



Praca poglądowa/Review paper

## Biologiczne aspekty śródoperacyjnej radioterapii i roli płynów pooperacyjnych w terapii raka piersi

### Biological aspects of intraoperative radiotherapy and role of wound fluids in the breast cancer treatment

Igor Piotrowski<sup>1</sup>, Katarzyna Kulcenty<sup>1,2</sup>,  
Dawid Murawa<sup>3</sup>, Wiktoria Suchorska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Radiobiology Laboratory, Department of Medical Physics, Greater Poland Cancer Centre, Poznań, Poland

<sup>2</sup>Department of Electroradiology, University of Medical Sciences, Poznań, Poland

<sup>3</sup>Oncological and General Surgery Department I, Greater Poland Cancer Centre, Poznań, Poland

---

#### Abstract

At the end of the last century ionizing radiation treatment became a viable alternative for radical mastectomy in treatment of breast cancer. However, small doses of radiation delivered to the whole breast after the surgical removal of the tumor can cause damage to the tissue surrounding the tumor. To minimize that damage and reduce the duration of the treatment, high single dose radiation administered intraoperatively to the tumor bed has been developed. Although the direct effect of the ionizing radiation on cancer cells has been described in many experiments, the indirect effect and the effect on tumor microenvironment are not so often discussed. Although irradiation works mainly by directly killing cancer cells remaining after the surgery, it has been shown that unirradiated cells adjacent to them are also affected. This bystander effect is mediated through cell-to-cell junctions and soluble factors like pro-inflammatory cytokines, growth factors and pro-angiogenic factors, which are capable of changing the dynamics of tumor growth. Radiotherapy also exerts its effect on cancer cells by altering the biology of tumor microenvironment. Changes in the molecular composition of wound fluid that accumulates after surgery and changes to the breast stroma caused by ionizing radiation can significantly change the microenvironment. Full understanding of the molecular processes that occur after the irradiation of tumor bed is of crucial importance for safe usage of intraoperative radiotherapy.

*Słowa kluczowe:* rak piersi, radioterapia, biologia molekularna, radioterapia śródoperacyjna

*Keywords:* breast cancer, radiotherapy, molecular biology, intraoperative radiotherapy

---

dr. n. med. Katarzyna Kulcenty

Pracownia Radiobiologii, Department of Medical Physics,

Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, Polska

Telefon: +48618850476

e-mail: [katarzyna.kulcenty@wco.pl](mailto:katarzyna.kulcenty@wco.pl)

## Wstęp

W ciągu ostatniego stulecia radykalna mastektomia stanowiła główną metodę terapii pacjentów z nowotworem piersi. Dopiero pod koniec dwudziestego wieku mastektomia została zastąpiona przez zastosowanie oszczędzającego zabiegu chirurgicznego połączonego z frakcjonowaną radioterapią zewnętrzną (ang. *external beam radiation therapy*, EBRT), co znacznie obniżyło ryzyko wystąpienia u pacjentów wznowy miejscowej [1]. Pomimo osiągania dobrych wyników leczenia bez występowania ciężkich skutków ubocznych, czas trwania terapii EBRT stanowi poważne ograniczenie. Pacjenci mieszkający w dużej odległości od ośrodka radioterapii lub pacjenci wycieńczeni po przebytej chemioterapii często nie otrzymują radioterapii po wycięciu guza lub poddawani są zabiegowi mastektomii [2]. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie śródoperacyjnej radioterapii (ang. *intraoperative radiotherapy*, IORT), która podawana jest w jednej dawce w trakcie zabiegu chirurgicznego do łoży po wycięciu guza. Rezultaty badań klinicznych ELIOT i TARGIT-A pokazały, że zastosowanie tej metody w odpowiednio wyselekcjonowanej grupie pacjentów może przynieść lepsze wyniki niż zastosowanie techniki EBRT [3, 4]. Jednak efekty działania śródoperacyjnej radioterapii na mikrośrodowisko guza nie są dobrze poznane. Wykazano, że proces zapalny wywołany zabiegiem chirurgicznym może stymulować wzrost pozostałych po zabiegu operacyjnym komórek nowotworowych [5]. Co więcej, najnowsze wyniki badań sugeruje, że proces ten może być hamowany poprzez zastosowanie radioterapii [6]. Lepsze zrozumienie interakcji zachodzących pomiędzy komórkami nowotworu piersi i mikrośrodowiskiem guza w odpowiedzi na napromieniowanie może pozwolić na odkrycie nowych strategii terapii nowotworów piersi.

## Bezpośredni wpływ promieniowania jonizującego na komórki raka piersi

Choć wyniki badań klinicznych ELIOT i TARGIT opartych na IORT są bardzo obiecujące, wiedza o biologicznych i molekularnych efektach tej terapii pozostaje w dużej mierze niepoznana. Jedne z pierwszych badań *in vitro* dotyczyły analizy porównawczej efektu biologicznego wywołanego przez wysokie dawki promieniowania jonizującego: 9 Gy i 23 Gy (odpowiednio dawka używana przy podaniu IORT jako „boost” przed dalszą radioterapią zewnętrzną i dawka używana przy podaniu IORT jako jedynej radioterapii). W swoich badaniach Bravata i wsp. (2015) zastosowali linię komórkową raka piersi MCF-7 [7]. Jest to linia komórek typu luminalnego, posiadająca niewielki odsetek nowotworowych komórek macierzystych, wykazująca ekspresję receptorów estrogenu i progesteronu i brak ekspresji receptora HER2 [8, 9]. Wykazano, że na skutek dawki promieniowania, w badanych komórkach dochodziło do indukcji podwójnych pęknięć DNA, mierzonych przez fosforylację seryny 139 na histonie H2AX ( $\gamma$ H2AX) [7]. Ich ilość korelowała z wartością dawki promieniowania. Dodatkowo analiza mikroskopowa połączona z analizą aktywności  $\beta$ -galaktozydazy wykazały zmiany morfologiczne charakterystyczne dla komórek starzejących się. Analiza genetyczna komórek napromieniowanych dawką 9 Gy wykazała wzrost ekspresji genów zaangażowanych w regulację ekspresji genów, cyklu komórkowego i procesów zapalnych oraz obniżenie ekspresji genów związanych ze ścieżkami sygnalizacji komórkowej i z modulacją przebiegu apoptozy. Komórki traktowane dawką 23 Gy wykazywały wzrost ekspresji genów zaangażowanych w śmierć komórkową oraz obniżenie ekspresji genów związanych z histonami i genów zaangażowanych w aktywację cyklu komórkowego. Wyniki analiz ekspresji genów z użyciem mikromacierzy wskazały, że odpowiedź komórek raka piersi na promieniowanie jonizujące zależy od wysokości podanej dawki. Co więcej wykazano udział jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF $\kappa$ B), który wiążąc się do DNA prowadzi do zmian w regulacji cyklu komórkowego i supresji apoptozy [10].

Badaniem molekularnych skutków działania niższych dawek promieniowania w tym samym modelu badawczym zajmowali się Bong Cho Kim i wsp. [11]. Podobnie jak w przypadku wyższych dawek promieniowania zaobserwowano zależne od zastosowanej dawki promieniowania zmiany morfologiczne charakterystyczne dla fenotypu komórek starzejących się [7]. Warto wspomnieć, że przyspieszenie procesu starzenia się komórek może być jednym z głównych czynników wpływających na utratę zdolności reprodukcyjnych nowotworów litych [12]. Komórki napromieniowane dawką 6 Gy wykazywały wzrost ekspresji genów utrudniających zarówno formowanie włókien stresowych zbudowanych z aktyny jak i formowanie przyczepów

ogniskowych. Ponadto w napromieniowanych komórkach zmianie uległa ekspresja genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, na przykład ekspresja regulatora cyklu komórkowego BTG1 (ang. *B-cell translocation gene 1*, anti-proliferative), którego poziom jest zwiększony w fazie G<sub>0</sub> i obniżony w fazie G<sub>1</sub> [13]. W napromieniowanych komórkach zaobserwowano również zmiany w ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z regulacją cyklu komórkowego, na przykład obniżenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego 2 z rodziny E2F (ang. *E2F transcription factor 2*, E2F2) odpowiedzialnego za aktywację genów niezbędnych do przejścia punktu kontrolnego G<sub>1</sub>/S [14] oraz czynnika transkrypcyjnego M1 z rodziny forkhead box (ang. *Forkhead box M1*, FOXM1) odpowiedzialnego za regulację genów związanych z fazą G<sub>2</sub> cyklu komórkowego [15]. Zmiany te spowodowały zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach S i G<sub>2</sub>/M. Na zahamowanie aktywności mitotycznej wskazywał również fakt, że działanie promieniowania na komórki nowotworowe powodowało obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za strukturę mikrotubul oraz za organizację i biogenezę wrzeciona kariokinetycznego [11].

### Pośredni wpływ promieniowania jonizującego na komórki raka piersi

Promieniowanie jonizujące wpływa bezpośrednio na komórki uszkodzając DNA i w konsekwencji zmieniając fenotyp komórki. Bezpośrednie działania promieniowania jonizującego na komórki nowotworu piersi zostały opisane przez wielu autorów [16, 17]. Poza działaniem bezpośrednim, efekt promieniowania może być także obserwowany w komórkach, które nie uległy napromienianiu, będących w sąsiedztwie komórek napromieniowanych. Ten fenomen nazwany został „efektem sąsiedztwa” (ang. *radiation induced bystander effect*, RIBE) i obserwowany jest w wielu typach komórek na kilku poziomach biologicznych (uszkodzenie DNA, niestabilność genomowa, transformacja nowotworowa, śmierć komórki) [18-21]. RIBE związany jest ze zmianami w obrębie błony komórkowej i wytwarzaniem rozpuszczalnych sygnałów immunologicznych, które inicjują efektywną odpowiedź immunologiczną – odpowiedź immunologiczną na indukowany promieniowaniem jonizującym stres [22]. Efekt RIBE jest przynajmniej w części zależny od odpowiedzi immunologicznej. Poznanych jest wiele mechanizmów popromiennego efektu sąsiedztwa, jednym z najważniejszych jest indukcja uszkodzeń DNA przez reaktywne formy tlenu związana z działaniem odpowiedzi zapalnej [23]. Chociaż zmiany mikrośrodowiska guza mogą spowalniać tempo wzrostu guza, badania wskazują, że mediatory popromiennego efektu sąsiedztwa mogą również powodować przyspieszenie wzrostu nowotworu [24]. Tsai i wsp. zbadali działanie promieniowania jonizującego na komórki zrębu piersi oraz na hodowane w ich obecności komórki nowotworowe [25]. Interakcje zostały zbadane w przestrzennej kokulturze fibroblastów wystawionych na chroniczne działanie niskich dawek promieniowania z nienapromieniowanymi komórkami nowotworu piersi linii MDA-MB-231 oraz z komórkami epitelialnej linii prawidłowych komórek gruczołu piersiowego MCF-10A. Fibroblasty poddane działaniu promieniowania wykazywały cechy charakterystyczne dla fenotypu komórek starzejących się jak wzrost aktywności β-galaktozydazy, poziomu białka p16 i wzrost autofluorescencji. W kokulturze z prawidłowymi fibroblastami komórki MCF-10A tworzyły zorganizowane, rozbudowane struktury kanalikowe. Komórki MCF-10A, które hodowane były w kokulturze z fibroblastami o fenotypie komórek starzejących się, nie wytwarzały struktur kanalikowych, a zamiast tego formowały powiększone i zdeorganizowane cysty. W kokulturze z MDA-MB-231 fibroblasty wydzielają metaloproteinazy degradujące macierz, które wpływają na inwazyjność komórek nowotworowych piersi. Autorzy wskazują, że akumulacja fibroblastów starzejących się w zrębie piersi może tworzyć środowisko zaburzające powstawanie prawidłowych struktur kanalikowych i promujące inwazyjność komórek nowotworowych piersi [26].

Ważną rolę w działaniu RIBE na komórki nienapromieniowane odgrywają mediatory wydzielane do mikrośrodowiska przez komórki nowotworowe. Veldwijk i wsp. wykazali, że komórki nowotworu piersi linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 poddane działaniu promieniowania o dawce 5, 10 lub 15Gy wydzielają do medium hodowlanego mediatory RIBE wpływające na zdolność do tworzenia kolonii nienapromieniowanych komórek. Medium zebrane znad hodowli napromieniowanych komórek nowotworu piersi linii MDA-MB-231 oraz MCF-7 po podaniu komórkom nienapromieniowanym wywoływało zależny od dawki efekt obniżający zdolność komórek do wzrostu jako kolonii. Takie medium posiadało również zdolność do wydłużenia czasu, w którym poziom γH2AX w komórkach MCF-7 jest podwyższony, co wskazuje na wydłużenie procesów naprawy DNA

[27]. Badanie to pokazuje, że efekty pośrednie promieniowania znacznie zwiększają efektywność radioterapii podawanej w wysokich dawkach, jak w przypadku IORT.

### Zmiany w mikrośrodowisku nowotworu

Wystąpienie wznowy ogniska pierwotnego jest uznawane za jeden z głównych czynników decydujących o przeżyciu pacjentów z nowotworem piersi [28]. Większość wznów miejscowych występuje w tym samym kwadrancie, w którym nowotwór pojawił się pierwotnie, co wskazuje na możliwość zaangażowania komórek nowotworowych pozostałych w łożu po wycięciu guza [29]. Wykazano, że zabieg chirurgiczny usunięcia guza zmienia kinetykę pojawienia się mikrometastazy nowotworu piersi [30]. Potwierdza to wcześniej postawioną hipotezę, że sam zabieg chirurgiczny jest czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia przerzutów, co udowodniono na modelach zwierzęcych [31, 32]. Dodatkowo wykazano, że płyn pooperacyjny wytwarzający się w miejscu zabiegu chirurgicznego po usunięciu guza piersi, indukuje proliferację HER2 pozytywnych komórek raka piersi w warunkach *in vitro* [6, 29]. Przewaga występowania przerzutów w obrębie blizny pooperacyjnej zainicjowała szereg badań naukowych, a w ich konsekwencji badań klinicznych, których celem była ocena, czy zlokalizowana radioterapia, jaką jest radioterapia śródoperacyjna, będzie bardziej skuteczna w hamowaniu powstania lokalnej wznowy niż standardowa pooperacyjna radioterapia całej piersi. Uzasadnieniem takiego podejścia jest fakt, że wzrost dawki promieniowania powoduje zwiększenie lokalnej kontroli nowotworu (ang. *local tumor control*), co jest podstawowym celem radioterapii. Badania przeprowadzone przez Beletti i wsp. wskazują, że zastosowanie radioterapii śródoperacyjnej (badanie kliniczne TARGIT) modyfikuje właściwości płynu pooperacyjnego uzyskanego z drenażu rany (ang. *wound fluid*, WF) [6]. Komórki linii nowotworu piersi hodowane w obecności WF zebranego od pacjentek, które zostały poddane IORT, charakteryzowały się znacząco upośledzoną zdolnością ruchu, inwazyjnością oraz zdolnością do wzrostu w kulturze przestrzennej w porównaniu z kulturą komórek linii nowotworowej w obecności WF zebranego od pacjentek, które nie otrzymały IORT. Analiza profilu białkowego WF zebranego od pacjentek po IORT wykazała obniżony poziom białek związanych ze wzrostem i ruchliwością nowotworu. Wyniki te pokazują, że zastosowanie radioterapii wpływa na komórki nowotworu piersi poprzez indukcję zmian w mikrośrodowisku guza.

Płyn pooperacyjny posiada właściwości stymulujące wzrost komórek nowotworu piersi, jednakże mechanizmy tej stymulacji nie są dobrze poznane [29]. Badania przeprowadzone przez Segatto i wsp. udowodniły, że stymulacja komórek nowotworu piersi za pomocą płynu drenażowego zebranego od pacjentek po wycięciu guza aktywuje ścieżkę przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) w tych komórkach [33]. Ścieżka STAT3 odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację, samoodnowę, różnicowanie, apoptozę i przeżycie komórek [34] oraz ma wpływ na wzrost i progresję komórek nowotworu piersi [35, 36]. Autorzy udowodnili, że komórki różnych podtypów patologicznych raka piersi (linie bazalne MDA-MB-231 i MDA-MB-468, luminalna MCF-7 i pozytywna dla HER-2 BT-474), którym podano płyn drenażowy wykazują większą zdolność do wzrostu w hodowli 3D (mammosfery) niż komórki, którym podano standardowo używany stymulator hodowli 3D – czynnik wzrostu naskórki (ang. *epidermal growth factor*, EGF). Zastosowanie inhibitorów STAT3 spowodowało obniżenie zdolności do formowania mammosfer indukowanej przez WF. Stymulacja WF wykazuje również zdolność do wzbogacania populacji komórek nowotworowych w komórki inicjujące wzrost nowotworu, co sugeruje, że płyn ten ma wysokie właściwości indukujące wystąpienie wznowy miejscowej. Wyniki te zostały także potwierdzone w warunkach *in vivo*. Wyciszenie szlaku STAT3 spowodowało opóźnienie formowania się nowotworu i obniżyło jego szybkość proliferacji. Dodatkowo znacząco obniżyło częstość wystąpienia wznowy miejscowej po wycięciu guza w modelu mysim [37].

Stymulacja komórek nowotworowych płynem drenażowym w warunkach *in vitro* spowodowała wzbogacenie komórek w populację CD44+/CD24-/low, która ma większe zdolności do tworzenia nowotworów oraz właściwości charakterystyczne dla komórek macierzystych [38][46-47][Zaleska et al. Oncology Letters, w druku]. Wpływ stymulacji komórek płynem drenażowym na ekspresję markerów CD44 i CD24

w dużym stopniu zależał od zastosowanej linii komórkowej. Po podaniu WF potrójnie negatywnym liniom komórkowym BT-549 i MDA-MB-468 populacja CD44+/CD24-/low zwiększyła się, zaś po podaniu IR-WF (ang. *irradiated wound fluid*) populacja ta zmalała. Komórki linii SK-BR-3 wykazywały wzrost populacji CD44+/CD24-/low zarówno po stymulacji WF jak i IR-WF, zaś komórki luminalnej linii MCF-7 wykazały obniżenie populacji CD44+/CD24-/low po stymulacji WF i IR-WF. Wyniki te pokazują, że zabieg wycięcia guza może wpływać na macierzystość komórek nowotworu piersi.

Innym czynnikiem mającym znaczący wpływ na nowotworzenie jest aktywność kinazy serynowo treoninowej - p70S6K, zaangażowanej w regulację wzrostu, przeżycia i metabolizmu komórek [39]. W pierwotnych nowotworach piersi amplifikacja regionu 17q23 zawierającego region kodujący p70S6K została zaobserwowana w 12.5% przypadków [40]. Zwiększona aktywność tego białka jest związana z przeżyciem komórek nowotworowych pozostałych w łożu guza po jego wycięciu. Rola p70S6K w powstawaniu wznów nowotworu piersi została potwierdzona eksperymentalnie przez wszczepienie myszy komórek nowotworowych piersi, w których wywołano obniżenie aktywności kinazy p70S6K [37]. Segatto i wsp. udowodnili, że stymulacja komórek linii nowotworowych piersi za pomocą płynu drenażowego powoduje wzrost aktywności p70S6K [40]. Autorzy pokazali również, że komórki linii nowotworu piersi, u których wywołano obniżenie aktywności p70S6K, po wszczepieniu do myszy formowały guzy wolniej i wykazywały zmniejszoną inwazyjność do okolicznych tkanek w porównaniu z komórkami z nie zmienioną aktywnością p70S6K. Komórki z obniżoną aktywnością p70S6K hodowane w warunkach *in vitro* wykazywały obniżoną przeżywalność, tempo wzrostu i zdolność do proliferacji nawet po stymulacji WF. Autorzy wskazują, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego z rodziny onkogenów związanych z glejakiem (ang. *glioma-associated oncogene family zinc finger 1*, Gli1) (czynnik transkrypcyjny zwiększający proliferację) i wzrost ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl2 (ang. *B-cell lymphoma*) wywołane aktywnością p70S6K są odpowiedzialne za zdolność do przeżywania komórek nowotworowych w niekorzystnych warunkach *in vitro* [41]. Rola jaką p70S6K odgrywa w tempie wzrostu guza pierwotnego, ucieczce komórek przed apoptozą i zdolności do przeżycia w niekorzystnych warunkach sprawia, że kinaza ta może stać się celem terapii nowotworów piersi, zaś obniżenie jej aktywności mogłoby pomóc w zmniejszeniu częstości występowania wznów miejscowych.

## Wnioski

Obecnie 5-tygodniowa radioterapia zewnętrzna poprzedzona wycięciem guza jest standardową terapią stosowaną w leczeniu nowotworów piersi. Metoda ta daje porównywalne rezultaty do mastektomii, przez co stosowana jest jako alternatywa wywołująca mniejsze obciążenie pacjenta [42]. Koncepcja zastosowania jednej dawki promieniowania podanej jedynie do łożu guza powstała w oparciu o fakt, że większość wznów miejscowych pojawia się w regionie ogniska pierwotnego [43, 44]. Badanie mikrośrodowiska guza po napromieniowaniu może pomóc w zrozumieniu jego wpływu na wzrost i progresję nowotworu. Udowodniono, że wysokie dawki promieniowania działają nie tylko poprzez bezpośrednie wywoływanie uszkodzeń DNA ale również pobudzają immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową związaną z limfocytami T, a także zwiększają populację aktywowanych limfocytów T [24, 45]. Śródoperacyjna radioterapia podawana do łożu guza po jego wycięciu wpływa na ekspresję białek zawartych w płynie drenażowym znacząco zmniejszając jego zdolność do przyspieszania wzrostu guza [6]. Jako że działanie wielu cytokin i chemokin nie jest do końca poznane, zmiany zachodzące w mikrośrodowisku wywoływane przez promieniowanie mogą mieć efekt zarówno hamujący jak i przyspieszający wzrost komórek nowotworowych. Właśnie dlatego poznanie wpływu promieniowania na nowotwór i jego środowisko jest kluczowe dla oceny wpływu terapii IORT na zdrowie pacjenta.

## Konflikt interesu / Conflict of interest

Autorzy potwierdzają brak konfliktu interesów.

## Finansowanie / Financial support

Praca została sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki [nr grantu: 2015/19/D/NZ5/02190].

## Piśmiennictwo / References

- [1] Veronesi U, Luini A, Del Vecchio M, Greco M, Galimberti V, Merson M, Rilke F, Sacchini V, Saccozzi R, Savio T et al: Radiotherapy after breast-preserving surgery in women with localized cancer of the breast. *The New England journal of medicine* 1993, 328(22):1587-1591.
- [2] Athas WF, Adams-Cameron M, Hunt WC, Amir-Fazli A, Key CR: Travel distance to radiation therapy and receipt of radiotherapy following breast-conserving surgery. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, 92(3):269-271.
- [3] Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P, Viale G, Rotmensz N, Sangalli C, Luini A, Veronesi P, Galimberti V, Zurrida S et al: Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial. *The Lancet Oncology* 2013, 14(13):1269-1277.
- [4] Vaidya JS, Wenz F, Bulsara M, Tobias JS, Joseph DJ, Keshtgar M, Flyger HL, Massarut S, Alvarado M, Saunders C et al: Risk-adapted targeted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the TARGIT-A randomised trial. *Lancet* 2014, 383(9917):603-613.
- [5] Troester MA, Lee MH, Carter M, Fan C, Cowan DW, Perez ER, Pirone JR, Perou CM, Jerry DJ, Schneider SS: Activation of host wound responses in breast cancer microenvironment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, 15(22):7020-7028.
- [6] Belletti B, Vaidya JS, D'Andrea S, Entschladen F, Roncadin M, Lovat F, Berton S, Perin T, Candiani E, Reccanello S et al: Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008, 14(5):1325-1332.
- [7] Bravata V, Minafra L, Russo G, Forte GI, Cammarata FP, Ripamonti M, Casarino C, Augello G, Costantini F, Barbieri G et al: High-dose Ionizing Radiation Regulates Gene Expression Changes in the MCF7 Breast Cancer Cell Line. *Anticancer research* 2015, 35(5):2577-2591.
- [8] Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepak T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG et al: The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer : basic and clinical research* 2010, 4:35-41.
- [9] Yan W, Chen Y, Yao Y, Zhang H, Wang T: Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44+/CD24- breast cancer MCF7 cells in vitro and in nude mice. *Cancer cell international* 2013, 13(1):62.
- [10] Veeraraghavan J, Natarajan M, Aravindan S, Herman TS, Aravindan N: Radiation-triggered tumor necrosis factor (TNF) alpha-NFkappaB cross-signaling favors survival advantage in human neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 2011, 286(24):21588-21600.
- [11] Kim BC, Han NK, Byun HO, Kim SS, Ahn EK, Chu IS, Leem SH, Lee CK, Lee JS: Time-dependently expressed markers and the characterization for premature senescence induced by ionizing radiation in MCF7. *Oncology reports* 2010, 24(2):395-403.
- [12] Gewirtz DA, Holt SE, Elmore LW: Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochemical pharmacology* 2008, 76(8):947-957.
- [13] Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP: BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *The EMBO journal* 1992, 11(4):1663-1670.
- [14] Laresgoiti U, Apraiz A, Olea M, Mitxelena J, Osinalde N, Rodriguez JA, Fullaondo A, Zubiaga AM: E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes. *Nucleic acids research* 2013, 41(22):10185-10198.

- [15] Sanders DA, Gormally MV, Marsico G, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S: FOXM1 binds directly to non-consensus sequences in the human genome. *Genome biology* 2015, 16:130.
- [16] Goodhead DT: Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology* 1994, 65(1):7-17.
- [17] Henner WD, Grunberg SM, Haseltine WA: Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 1982, 257(19):11750-11754.
- [18] Azzam EI, De Toledo SM, Spitz DR, Little JB: Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer research* 2002, 62(19):5436-5442.
- [19] Nagasawa H, Cremesti A, Kolesnick R, Fuks Z, Little JB: Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer research* 2002, 62(9):2531-2534.
- [20] Prise KM, Folkard M, Kuosaitis V, Tartier L, Zyuzikov N, Shao C: What role for DNA damage and repair in the bystander response? *Mutation research* 2006, 597(1-2):1-4.
- [21] Prise KM, Folkard M, Michael BD: Radiation-induced bystander and adaptive responses in cell and tissue models. Dose-response : a publication of International Hormesis Society 2006, 4(4):263-276.
- [22] Prise KM, O'Sullivan JM: Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2009, 9(5):351-360.
- [23] Sprung CN, Ivashkevich A, Forrester HB, Redon CE, Georgakilas A, Martin OA: Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects. *Cancer letters* 2015, 356(1):72-81.
- [24] Park B, Yee C, Lee KM: The effect of radiation on the immune response to cancers. *International journal of molecular sciences* 2014, 15(1):927-943.
- [25] Tsai KK, Chuang EY, Little JB, Yuan ZM: Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. *Cancer research* 2005, 65(15):6734-6744.
- [26] Lara PC, Lopez-Penalver JJ, Farias Vde A, Ruiz-Ruiz MC, Oliver FJ, Ruiz de Almodovar JM: Direct and bystander radiation effects: a biophysical model and clinical perspectives. *Cancer letters* 2015, 356(1):5-16.
- [27] Veldwijk MR, Zhang B, Wenz F, Herskind C: The biological effect of large single doses: a possible role for non-targeted effects in cell inactivation. *PloS one* 2014, 9(1):e84991.
- [28] Huston TL, Simmons RM: Locally recurrent breast cancer after conservation therapy. *American journal of surgery* 2005, 189(2):229-235.
- [29] Tagliabue E, Agresti R, Carcangiu ML, Ghirelli C, Morelli D, Campiglio M, Martel M, Giovanazzi R, Greco M, Balsari A et al: Role of HER2 in wound-induced breast carcinoma proliferation. *Lancet* 2003, 362(9383):527-533.
- [30] Komoike Y, Akiyama F, Iino Y, Ikeda T, Tanaka-Akashi S, Ohsumi S, Kusama M, Sano M, Shin E, Suemasu K et al: Analysis of ipsilateral breast tumor recurrences after breast-conserving treatment based on the classification of true recurrences and new primary tumors. *Breast cancer* 2005, 12(2):104-111.
- [31] Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G: Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? *British journal of cancer* 2001, 85(4):490-492.
- [32] Tsuchiya Y, Sawada S, Yoshioka I, Ohashi Y, Matsuo M, Harimaya Y, Tsukada K, Saiki I: Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery* 2003, 133(5):547-555.
- [33] Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, Perin T, Piccoli E, Colombatti A, Vecchione A, Baldassarre G, Belletti B: Surgery-induced wound response promotes stem-like and tumor-initiating features of breast cancer cells, via STAT3 signaling. *Oncotarget* 2014, 5(15):6267-6279.
- [34] Bromberg J: Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast cancer research : BCR* 2000, 2(2):86-90.
- [35] Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R et al: The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation* 2011, 121(7):2723-2735.
- [36] Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang

- X et al: The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis. *Neoplasia* 2013, 15(7):848-862.
- [37] Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, D'Andrea S, Perin T, Fabris L, Armenia J, Rampioni G, Lovisa S et al: Inhibition of breast cancer local relapse by targeting p70S6 kinase activity. *Journal of molecular cell biology* 2013, 5(6):428-431.
- [38] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(7):3983-3988.
- [39] Fenton TR, Gout IT: Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2011, 43(1):47-59.
- [40] Monni O, Barlund M, Mousses S, Kononen J, Sauter G, Heiskanen M, Paavola P, Avela K, Chen Y, Bittner ML et al: Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(10):5711-5716.
- [41] Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, Fabris L, Armenia J, Mileto M, Colombatti A, Vecchione A, Baldassarre G et al: p70S6 kinase mediates breast cancer cell survival in response to surgical wound fluid stimulation. *Molecular oncology* 2014, 8(3):766-780.
- [42] Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Galimberti V, Luini A, Veronesi P, Salvadori B, Zucali R: Radiotherapy after breast-conserving surgery in small breast carcinoma: long-term results of a randomized trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2001, 12(7):997-1003.
- [43] Warenczak-Florczak Z, Roszak A, Bratos K, Milecki P, Karczewska-Dzionk A, Wlodarczyk H: Intraoperative radiation therapy as part of breast conserving therapy of early breast cancer-Results of one-year follow-up. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* 2013, 18(2):107-111.
- [44] Niziolek A, Murawa D: Diagnostic value of intraoperative histopathological examination of the sentinel nodes in breast cancer and skin melanoma-Preliminary results of single centre retrospective study. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* 2013, 18(4):245-249.
- [45] Kaur P, Asea A: Radiation-induced effects and the immune system in cancer. *Frontiers in oncology* 2012, 2:191.
- [46] Zaleska K, Bajon Sz: Cancer stem cells:the more we know, the more questions arise. *Letters in Oncology Science* 2013, 10(4):93-98.
- [47] Suchorska WM, Mieloch AA: Stem cells differentiation and ionizing radiation. *Letters in Oncology Science* 2015, 12(3):54-61.