanoma Cells. Medical Radiology and Radiation Safety. 2026;71(6):19–24. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-6-19-24

Введение

Меланома – крайне агрессивная и опасная форма рака кожи, вызываемая трансформацией меланоцитов, которая является следствием генетической предрасположенности и/или повреждающего действия различных факторов окружающей среды (УФ-излучения, онкогенных вирусов и т.п.) [1]. Несмотря на то, что меланома встречается относительно редко (на нее приходится около 1% от всех случаев рака кожи) [2], она является причиной наибольшего количества смертей среди всех форм рака кожи [3] ввиду своей высокой метастатической активности, значительно ухудшающей прогноз для пациентов, страдающих данной формой рака [4]. В частности, для меланомы наиболее характерны метастазы в легкие, печень, мозг и кости [5].

На данный момент высокие темпы роста заболеваемости и смертности делают меланому глобальной проблемой – к 2040 г. прогнозируется 50% рост заболеваемости меланомой и 68% рост смертности от данной формы рака кожи [6]. Таким образом, повышение эффективности терапии меланомы является важной задачей.

На сегодняшний день наиболее популярной стратегией терапии меланомы на I–III стадиях является ее удаление хирургическим путем [2]. Наибольшую эффективность данный метод показывает тогда, когда возможна радикальная резекция опухолевого узла [2]. В некоторых случаях хирургическая резекция применяется также для удаления солитарных метастазов, однако такой подход не рекомендован в случае множественных метастазов в жизненно важных органах [7]. Для повышения выживаемости пациентов и терапии метастатической меланомы хирургия зачастую применяется в комбинации с другими терапевтическими подходами: радиотерапией, иммунотерапией, а также химиотерапией [8].

Радиотерапия меланомы является перспективным лечебным подходом в виду локального характера своего действия, позволяющего поражать глубоко локализованные метастазы или опухолевые узлы, недоступные для полной хирургической резекции, не подвергая систематическому токсическому воздействию организм пациента [9]. Согласно литературным данным, прохождение хотя бы одного курса радиотерапии может значительно улучшить прогноз для 23% пациентов, страдающих меланомой [10]. Ионизирующее излучение может применяться как основной способ терапии первичной опухоли, как адъювантная терапия при хирургическом вмешательстве или как паллиативная терапия [11]. Радиотерапия меланомы позволяет избежать косметических или функциональных повреждений, ассоциированных с хирургическим вмешательством, обеспечить высокую степень локорегионального контроля первичных и вторичных опухолей [11].

Наиболее перспективным подходом к лечению меланомы является протонная терапия. Протонная терапия обладает рядом преимуществ по сравнению с более распространённой фотонной радиотерапией. В частности, протоны высвобождают максимальную энергию строго в заданной глубине (в пике Брэгга), что позволяет минимизировать поражение здоровых тканей, окружающих опухолевый узел, что расширяет спектр локализаций опухоли, доступных для лечения, позволяет использовать более высокие дозы ионизирующего излучения, а также снижает вероятность наступления негативных последствий для пациента [12, 13]. Благодаря этой особенности, протонная терапия получила наиболее широкое распространение в сфере лечения увеальных меланом [12, 14, 15]. Облучение опухоли пучком протонов в пике Брэгга в качестве основной терапии увеальной меланомы значительно снижало вероятность локального рецидива, предотвращало развитие метастазов, а также позволяло сохранить глаз [14, 15]. Схожие результаты были получены при применении протонов в качестве адъювантной терапии конъюктивальной меланомы [16]. Также протонная терапия продемонстрировала высокие показатели локального контроля опухоли и выживаемости пациентов в случае с синонозальной меланомой [17]. К сожалению, радиотерапия данной формы рака зачастую осложнена тем, что клетки меланомы проявляют низкую чувствительность к ионизирующему излучению ввиду своей высокой способности к репарации разрывов ДНК [18]. Эффективность радиотерапии также может быть ограничена тем фактом, что сублетальные дозы радиации могут привести к повышению метастатической активности и риска рецидива опухоли за счет индукции гипоксии [19]. Таким образом, разработка новых эффективных подходов к радиотерапии меланомы необходима.

Перспективным подходом к решению проблемы опухолевой радиорезистентности является применение радиосенсибилизаторов – терапевтических агентов (низкомолекулярных соединений, макромолекул, наночастиц), способных повысить чувствительность опухолевых клеток к ионизирующему излучению. Использование радиосенсибилизаторов в рамках протонной терапии является сравнительно новым направлением в рамках лечения рака. В литературе встречаются данные о радиосенсибилизирующем эффекте олапариба и нирапариба (ингибиторов goли(АДФ-рибоза)-полимеразы(PARP)): комбинированное действие данных препаратов и протонного облучения приводило к увеличению числа двунитевых разрывов ДНК и к

аресту клеточного цикла в фазе G2/M, снижало выживаемость клеток [20, 21]. Также было показано, что PARP-ингибиторы проявили значительный радиосенсибилизирующий эффект в комбинации с фотонным облучением [22]. Однако неселективность механизма действия PARP-ингибиторов и других низкомолекулярных радиосенсибилизаторов может приводить к широкому спектру побочных эффектов [23].

Другим многообещающим подходом является применение наночастиц на основе металлов (Au, Pt, Gd) и оксидов металлов. На сегодняшний день применение наночастиц в качестве радиосенсибилизаторов в рамках протонной и фотонной терапии представляет большой научный интерес ввиду их многофункциональности, простоты их модификации, а также способности наночастиц к пассивному (за счет эффекта повышенного удержания и проницаемости опухоли (ERP-эффекта)) и активному (обеспечиваемого молекулами, обладающими сродством к опухолевым клеткам) таргетингу [24, 25]. Основными механизмами радиосенсибилизации для препаратов на основе металлических наночастиц является их способность к эффективному рассеянию ионизирующего излучения за счет большого атомного радиуса металлов в составе данных наночастиц и их способность к генерации активных форм кислорода (АФК) в раковых клетках [26]. Примером высокоэффективного нанорадиосенсибилизатора, является уже одобренный к применению препарат на основе наночастиц оксида гафния NBTXR3. Применение данного препарата в комбинации с ионизирующим фотонным излучением приводило к значительному улучшению состояния пациентов, страдающих саркомой мягких тканей, в контролируемых клинических испытаниях 3 фазы [27]. Однако на сегодняшний день многие радиосенсибилизаторы все еще находятся на стадии доклинических испытаний. Скрининг наиболее эффективных радиосенсибилизаторов для протонной и фотонной терапии является важной задачей на пути к созданию новых препаратов для борьбы с меланомой. Для выполнения этой задачи необходима разработка релевантной *in vitro* модели протонного и фотонного облучения опухоли.

Перспективной моделью для исследования противораковых свойств различных терапевтических агентов являются трехмерные клеточные сфероиды. Данная модель широко применяется для моделирования различных видов рака, включая меланому [28, 29]. Современные исследователи все чаще обращаются к трехмерным моделям раковых опухолей, поскольку такие модели обладают рядом преимуществ по сравнению с классическими двумерными клеточными моделями: для сфероидов характерна высокая степень сходства экспрессии генов с солидными опухолями *in vivo* [30], они воспроизводят архитектуру, межклеточные взаимодействия и патофизиологические градиенты, характерные для настоящих опухолей [31]. Трехмерные клеточные сфероиды являются крайне перспективной моделью для изучения воздействия ионизирующего излучения на раковые опухоли ввиду их повышенной радиорезистентности по сравнению с двухмерными культурами, что обеспечивается наблюдаемыми в сфероидах градиентами кислорода и pH, пространственной организации, экспрессии генов и метаболических особенностей сфероида [32]. Таким образом, моделирование протонного и фотонного облучения на модели трехмерных клеточных сфероидов может стать ключом к эффективному скринингу новых радиосенсибилизаторов для протонной терапии меланомы.

Материал и методы

Культура клеток

В качестве объекта исследований была использована культура клеток линии B16/F10 (линия меланомы мыши). Данная культура 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 общая концентрация метилцеллюлозы не превышала 0,25%. Количество клеток составляла 100 000 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 накрыли сверху и инкубировали в течение 72 ч в инкубаторе CO_2. После 24 часов инкубации клетки собрались в центре капли, сформировав сферическую структуру будущего сфероида.

Облучение клеточных сфероидов

Облучение проводили в центре коллективного пользования на базе комплекса протонной терапии (КПТ) «Прометеус» (ФТЦ ФИАН, Россия) в модифицированном пике Брэгга, сформированного методом сканирования (pencil beam) 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 EBT3 (США) и ионизационной камеры PTW PinPoint (Германия). Облучение рентгеновским излучением проводили в стандартном режиме на установке (ИТЭБ РАН, Пущино) с мощностью дозы 1 Гр/мин.

Анализ морфологии сфероидов

Анализ морфологии клеточных сфероидов проводили путем получения микрофотографий на инвертированном микроскопе Celena S (Корея) при увеличении ×40.

Клоногенный анализ

Анализ клоногенной активности клеток проводили сразу после облучения рентгеновскими фотонами и протонным пучком. Сфероиды дезагрегировали на единичные клетки с помощью раствора трипсин-версен 0,025% (ПанЭко, Россия). Клетки высевали на 6-луночный планшет (SPL, Корея) с плотностью 1000 клеток на лунку. Через 8 сут образовавшиеся колонии клеток фиксировали 4% параформальдегидом (ПанЭко, Россия) и окрашивали 0,1% раствором метиленового синего (ПанЭко, Россия). Затем вручную подсчитывали количество колоний клеток. 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 соответствующими значениями *p*: $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена схема проведения эксперимента. 3D клеточные сфероиды облучали в 2 мл пробирках типа эппендорф, которые транспортировали в пенопластовых термоконтейнерах до источника облучения, соблюдая температурный режим 37°С. На КПТ «Прометеус» (Протвино, Россия) до сеанса облучения пробирки хранились в термостате при температуре 37°С. Перед каждым сеансом облучения проводили необходимые дозиметрические исследования.

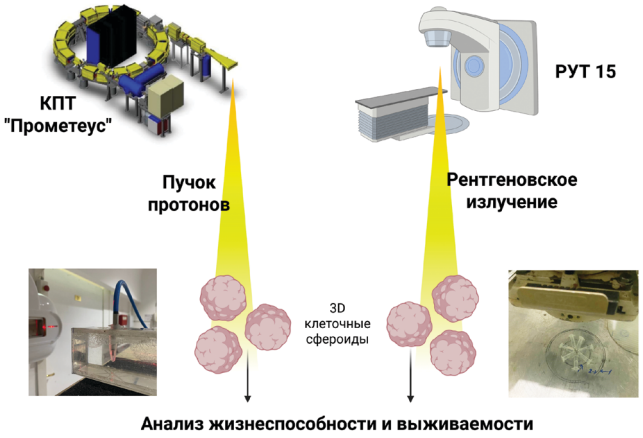


Рис. 1 Схема облучения клеточных сфероидов на протонном терапевтическом комплексе «Прометеус» и рентгеновской терапевтической установке РУТ-15

Fig. 1. Scheme of irradiation of cellular spheroids on the Prometheus proton therapy complex and the RUT-15 X-ray therapeutic unit

На первом этапе методом «висячей капли» были сформированы 3D клеточные сфероиды. Стоит отметить, что сфероиды, сформированные из клеток меланомы мыши линии B_{16}/F_{10}, зачастую имеют неправильную форму из-за низкой соадгезии клеток ввиду недостаточного количества белков внеклеточного матрикса. При этом опухолевый узел, сформированный из данного типа клеток в модели *in vivo*, также зачастую характеризуется неправильной формой и низкой клеточной плотностью, что приводит к высокой степени метастазирования данного вида опухоли. Полученные сфероиды имели в среднем размер от 400 до 600 мкм, что достаточно для формирования в них определенной зональности (зона некроза, зона гипоксии и зона пролиферации). Внешний вид 3D клеточных сфероидов представлен на рис. 2 (а, б). Облучение клеточных сфероидов как с использованием рентгеновского излучения, так и пучком протонов в пике Брэгга приводит к разрушению сфероидов и формированию небольших клеточных агрегатов, имеющих слабые межклеточные контакты (нижняя панель на рис. 2).

Для выявления вклада дозы облучения на митотическую активность клеток в облученном 3D клеточном сфероиде мы проводили стандартный клоногенный тест, результаты которого представлены на рис. 3. Выявлено, что облучение клеточных сфероидов как рентгеновскими фотонами, так и пучками протонов в дозе 2 Гр незначительно снижает клоногенную активность клеток. Доза 4 Гр для облучения обоих типов продемонстрировала статистически значимое снижение числа образовавшихся колоний ($p<0,01$), но сохранила клоногенную активность на высоком уровне. Более высокие дозы облучения, начиная с 6 Гр и выше, привели к значительному снижению клоногенной активности клеток меланомы линии B_{16}/F_{10}, что подтверждает развитие необратимых повреждений молекулы ДНК и невозможность дальнейшей митотической активности большей части клеток. Таким образом, можно сделать вывод о то, что диапазон доз от 4 до 6 Гр может быть использован для экспресс-скрининга потенциальных веществ радиосенсибилизаторов с использованием данной экспериментальной модели 3D клеточных сфероидов.

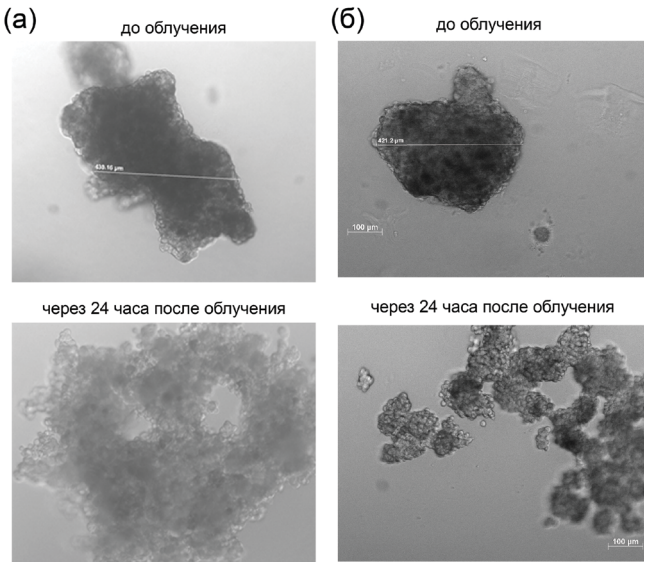


Рис. 2 Внешний вид 3D клеточных сфероидов до и через 24 ч после облучения пучком протонов (а) и рентгеновскими излучением (б) в дозе 8 Гр

Fig. 2. Appearance of 3D cell spheroids formed from mouse melanoma cells before and 24 hours after irradiation (a) at a dose of 0–12 Gy (б)

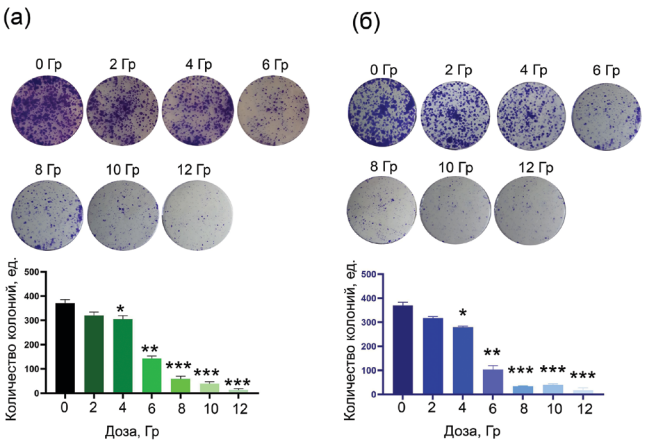


Рис. 3. Анализ клоногенной активности клеток из облученных (0–12 Гр) 3D сфероидов: после облучения пучком протонов (а) и рентгеновскими излучением (б) $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***)

Fig. 3 Clonogenic analysis of 3D cell spheroid cells after X-ray (a) and proton beam irradiation (б) at doses of 0–12 Gy

Обсуждение

На сегодняшний день 3D клеточные сфероиды являются широко используемой валидной экспериментальной моделью для исследования эффективности цитотоксических свойств противоопухолевых соединений [32] или эффективности потенциальных соединений-радиосенсибилизаторов [33]. В частности, мы ранее показали, что такая модель является удобной и релевантной для исследования цитотоксического и радиосенсибилизиру-

ющего действия наноформуляций на основе соединений церия [34]. Разработка новых бинарных подходов (усиление с помощью наночастиц) для протонной радиотерапии также требует создания широкого спектра валидированных моделей с использованием 3D клеточных сфероидов, сформированных из опухолевых клеток различных типов [35].

При этом стоит отметить, что стандартный морфологический анализ 3D клеточных сфероидов как после облучения, так и после воздействия различных цитотоксических агентов, предоставляет важную информацию о жизнеспособности клеток, пролиферативной активности и метаболическом статусе, а также позволяет провести оценку влияния действующего вещества/излучения на межклеточные контакты, так как этот параметр является одним из определяющих для способности опухолевых клеток к метастазированию [36]. Между тем, оценка параметра размера клеточного сфероида в различные сроки после воздействия облучения может давать ложноположительные результаты [37]. В частности, внешнее негативное воздействие в виде гипертермии или облучения может останавливать деление опухолевых клеток и замедлять/останавливать рост размера сфероида, однако такое наблюдается не всегда. Например, 3D-сфероиды могут «разбухать» после воздействия цитотоксических агентов или облучения из-за накопления внеклеточного матрикса и жидкости из-за повреждения клеток [33]. Клетки, которые не смогли полностью восстановиться, либо погибают, либо остаются поврежденными, переставая делиться. Ключевым механизмом такого увеличения размеров сфероидов является накопление внеклеточного матрикса (ВКМ) и осмотический эффект, который реализуется при повреждении клеточной мембраны и вымывании внутриклеточного содержимого. Таким образом, оценка размера 3D клеточного сфероида после воздействия облучения не является надежным параметром и требует использования дополнительных методов анализа, включая анализ миграционной, клоногенной, пролиферативной и метаболической активности клеток.

Анализ клоногенной активности клеток из облученного сфероида является одним из стандартных способов оценки степени жизнеспособности сфероида в целом [38]. Анализ митотической активности дает возможность оценить количество цитогенетических повреждений опухолевых клеток, а также оценить прогресс роста опухолевого узла. Таким образом, использование нескольких взаимодополняющих методов исследования является оптимальной стратегией при формировании и валидации экспериментальных моделей для скрининга потенциальных радиосенсибилизаторов.

Заключение

В рамках данной работы проведен цикл работ по анализу дозового ответа 3D клеточных сфероидов, сформированных из культуры клеток меланомы мыши линии B_{16}/F_{10}, после облучения рентгеновским излучением и пучком протонов в пике Брэгга в широком диапазоне доз 0–12 Гр. Выявлено, что доза 2 Гр не оказывает статистически значимого снижения клоногенной активности клеток в облученном сфероиде, тогда как в диапазоне доз от 4 Гр и выше статистически достоверно снижается клоногенная активность клеток меланомы. Оптимальной дозой облучения для экспресс-скрининга потенциальных радиосенсибилизирующих агентов являются дозы в диапазоне 4–6 Гр как для рентгеновского излучения, так и для пучка протонов в пике Брэгга.

Благодарности

Облучение протонами выполнено в центре коллективного пользования на базе Комплекса протонной терапии «Прометеус». Облучение рентгеновскими лучами выполнено на базе ЦКП ФИЦ ПНЦБ РАН (Рентгеновская установка РУТ-15).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Djavid A.R., Stonesifer C., Fullerton B.T., et al. Etiologies of Melanoma Development and Prevention Measures: a Review of the Current Evidence. Cancers (Basel). 2021;13;19:4914. Doi: 10.3390/cancers13194914.
2. Domingues B., Lopes J.M., Soares P., Pópulo H. Melanoma Treatment in Review. Immunotargets Ther. 2018;7:35-49. Doi: 10.2147/ITT.S134842.
3. Arrangoiz R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. JCTR. 2016;4;1:1. Doi: 10.11648/j.jctr.20160401.11.
4. Zhou C., Louwman M., Wakkee M., et al. Primary Melanoma Characteristics of Metastatic Disease: a Nationwide Cancer Registry Study. Cancers. 2021;13;17:4431. Doi: 10.3390/cancers13174431.
5. Caldaria A., Giuffrida R., Di Meo N., et al. Diagnosis and Treatment of Melanoma Bone Metastasis: a Multidisciplinary Approach. Dermatologic Therapy. 2020;33:6. Doi: 10.1111/dth.14193.
6. Arnold M., Singh D., Laversanne M., et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. JAMA Dermatol. 2022;158;5:495-503. Doi: 10.1001/jamadermatol.2022.0160.
7. Deboever N., Feldman H.A., Hofstetter W.L., et al. The Role of Surgery in the Treatment of Melanoma Pulmonary Metastases in the Modern Era. Journal of Surgical Research. 2022;277:125-130. Doi: 10.1016/j.jss.2022.04.021.
8. Garbe C., Peris K., Hauschild A., et al. Diagnosis and Treatment of Melanoma. European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline – Update 2016. European Journal of Cancer. 2016;63:201-217. Doi: 10.1016/j.ejca.2016.05.005.
9. Benkhaled S., Schiappacasse L., Awde A., Kinj R. Stereotactic Radiosurgery and Stereotactic Fractionated Radiotherapy in the Management of Brain Metastases. Cancers. 2024;16;6:1093. Doi: 10.3390/cancers16061093.
10. Delaney G., Barton M., Jacob S. Estimation of an Optimal Radiotherapy Utilization Rate for Melanoma: a Review of the Evidence. Cancer. 2004;100;6:1293-1301. Doi: 10.1002/cncr.20092.
11. Strojan P. Role of Radiotherapy in Melanoma Management. Radiol Oncol. 2010;44;1:1-12. Doi: 10.2478/v10019-010-0008-x.
12. Chan A.W., Lin H., Yacoub I., Chhabra A.M., Choi J.I., Simone C.B. Proton Therapy in Uveal Melanoma. Cancers (Basel). 2024;16;20:3497. Doi: 10.3390/cancers16203497.
13. Lin A., Swisher-McClure S., Millar L.B., Kirk M., Yeager C., Kassaee A. Proton Therapy for Head and Neck Cancer: Current Applications and Future Directions. Transl Cancer Res. 2012;1: 255-263. Doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2012.12.01.
14. Gollrad J., Böker A., Vitzthum S., et al. Proton Therapy for 166 Patients with Iris Melanoma. Ophthalmology Retina. 2023;7;3:266-274. Doi: 10.1016/j.oret.2022.08.026.
15. Verma V., Mehta M.P. Clinical Outcomes of Proton Radiotherapy for Uveal Melanoma. Clinical Oncology. 2016;28;8:e17-e27. Doi: 10.1016/j.clon.2016.01.034.
16. Thariat J., Salleron J., Maschi C., et al. Oncologic and Visual Outcomes after Postoperative Proton Therapy of Localized Conjunctival Melanomas. Radiat Oncol. 2019;14;1:239. Doi: 10.1186/s13014-019-1426-6.
17. Zenda S., Kawashima M., Nishio T., et al. Proton Beam Therapy as a Nonsurgical Approach to Mucosal Melanoma of the

Head and Neck: a Pilot Study. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 2011;81;1:135-139. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.04.071.
18. McKay M.J., Kefford R.F. The Spectrum of in Vitro Radiosensitivity in Four Human Melanoma Cell Lines in not Accounted for by Differential Induction or Rejoining of DNA Double Strand Breaks. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics. 1995;31;2:345-352. Doi: 10.1016/0360-3016(94)E0147-C.
19. Rofstad E.K., Mathiesen B., Galappathi K. Increased Metastatic Dissemination in Human Melanoma Xenografts after Subcurative Radiation Treatment. Cancer Research. 2004;64;1:13-18. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2658.
20. Hirai T., Saito S., Fujimori H., et al. Radiosensitization by PARP Inhibition to Proton Beam Irradiation in Cancer Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016;478;1:234-240. Doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.062.
21. Wang L., Cao J., Wang X., et al. Proton and Photon Radiosensitization Effects of Niraparib, a PARP-1/-2 Inhibitor, on Human Head and Neck Cancer Cells. Head & Neck. 2020;42;9:2244-2256. Doi: 10.1002/hed.26155.
22. Luo X., Gao S., Sun K., Dong Z., Yang S. PARP Inhibitors as Radiosensitizers: a Comprehensive Review of Preclinical Evidence and Clinical Applications. Front Oncol. 2025;15:1702121. Doi: 10.3389/fonc.2025.1702121.
23. Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Ostrava, Czech Republic, Romanová M, Klát J. Adverse Events of PARP Inhibitors. Ceska Gynekol. 2021;86;1:54-60. Doi: 10.48095/cccg202154.
24. Babu B., Stoltz S.A., Mittal A., et al. Inorganic Nanoparticles as Radiosensitizers for Cancer Treatment. Nanomaterials. 2023;13;21:2873. Doi: 10.3390/nano13212873.
25. Matsumoto Y., Fukumitsu N., Ishikawa H., Nakai K., Sakurai H. A Critical Review of Radiation Therapy: from Particle Beam Therapy (Proton, Carbon, and BNCT) to Beyond. JPM. 2021;11;8:825. Doi: 10.3390/jpm11080825.
26. Ma J., Shen H., Mi Z. Enhancing Proton Therapy Efficacy through Nanoparticle-Mediated Radiosensitization. Cells. 2024;13;22:1841. Doi: 10.3390/cells13221841.
27. Bonvalot S., Rutkowski P.L., Thariat J., et al. NBTXR3, a First-in-Class Radioenhancer Hafnium Oxide Nanoparticle, Plus Radiotherapy Versus Radiotherapy Alone in Patients with Locally Advanced Soft-Tissue Sarcoma (Act.In.Sarc): a Multicentre, Phase 2–3, Randomised, Controlled Trial. The Lancet Oncology. 2019;20;8:1148-1159. Doi: 10.1016/S1470-2045(19)30326-2.
28. Wagner M., Koyasu S. A 3D Skin Melanoma Spheroid-Based Model to Assess Tumor-Immune Cell Interactions. Bio-Protocol. 2020;10;23. Doi: 10.21769/BioProtoc.3839.
29. Saleh N.A., Rode M.P., Sierra J.A., et al. Three-Dimensional Multicellular Cell Culture for Anti-Melanoma Drug Screening: Focus on Tumor Microenvironment. Cytotechnology. 2021;73;1:35-48. Doi: 10.1007/s10616-020-00440-5.
30. Cordeiro S., Oliveira B.B., Valente R., et al. Breaking the Mold: 3D Cell Cultures Reshaping the Future of Cancer Research. Front Cell Dev Biol. 2024;12:1507388. Doi: 10.3389/fcell.2024.1507388.
31. Kapałczyńska M., Kolenda T., Przybyła W., et al. 2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. Aoms. 2018 Jun;14;4:910-919. Doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
32. Sogomonyan A.S., Shipunova V.O., Soloviev V.D., Larionov V.I., Kotelnikova P.A., Deyev S.M. 3D Models of Cellular Spheroids as a Universal Tool for Studying the Cytotoxic Properties of Anticancer Compounds in Vitro. Acta Naturae. 2022;14;1:92-100. Doi: 10.32607/actanaturae.11603.
33. Raitanen J., Barta B., Hacker M., Georg D., Balber T., Mitterhauser M. Comparison of Radiation Response between 2D and 3D Cell Culture Models of Different Human Cancer Cell Lines. Cells. 2023;12;3:360. Doi: 10.3390/cells12030360.
34. Мысина Е.А., Колманович Д.Д. и др. Трехмерный клеточный сфероид как релевантная экспериментальная модель для скрининга потенциальных нанорадиосенсибилизаторов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т.70. №5. С. 11–17 [Mysina Ye.A., Kolmanovich D.D., et al. Three-Dimensional Cellular Spheroid as a Relevant Experimental Model for Screening Potential Nanoradiosensitizers. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost'* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70;5:11–17 (In Russ.)]. Doi: 10.33266/1024-6177-2025-70-5-11-17.
35. Мысина Е.А., Попова Н.Р. и др. Исследование влияния пучка протонов на динамику роста и жизнеспособность трехмерных клеточных сфероидов, сформированных из клеток карциномы 4Т1 // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т.70. №4. С. 16–20 [Mysina Ye.A., Popova N.R., et al. Study of the Effect of a Proton Beam on the Growth Dynamics and Viability of Three-Dimensional Cellular Spheroids Formed from 4T1 Carcinoma Cells. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost'* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70;4:16–20 (In Russ.)]. Doi: 10.33266/1024-6177-2025-70-4-16-20.
36. Sant S., Johnston P.A. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. Drug Discovery Today: Technologies. 2017;23:27-36. Doi: 10.1016/j.ddtec.2017.03.002.
37. Brüningk S.C., Rivens I., Box C., Oelfke U., Ter Haar G. 3D Tumour Spheroids for the Prediction of the Effects of Radiation and Hyperthermia Treatments. Sci Rep. 2020;10;1:1653. Doi: 10.1038/s41598-020-58569-4.
38. Kumar M., Nassour-Caswell L.C., Alrefai H., et al. A High-Throughput Neurosphere-Based Colony Formation Assay to Test Drug and Radiation Sensitivity of Different Patient-Derived Glioblastoma Lines. Cells. 2024;13;23:1995. Doi: 10.3390/cells13231995.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Статья подготовлена в рамках гранта РНФ № 22-73-10231-П, https://rscf.ru/project/22-73-10231-P/.

Участие авторов. *Е.А.Мысина* – работа со сфероидами (культивировнаие, облучение, анализ жизнеспособности), *А.Л. Попов*– научное редактирование текста, *А.Е. Шемяков* –дозиметрия на протонном терапевтическом комплексе «Прометеус», *Н.А. Пивоваров* – облучение сфероидов и дозиметрия на КПТ «Прометеус», *Б.А. Бокль* – облучение сфероидов на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15, *А.Л. Попов* – разработка дизайна исследования, научное руководство, написание манускрипта.

Поступила: 20.06.2026. Принята к публикации: 25.07.2026.

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

Financing. The article was prepared within the framework of the RSCF grant No. 22-73-10231-P, https://rscf.ru/project/22-73-10231-P/.

Contribution. *E.A.Mysina* – work with spheroids (cultivation, irradiation, viability analysis), A.L. Popov – scientific text editing, *A.E. Shemyakov* – dosimetry at the proton therapeutic complex "Prometheus", *N.A. Pivovarov* – irradiation of spheroids and dosimetry at the Prometheus CBT, *B.A. Bokle* – irradiation of spheroids at X-ray therapeutic unit RUT–15, *A.L. Popov* – research design development, scientific guidance, manuscript writing.

Article received: 20.06.2026. Accepted for publication: 25.07.2026.