

Хематопоеза. Канцерогенеза и онкологични заболявания на кръвта. Стохастични ефекти на йонизиращата радиация. Вторична левкемия – възможният здравен риск

Галина Рачева

НИИ по Радиационна защита и радиобиология,
Военномедицинска академия, София

Резюме

Процесът на формиране на диференцирани кръвни клетки от недиференцирани предшественици се нарича хематопоеза. Когато възникнат мутации в прогениторните клетки предшественици на кръвните клетки се развиват хемобластози. Причините за тази злокачествена трансформация са комплексни – експресия на онкогени, отключване на биохимични сигнални каскадни пътища, които насочват клетката към делене, инхибиране експресията на туморсупресорни гени. Увеличената пролиферация води до развитие на онкологично заболяване.

Йонизиращите лъчения увреждат облъчваните живи системи чрез предаване на известно количество енергия на изграждащите ги молекули. Крайният резултат от цялата верига от процеси са лъчевите увреждания. Стохастичните ефекти от действието на йонизиращата радиация представляват вероятностни ефекти, предизвикани от действие на йонизиращи лъчения след дълъг период от време. Проявяват се като канцерогенеза и наследствени (генетични) ефекти в поколението. В резултат на излагане на действие на йонизиращо лъчение за дълъг период от време е възможно да нарасне честотата на възникване на такива неопластични трансформации. Възможен сценарий е развитие на вторично онкологично заболяване (напр. вторична левкемия), след продължителна лъчетерапия на първичното малигнено заболяване. Лъчетерапията е основен метод за лечение на онкологични заболявания и има добре установена роля, но след прилагането ѝ съществува риск от развитие на вторично онкологично заболяване.

Целта на научния обзор е да обобщи научното познание за малигнената трансформация на хематопоеични клетки и развитие на онкологично заболяване като стохастичен ефект от действие на йонизираща радиация, за да се установи важността от периодичен мониторинг на пациенти в риск.

Ключови думи: хематопоеза, малигнена трансформация, йонизираща радиация, стохастични ефекти, вторична левкемия

Hematopoiesis. Carcinogenesis and blood oncology diseases. Stochastic effects of ionizing radiation. Secondary leukemia – the possible health risk

Galina Racheva

Research Laboratory of Radiation Protection and Radiobiology,
Military Medical Academy, Sofia

Abstract

The process of developing differentiated blood cells from undifferentiated progenitors is called hematopoiesis. Hemoblastoses develop when mutations occur in progenitor cells, which are the precursors of blood cells. The reasons for this malignant transformation are complex – expression of oncogenes, unlocking of biochemical signaling cascade pathways that direct the cell to divide, inhibition of the expression of tumor suppressor genes. Increased proliferation leads to the development of cancer.

Ionizing radiation affects the irradiated living systems by transferring a certain amount of energy to their molecules. The end result of the entire chain of processes is radiation damage. Stochastic effects of ionizing radiation are probabilistic effects caused by exposure to ionizing radiation over a long period of time. They occur as carcinogenesis and hereditary (genetic) effects in the generation. As a result of exposure to ionizing radiation for a long period of time, it is possible to increase the frequency of occurrence of such neoplastic transformations. A possible scenario is the development of a secondary oncological disease (e.g., secondary leukemia), after long-term radiotherapy of the primary malignant disease. Radiotherapy is the main method of treatment of oncological diseases and has a well-established role, but after its application there is a risk of developing a secondary oncological disease.

The aim of the scientific review is to summarize the scientific knowledge about the malignant transformation of hematopoietic cells and the development of oncological disease as a stochastic effect of action of ionizing radiation, in order to establish the importance of periodic monitoring of patients at risk.

Keywords: hematopoiesis, malignant transformation, ionizing radiation, stochastic effects, secondary leukemia

Кореспонденция:

Галина Рачева, гм
e-mail: galina_ra4eva@abv.bg

Correspondence:

Ms. Galina Racheva, PhD
e-mail: galina_ra4eva@abv.bg

Въведение

Процесът на формиране на диференцирани кръвни клетки от недиференцирани предшественици се нарича хематопоеза. Кръвта се състои от два основни компонента – кръвна плазма и формени елементи (кръвни клетки). Когато възникнат мутации в прогениторните клетки предшественици на кръвните клетки се развиват хемобластози [1]. В резултат на възникване на мутации в прекурсорни клетки от лимфоидния или миелоидния ред е възможно клетките да преминат от процес на диференциация към активна пролиферация, което води до морфологични и физиологични промени на тъкани и органи. Причините за тази злокачествена трансформация са комплексни – експресия на онкогени, отключване на биохимични сигнални каскадни пътища, които насочват клетката към делене, инхибиране експресията на туморсупресорни гени. Увеличената пролиферация води до развитие на онкологично заболяване.

Йонизиращите лъчения увреждат облъчваните живи системи чрез предаване на известно количество енергия на изграждащите ги молекули. Крайният резултат от цялата верига от процеси са лъчевите увреждания [2]. Ефектите от облъчването могат да включват увреждане в ДНК и генетични мутации, възникване на хромозомни аберации, клетъчна смърт, нарушения в клетъчния цикъл, нарушения в механизмите на репарация на ДНК, неопластична трансформация, канцерогеназа и други. Стохастичните ефекти от действието на йонизиращата радиация представляват вероятностни ефекти, предизвикани от действие на йонизиращи лъчения след дълъг период от време. Проявяват се като канцерогенеза и наследствени (генетични) ефекти в поколението. В резултат на излагане на действие на йонизиращо лъчение за дълъг период от време е възможно да нарасне честотата на възникване на такива неопластични трансформации, което да доведе до формиране на злокачествено образуване (тумор) [3]. Възможен сценарий е развитие на вторично онкологично заболяване (напр. вторична левкемия), след продължителна лъчетерапия на първичното малигнено заболяване [4].

Цел

Целта на научния обзор е да обобщи научното познание за малигнената трансформация на хематопоеични клетки и развитие на онкологично заболяване като стохастичен ефект от действие на йонизираща радиация, за да се установи важността от периодичен мониторинг на пациенти в риск.

Хематопоеза

Кръвните клетки произлизат от общи мултипотентни прогениторни стволови клетки, които са незрели и пролифериращи. Човешкото тяло притежава няколко типа

прогениторни клетки, които са способни да се делят и дават клонове. Клетъчните клонове диференцират и придобиват специфични фенотипни характеристики. Такива клетки са хематопоеичните и мезенхимните стволови клетки. Мезенхимните клетки са стромални клетки, които проявяват възможност за диференциация в различни клетъчни типове [5]. Мезенхимните клетки са основен компонент на костно-мозъчната строма, за която се знае, че участва в хематопоезата като осигурява достъпа на цитокини и други растежни фактори [6]. Хематопоеичните стволови клетки са отговорни за постоянното обновяване на кръвта и са способни на самовъзпроизвеждане и диференциация в кръвни клетки и клетки на имунната система. Хематопоезата е строго регулирана, така че броят на всеки вид клетки в организма да е постоянен. В началото на ембрионалното развитие хематопоеичната функция се изпълнява от амниотичния сак. По-късно тази тя се поема от зародишния черен дроб. След раждането хематопоеична функция се осъществява от костния мозък [7].

Осигуряването на имунен отговор е основна функция на клетките, произлизащи от лимфоидния ред, както и на гранулоцитите и макрофагите [8]. Гранулоцитите са клетки, които имат в цитоплазмата си ясно видими гранули. Делят се на неутрофили, базофили и еозинофили и спадат към миелоидния ред [8]. Неутрофилите се характеризират с висока фагоцитираща способност. По време на инфекция се увеличава броят им в засегнатата тъкан – левкоцитоза. Тези клетки са полиморфонуклеарни, защото имат сегментирано ядро с два до шест лоба [9]. Морфологично се характеризират с наличието на първични и вторични гранули, които се формират през различни етапи на диференциацията. Първичните съдържат пероксидаза, фосфатаза и хидролитични ензими, а вторичните – колагеназа, лактоферин и лизозим. Това са ензими необходими за осъществяването на фагоцитоза [8]. Еозинофилите са фагоцити, които нормално циркулират в организма. Характеризират се с ядро с два или три лоба [9]. Имат големи, кристални гранули, в които основните ензими са хистаминаза и арилсулфатаза. Те са важни при потушаване на алергични реакции [8]. Базофилите са циркулиращи нефагоцитиращи клетки. В кожата, съединителната тъкан и мукозния епител тези клетки се наричат мастоцити. Те са неподвижни. Базофилите имат гранули, съдържащи хистамин и хепарин [8]. Моноцитите също принадлежат към миелоидния ред и имат общ прекурсор с гранулоцитите. Незрелите клетки попадат в кръвоносните съдове и циркулират 20-40 часа, след което навлизат в тъканите, където узряват до макрофаги. Трансформацията им е продължителен процес [8]. Макрофагите изпълняват различни функции – фагоцитираща, антиген-представяща,

секреторна и регулаторна (секретират растежни фактори и хемокини, които участват в регулацията на имунния отговор) [9].

Процесът на превръщане на нормална клетка във високо пролиферираща малигнена клетка е известен като канцерогенеза. При малигнена трансформация на прекурсорни или стволови клетки, предшественици на диференцирани клетки от хематопоетичния ред, се развива злокачествено заболяване на кръвта (левкемия).

Видове левкемии

Левкемиите са група онкологични заболявания, характеризирани се с увеличаване на левкоцитите в костния мозък и кръвта. В зависимост от прогресивността на заболяването биват остри и хронични, а според произхода на засегнатите клетки – миелоидни и лимфоидни. Комбинациите между тях дават четири основни категории [10].

Острата лимфобластна левкемия е агресивно заболяване, при което злокачествената трансформация засяга хематопоетични стволови или лимфоидни прогениторни клетки [11]. Увеличената скорост на пролиферация води до натрупване на злокачествени хематопоетични клетки (бластни клетки). Острата лимфобластна левкемия се появява често в детска възраст и се характеризира с много голяма степен на малигненост.

Хроничната лимфоцитна левкемия се характеризира с хронична, продължителна лимфоцитоза. Увеличава се броят на лимфоцитите и те се натрупват в кръвта, костния мозък, черния дроб, далака и лимфните възли [12].

Острата миелоидна левкемия засяга незрели клетки от миелоидния ред на диференциация. Получават се бластни клетки, които са функционално неактивни. Заболяването се развива бързо и за кратко време се достига до фатален за пациента край при липса на активно лечение [13].

Хроничната миелоидна левкемия е заболяване от групата на миело-пролиферативните нарушения, при което злокачествената трансформация засяга гранулоцитни и моноцитни клетки [14]. Заболяването се развива бавно. Различават се три фази на болестта – хронична фаза, акселерираща фаза и бластна криза [15]. Хроничната фаза продължава няколко години и се характеризира с натрупване на миелоидни прекурсорни и зрели клетки в костния мозък, тимус, слезка, лимфни възли, периферната кръв. Акселериращата фаза продължава 4-6 месеца и се характеризира с увеличаване на прекурсорните клетки за сметка на крайно диференцираните. Бластната криза е само няколко месеца и се характеризира с рязко увеличаване на популацията на миелоидните, недиференцирани, бластни клетки в целия организъм.

Линеен пренос на енергия

Йонизиращите лъчения увреждат облъчваните живи системи чрез предаване на известно количество енергия на изграждащите ги молекули. Погълнатата енергия може да предизвика възбуждане, йонизация или свръхвъзбуждане на молекулите. Преносът на енергия от йонизиращото лъчение върху молекулите на облъчвания обект се явява първичен акт на радиационно поражение. Между този първичен акт и крайния радиобиологичен ефект лежи поредица от физикохимични и биологични процеси, в резултат на които възбудените, йонизирани или свръхвъзбудени молекули се превръщат в крайна сметка в стабилни молекулни продукти. Облъчването с различни видове йонизационни лъчения в еднакви дози води до силно различаващи се радиационнобиологични ефекти. Като критерий за „качеството“ на йонизиращото лъчение, на ефективността на биологичното му действие служи величината „диференциална загуба на енергия“ от частицата за единица път. Тя е позната още като „линеен пренос на енергия“ (ЛПЕ) [16]:

$$\text{ЛПЕ} = \frac{\text{Енергия, предадена от частицата на веществото [keV]}}{\text{Разстояние, изминато от частицата [\mu\text{m}]}}$$

Колкото по-голяма е ЛПЕ, толкова повече енергия се предава от йонизиращата частица на молекулите на облъчваното вещество и толкова по-плътностно са разположени образуваните йони по протежение на нейната траектория. ЛПЕ е характеристика на лъчението, показател на неговата биологична ефективност (на неговото „качество“). Физичната природа на лъчението не оказва никакво влияние върху биологичната ефективност. Погълнатата доза дава само средното количество енергия, предадено на облъчваната система. Колкото по-малко е ЛПЕ, толкова по-отдалечени един от друг са актовете на йонизация.

При опити с бозайници за отчитане на различни радиобиологични ефекти като критерий за ефективността се определя биологичната ефективност на различни типове йонизиращи лъчения. За определяне на биологичната ефективност се използва величината „относителна биологична ефективност“ (ОБЕ). ОБЕ нараства с увеличаване на стойността на ЛПЕ. Биологичното действие на йонизиращата радиация в значителна степен зависи от плътността на йонизацията, предизвикана от различните видове йонизиращи лъчи. Колкото е повече линейната и обемната плътност на йонизацията, толкова е по-голяма биологичната им ефективност. За оценка на биологичната ефективност на облъчването са въведени практически критерии чрез използване на тестови животински модели. Прието е летална доза при еднократно облъчване (LD100/30) да се нарича минималната абсолютно смъртоносна доза за всички облъчени животни в продължение на 30 дни.

Полулеталната доза (ЛД 50/30) е минималната доза, довеждаща до гибелта на 50% от животните в течение на 30 дни. Бързината на проявяването на леталния ефект зависи от големината на еднократната доза. Проявяването степенно на лъчевите поражения и срокът на леталния изход зависи от величината на дозата само в пределите на определен диапазон. Над определен стойност на дозата става абсолютна за всички облъчени животни и по-нататъшното ѝ увеличаване само ускорява срока на смъртоносния изход. В организма протичат регенерационни, репарационни, компенсаторни и приспособителни процеси, които спомагат за намаляване на вредното въздействие от йонизиращата радиация и възможност да не се прояви биологичен ефект. Съществуват прагови дози на йонизираща радиация, над които организма не може да се справи с получените поражения [16].

Лъчеви увреждания

Крайният резултат от цялата верига от процеси са лъчевите увреждания, които най-общо се подразделят на соматични, т.е. отнасящи се за самия облъчен организъм, и генетични, отнасящи се за поколенията на облъчения индивид. Соматичните и генетичните увреждания са резултат от възникнали мутации в генома на клетката. Мутациите са постоянни промени в генетичния код (в генома) на клетката. Когато тези промени настъпват в телесните (соматични) клетки, мутациите се наричат соматични, ако са в половите клетки – генетични. Соматичните мутации се извършват чрез промени на свойствата и функциите на клетката. Това е промяна на фенотипа. Мутациите в гените, отговорни за туморната супресия, са главна причина за канцерогенезата. Това е многостепенен процес на мутации, стартиращ от генетична алтерация на единична клетка и достигайщ до пролиферация на цели клетъчни клонове [2].

Стохастични ефекти. Вторична левкемия

Стохастичните ефекти представляват вероятностни ефекти, предизвикани от действие на йонизиращи лъчения. Проявяват се като канцерогенеза и наследствени (генетични) ефекти в поколението. Тези ефекти са дефинирани в документ на Международната комисия за радиационна защита (ICRP-1991) [17] и се обясняват с линейната безпрагова концепция. Тя приема, че няма минимална (прагова) доза, под която не възникват увреждания. По отношение на зависимостта доза-ефект тук се получава стохастично разпределение на случаите, т.е. с повишаване на дозата нараства вероятността за развитие на заболяване. Най-съществените късни соматични радиационни увреждания са злокачествените туморни образувания (солидни тумори и левкози). Канцерогенезата протича в три основни етапа –

инициация, латентен период и прогресия. При някои видове тумори, всеки етап се характеризира със специфични мутагенни събития, в частност инициацията на процеса се свързва с инактивиране на тумор-супресорни гени и активиране на онкогени. При някои радиационно-индуцирани левкемии, са установени специфичните молекулни промени. Независимо от това, не е установена маркерна мутация, специфична за всички радиационно-индуцирани тумори.

Радиационните увреждания на ДНК определят вероятността за различни случайни събития като инактивиране на тумор-супресорни гени, чрез делетиране на целия ген или важна част от него, активиране на онкогени чрез транслокация на промотори на прото-онкогените, като резултат от двойноверижно разкъсване и размяна на участъци от хромозомите. В процеса на онкогенезата непрекъснато възникват неопластични трансформации, но по-голямата част от тях се отстраняват чрез включване на имунната защита на организма.

В резултат на излагане на действие на йонизиращо лъчение за дълъг период от време е възможно да нарасне честотата на възникване на такива неопластични трансформации, което да доведе до формиране на злокачествено образуване (тумор). Възможен сценарий е развитие на вторично онкологично заболяване (напр. вторична левкемия), след продължителна лъчетерапия на първичното малигнено заболяване.

Лъчетерапията е основен метод за лечение на онкологични заболявания. Повече от 50% от всички пациенти с карцином се нуждаят от лъчетерапия с различна продължителност. С напредъка на медицината и усъвършенстване на методите на лечение, броят на дългосрочно оцелелите значително се е увеличил. Пациентите с дългосрочна преживяемост са изложени на повишен риск от развитие на вторично малигнено заболяване. Понастоящем само 17%-19% пациенти от онкоболните пациенти в ремисия развиват вторичен карцином [18]. Това се дължи на три основни причини: продължителност на живота след проведена терапия, генетична обусловеност и проведено лечение като лъчетерапия, химиотерапия, таргетна терапия и други. Лъчетерапията допринася само за около 5% от общите вторични злокачествени заболявания, свързани с лечението. Рискът от развитие на заболяването варира значително в зависимост от първоначалния рак и проведеното лечение. Тя може да варира от по-малко от 0,1% до 3 или 4% през десетте години след лечението. Най-честият тип вторична левкемия е острата миелоидна левкемия, но в научната литература също се съобщава за остра лимфоцитна левкемия, хронична миелоидна левкемия и понякога развитие на миелодиспластичен синдром [19]. Вторичните левкози са относително устойчиви на последваща терапия и имат процент на излекуване само от 10% до 20% [20].

Обобщение

Йонизиращото лъчение е високо рисков фактор за туморна трансформация на клетките. Продължителното излагане на ниско дозово йонизиращо лъчение може да причини едноверижни и двойноверижни скъсвания на ДНК. Двойноверижните разкъсвания на ДНК са основната причина за поява на хромозомни аберации (инверсия, транслокация, делеция или инсерция) и последваща злокачествена трансформация на облъчената клетка [21]. Промяната в белтъците от системата за репарация на ДНК също води до повишен риск от вторични злокачествени заболявания. Например, атаксия телеангиектазия (АТМ) е белтък, който открива поправими увреждания в ДНК и иницира каскада от реакции за репарацията им. Мутацията в този ген може да доведе до повишена радиочувствителност и невъзможност от репарация на ДНК. Тази мутация може да бъде основна причина за развитие на вторично злокачествено заболяване [22]. Повечето онкологични заболявания, асоциирани с облъчване с йонизираща радиация, се развиват и диагностицират след дълъг период от време (възможно е десетилетия), като рискът допълнително нараства с времето [23-24]. Поради естеството на риска от развитие на вторично онкологично заболяване и необходимостта от ранна диагностика и навременна терапия, от съществено значение е периодичният генетичен скрининг на пациенти в ремисия.

Заключение

Лъчетерапията е основен метод за лечение на онкологични заболявания и има добре установена роля, но след прилагането ѝ съществува риск от развитие на вторично онкологично заболяване. С увеличаване на времето на преживяемост нараства рискът от развитие на вторично онкологично заболяване. От вторичните онкологични заболявания с най-висока честота са злокачествени заболявания на кръвта (левкози), от които с най-висок процент е острата миелоидна левкемия. Периодичният скрининг на пациенти в ремисия е от съществено значение за ранното диагностициране на вторичното заболяване и възможността за въвеждане на ефективна терапия.

Библиография

1. Samoylov AS, Bushmanov AY, Udalov YD, et al. Acute myeloid leukemia, prostate and skin cancer in acute radiation syndrome survivor after the 1986 Chernobyl nuclear accident: case report. *Radiat Prot Dosimetry*. 2018 Dec 1;182(1):85-89.
2. Zhang Y, Fu Q, Huang T, et al. Ionizing radiation-induced DNA damage responses affect cell compressibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 May 7;603:116-122.
3. Havránková R. Biological effects of ionizing radiation. *Cas Lek Cesk*. 2020 Winter;159(7-8):258-260.
4. Shimada T, Saito T, Okadome M, et al. Secondary leukemia after

- chemotherapy and/or radiotherapy for gynecologic neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Feb;24(2):178-83.
5. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2005; 36 Suppl 3: S8-S12.
6. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000; 9:841-848.
7. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR. *Essential immunology, Ontogeny and phylogeny*. FRS eleventh edition. London. Blackwell; 2006. p. 229-255.
8. Hoffbrand AV, Lewis M, Heinemann B. *Essential Haematology, The white cells 1:granulocytes,monocytes and their benign disorders*. London. Blackwell; 2006. p.94-107.
9. Narin R, Helbert M, Immunology for medical students. Hematopoiesis. Myeloid cells. Second edition. MOSBY Elsevier; 2007. p. 80-83.
10. Wickramasinghe RG, Hoffbrand AV. The molecular basis of leukemia and lymphoma. In: Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD (eds.). *Postgraduate Haematology*, 4th ed. Oxford: Butterworth Heinemann. 1999; 354-372.
11. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 2024 May 9;143(19):1891-1902.
12. Condoluci A, Terzi di Bergamo L, Langerbeins P, et al. International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2020 May 21;135(21):1859-1869.
13. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023 Mar;98(3):502-526.
14. Ohno R. Treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate. *Int J Clin Oncol*. 2006 Jun;11(3):176-83.
15. Tkachuk D, Hirschmann JV, Wolters KLuwer. *Chronic Myeloproliferative syndromes*. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins. 2007; p. 105-136.
16. Zeman EM. *Clinical Radiation Oncology (Fourth Edition)*. Chapter 1 – The Biological Basis of Radiation Oncology. Elsevier. 2016; p. 2-40.e5.
17. International Commission on Radiological Protection. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP*. 1991;21(1-3):1-201.
18. Morton LM, Onel K, Curtis RE, et al. The rising incidence of second cancers: patterns of occurrence and identification of risk factors for children and adults. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014: e57-67.
19. Bhatia S, Davies SM, Robison LL. Leukemia. In: Neugut AI, Meadows AT, Robinson E, editors. *Multiple primary cancers*. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 257-76.
20. Leone G, Voso MT, Sica S, et al. Therapy related leukemias: susceptibility, prevention and treatment. *Leuk Lymphoma*. 2001 Apr;41(3-4):255-76.
21. Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, et al. Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:596-604.
22. Taylor AM, Byrd PJ. Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 2005;58:1009-15.
23. Hodgson DC, Gilbert ES, Dores GM, et al. Long-term solid cancer risk among 5-year survivors of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:1489-97.
24. Travis LB, Fossa SD, Schonfeld SJ, et al. Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1354-65.