

Опыт проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при аутосомно-рецессивном остеопетрозе у детей

А.Е. Буря¹, К.И. Киргизов², Е.А. Пристанскова¹, М.Б. Мельникова¹, В.В. Пальм¹,
С.В. Михайлова^{1,3}, Е.В. Скоробогатова¹

¹ Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» Минздрава России, Москва

Генерализованный остеопетроз (ГО) – редкое наследственное заболевание, характеризующееся нарушением формирования костей скелета, костномозгового кроветворения, неврологическим дефицитом и слепотой. Основным методом терапии – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Цель работы: анализ опыта выполнения алло-ТГСК пациентам с аутосомно-рецессивной формой ГО в отделении трансплантации костного мозга РДКБ, оценка качества используемого протокола кондиционирования, его переносимости и эффективности. В период с 2010 по 2018 год в отделении ТКМ РДКБ проведена алло-ТГСК 7 пациентам с аутосомно-рецессивной формой ГО. Медиана возраста пациентов на момент ТГСК – 5,5 года (1–11 лет). Перед трансплантацией у 5 пациентов использовали миелоаблативный режим кондиционирования – треосульфан, флударабин, мельфалан; у одного пациента – треосульфан, флударабин, тиофосфамид; у одного – треосульфан с флударабином. При неродственных алло-ТГСК в кондиционирование был добавлен антитимоцитарный иммуноглобулин (АТГ). Источники гемопоэтических стволовых клеток: неродственный донор HLA-10/10 совместимый костный мозг (n = 4), периферические стволовые клетки крови (ПСКК) (n = 1), HLA 8/10 и 9/10 пуповинная кровь 2 образца (n = 1), родственный донор HLA-10/10 совместимый ПСКК (n = 1). Профилактика реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ): циклоsporин А/такролимус + метотрексат/миклофенолата мофетил. Лейкоцитарное восстановление зафиксировано у 6 из 7 пациентов в период с +13 по +22-й день (медиана +17-й день). У реципиента пуповинной крови, получившего один миелоаблативный препарат, зафиксирована быстрая аутореконституция гемопоэза. Ранние посттрансплантационные осложнения: орофарингеальный мукозит до 2-й степени – у 6 пациентов; нейтропенический энтероколит до 2-й степени – у 4; до 3-й степени – у 3; сепсис – у 3 пациентов. Проявления РТПХ отмечены у 2 пациентов: кожная форма 1-й и 2-й степеней, интестинальная форма 4-й степени. Был один летальный исход у пациента с нейродегенеративной формой остеопетроза на фоне нарастания гидроцефально-гипертензионного синдрома, сопровождающегося отеком головного мозга с вклиниванием его в большое затылочное отверстие. Этому пациенту провели вентрикулярное шунтирование на +25-й день после алло-ТГСК. У 5 успешно трансплантированных пациентов наблюдали гипофункцию трансплантата в течение 5–6 мес. после алло-ТГСК, далее происходила редукция экстремедуллярного гемопоэза и стабилизация функции трансплантата. Через 2–5 мес. после трансплантации был отмечен период гиперкальциемии, купированный введением бифосфонатов. После алло-ТГСК состояние зрения пациентов не менялось. Начиная с 4–6-го мес. после трансплантации у 5 успешно трансплантированных пациентов происходил рост осевого скелета, уменьшалась выраженность деформации черепа на фоне отсутствия новых очагов компрессии черепных нервов. Дальнейшее психоречевое развитие пациентов соответствовало возрасту. Алло-ТГСК – эффективный метод системного лечения ГО. Поскольку поражение ЦНС после алло-ТГСК не корректируется, пациентам с тяжелой дисфункцией ЦНС проведение трансплантации не показано. Использование миелоаблативного режима кондиционирования с двумя алкилирующими препаратами обеспечивает аллогенную реконституцию гемопоэза. В посттрансплантационном периоде необходимо предупреждать развитие гиперкальциемии. Ранняя диагностика позволит управлять лечением пациентов с ГО: своевременно определять показания и выполнять алло-ТГСК, обеспечивать реабилитацию и предупреждать наступление тяжелой инвалидизации. Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом Российской детской клинической больницы.

Ключевые слова: остеопетроз, аутосомно-рецессивный, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Буря А.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019; 18 (2): 43–52.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-2-43-52

Контактная информация:

Буря Александра Евгеньевна,
врач-гематолог отделения трансплантации костного мозга Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.
Адрес: 117997, г. Москва, Ленинский пр-кт, 117
E-mail: burya.a.e@gmail.com

© 2019 by NMRC PHOI

Practice of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infantile autosomal recessive osteopetrosis

A.E. Burya¹, K.I. Kirgizov², E.A. Pristanskova¹, M.B. Melnikova¹, V.V. Palm¹, S.V. Mikhailova^{1,3}, E.V. Skorobogatova¹

Correspondence:
Alexandra E. Burya, MD, hematologist at the Department of Bone Marrow Transplantation at the Russian Children's Clinical Hospital of the Pirogov Russian National Research Medical University Ministry of Healthcare of Russian Federation. Address: Russia 117997, Moscow, Leninskiy prosp., 117 E-mail: burya.a.e@gmail.com

¹ Russian Children's Clinical Hospital of Pirogov Russian National Research Medical University Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

³ Research center for medical genetics, Moscow

Generalized osteopetrosis is a rare hereditary disease characterized by impairment of skeleton bones formation, bone marrow dysfunction, neurologic deficiency and blindness. The main treatment for osteopetrosis is an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). To review and analyze experience of Department of bone marrow transplantation of RDKB (BMT RDKB) of allo-HSCT for patients with autosomal recessive generalized osteopetrosis; to evaluate tolerability and efficacy of the conditioning regimen administered. Between 2010 to 2018 years, 7 patients (2-male, 5-female) with autosomal recessive generalized osteopetrosis underwent allo-HSCT in Department of bone marrow transplantation of RDKB. Median age at the moment of HSCT was 5,5 years (1–11 years). Before the transplantation myeloablative conditioning regimen was used: treosulfan, fludarabine and melphalan for 5 patients, treosulfan, fludarabine and thiotepa for 1 patient and treosulfan with fludarabine for 1 patient. In case of unrelated allo-HSCT antithymocyte globulin was added to the conditioning regimen. Bone marrow from matched (HLA- 10/10) unrelated donor was used for 4 patients, peripheral blood stem cells from matched unrelated donor was used for 1 patient, two grafts of unrelated umbilical cord blood (HLA 8/10 and 9/10) for 1 patient and peripheral blood stem cells from matched (HLA 10/10) from related donor – for 1 patient. For "graft-versus-host" disease (GVHD) prophylaxis either cyclosporine A/tacrolimus and methotrexate/ mofetil mycophenolate was used. White blood cell recovery had been achieved for 6 from 7 patients on +13 to +22 day (median +17 day). Quick autoreconstitution of hemopoiesis was observed for the recipient of umbilical cord blood who got one myeloablative drug. The following early post transplantation complications were registered: oropharyngeal mucositis up to II degree in 6 patients, neutropenic enterocolitis up to II degree in 4 patients, up to III degree in 3 patients, sepsis in 3 patients. The GVHD symptoms occurred in 2 cases: skin form of II degree in one patient and skin form of II degree and intestinal form of IV degree in another patient. One patient with neurodegenerative form of osteopetrosis died with increase of hypertensive-hydrocephalus syndrome, cerebral edema with downward cerebellar herniation. During 5-6 months after allo-HSCT the 5 successfully transplanted patients experienced poor graft function but then reduction of extramedullary hemopoiesis occurred and full engraftment was achieved. Hypercalcemia was reported in 2–5 months after allo-HSCT and was treated by administration of bisphosphonates. Visual impairment persisted after allo-HSCT. After 4–6 months after transplantation axis skeleton growth occurred for all 5 successfully transplanted patients, skull deformation reduced and no new zones of nerve's compression were observed. No patients had any developmental delays after the treatment. Allo-HSCT is an effective systemic treatment of autosomal recessive generalized osteopetrosis. However because serious neurodegenerative condition cannot be reversed by allo-HSCT, such treatment may not be recommended for patients with heavy CNS impairment. Myeloablative conditioning regimen with two alkylating agents provides allogeneic reconstitution of hemopoiesis. In post transplantation period, measures for hypercalcemia control are necessary. Early diagnostic of autosomal recessive generalized osteopetrosis can help to evaluate feasibility of allo-HSCT and to start treatment on time thus provide chance for long-term rehabilitation and prevention of serious disability. The study was approved by the Independent Ethics Committee of Russian Children's Clinical Hospital.

Key words: osteopetrosis, autosomal recessive, allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells

Burya A.E., et al. Pediatric hematology/oncology and immunopathology, 2019; 18 (2): 43–52.
DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-2-43-52

Остеопетроз, известный также как «мраморная болезнь», – редкое генетическое заболевание, приводящее к дефициту или дисфункции остеокластов [1]. Остеокласт – единственная клетка, осуществляющая растворение минерализованного матрикса – солей кальция и коллагена, а также резорбцию кости. В результате замедления или отсутствия резорбции нарушается процесс ремоделирования кости, что вызывает диффузное склерозирование ткани. Разрастающийся костномозговой матрикс заполняет костномозговые «ниши» – естественные отверстия и каналы костей, вызывая их сужение [2].

Несмотря на то что первоначально при остеопетрозе поражаются кости, он оказывает множественное патологическое воздействие на органы и ткани [3]. Вторичное поражение нервной и кровеносной систем – обычно ведущий признак в клиниче-

ской картине заболевания. Остеопетроз проявляется анемией, тромбоцитопенией, обусловленными сокращением плацдарма костномозговых пространств и компенсаторным появлением экстрамедуллярного гемопоэза. Нарушение роста и формирования черепа приводит к дисбалансу роста головного мозга с первичным проявлением в виде гидроцефально-гипертензионного синдрома. Сужение каналов и отверстий черепа вызывает атрофию черепно-мозговых нервов. Около 75% случаев заболевания протекает с атрофическим поражением зрительного нерва, именно потеря зрения – основная причина ранней необратимой инвалидизации таких пациентов.

Склерозирование ткани кости – самый ранний признак заболевания, который выявляется на рентгенограммах уже в пренатальном периоде [4]. Определяются следующие рентгенологические признаки остеопетроза: диффузный склероз, нарушение

кортико-медуллярной дифференциации и симптомы «кость в кости» – симптом Арлекина, маска инопланетянина, симптом тельняшки, симптом сэндвича, симптом колбы. Рентгенологическая картина специфична и является достоверным диагностическим признаком «мраморной болезни».

Остеопетроз классифицируется по степени агрессивности процесса и варианту мутации. В зависимости от типа наследования остеопетроз разделяют на доминантный, промежуточный аутосомно-рецессивный, тяжелый аутосомно-рецессивный (инфантильный) и X-сцепленный рецессивный варианты [5–8].

В случае доминантного типа наследования заболевание имеет относительно благоприятное течение и редко проявляется ранее подросткового возраста. Аутосомно-рецессивная форма остеопетроза (МИОР) – это тяжелый прогрессирующий процесс. Клиническая презентация заболевания происходит на ранних сроках после рождения. Полиморфность клинической симптоматики, разная степень выраженности одних и тех же симптомов у разных больных осложняет и задерживает диагностику заболевания на месяцы и годы. Вместе с тем ранняя диагностика значительно улучшает результаты лечения и может предотвратить инвалидизацию пациентов. При отсутствии лечения заболевание приводит к летальному исходу в течение первых 10 лет жизни ребенка, и только 30% больных переживают 6-летний возраст [9].

Генетические поломки при заболевании гетерогенны: описаны мутации в 12 генах, ответственные за развитие аутосомно-рецессивной формы остеопетроза [10]. Патологическая транслокация может вызывать дисфункцию остеокластогенеза на разных этапах. Поломки в генах *RANK* и *RANCL* нарушают процесс дифференцировки остеокластов и приводят к снижению количества или отсутствию остеокластов в костном мозге. В 70% случаев транслокации вызывают нарушение остеокластогенеза на стадии функционирования остеокласта: *TCIRG1*, *CNCL7*, *OSTM1*, *CA-II*, *RLEKHM1*, *KINDIN-3*, *IKBKG (NEMO)*, *MITE* и др. [6, 11–14]. При мутациях с нарушениями на этапе функционирования остеокласта в пунктах костного мозга обнаруживают нормальное или повышенное количество функционально неактивных остеокластов.

При некоторых мутациях форма заболевания носит специфический характер и имеет четко очерченную сопутствующую патологическую симптоматику. Было доказано, что поломки генов *CLCN7*, *OSTM1* и *CA-II* играют автономную роль в развитии поражения ЦНС и вызывают первично-прогрессирующий липофусциноз головного мозга [14]. При редко встречающейся мутации в гене, кодирующем *CA-II*, параллельно остеопетрозу происходит развитие тубулярного

ацидоза канальцев почек, а при дальнейшем прогрессировании развивается кальциноз базальных ядер головного мозга. После алло-ТГСК у таких пациентов происходила компенсация поражения костей, но сохранялось течение тубулярного ацидоза. У части больных на поздних сроках после трансплантации отмечено прогрессирование поражения ЦНС [13, 15]. При другом редко встречаемом варианте заболевания с мутацией в гене *IKBKG (NEMO)* преобладают симптомы тяжелого иммунодефицита [1].

Частота встречаемости МИОР – около 1:200000 новорожденных. Сообщается о более высоком уровне заболеваемости в некоторых регионах России: в Республике Чувашия – 1:3500; в Республике Марий Эл – 1:14000 [16]; в международной практике: на островах Коста-Рики – 5:100000; в Средней Азии – 1:80000 [3, 16].

Частота встречаемости разных транслокаций неодинакова для разных генов. Самая часто описываемая мутация, встречающаяся в 50% случаев, – мутация в гене Т-клеточного иммунного регулятора 1-го типа (*TCIRG1*), который кодирует субъединицу $\alpha 3$ – субъединицу V-АТФазы, ответственной за перенос ионов H^+ в зону лизиса кости. Транслокации в гене *CLCN7* составляют 15% случаев, а в гене *OSTM1* – 5%. Оба эти гена участвуют в кодировке субъединиц канала, ответственного за перенос ионов хлора в зоне резорбции кости. Другие варианты мутаций относят к редким, их частота не превышает 1–4% в популяции больных. В 30% случаев не определяется ни одна из известных мутаций [14].

Обычно пациенты одного региона имеют один тип генетической транслокации. Для пациентов из Республики Чувашия характерна транслокация *TCIRG1 c.807+5G > A* [16]. Всего для гена *TCIRG1* описано около 50 вариантов мутаций, распространенных в разных регионах мира [17].

В последние годы происходит открытие новых мутаций и вариантов мутаций в пределах известных генов, ответственных за развитие остеопетроза, функциональные последствия и значение которых еще предстоит определить [3].

Заслуживает отдельного внимания клиническая презентация и обследование пациентов с остеопетрозом. Диагностировать спорадический случай остеопетроза при неспецифичности и многообразии клинической симптоматики можно в двух случаях: при рентгенологическом исследовании любой зоны или попытке выполнить костномозговую пункцию или любое другое хирургическое вмешательство в области кости. Невозможность прокола плотной кости направляет диагностический поиск. Трепанобиопсия и костномозговая пункция не входят в стандарт обследования пациента для постановки диагноза «остеопетроз».

Второй важный элемент диагностики – определение степени вовлечения в патологический процесс головного мозга и оценка вероятности развития нейродегенерации. Поражение головного мозга происходит параллельно основному патологическому процессу, утяжеляя его. По данным литературы и собственному опыту, пациенты с остеопетрозом всегда имеют задержку нервно-психического развития разной степени выраженности. В одних случаях это связано с первичной вовлеченностью головного мозга, обусловленной специфическими генетическими поломками, а в других – результат вторичного процесса на фоне краниосиностоза, гидроцефально-гипертензионного синдрома, формирования мальформации Киари, слепоты, сниженной двигательной активности. Оценка нервно-психического статуса пациента – один из основных факторов при определении показаний к аллогенной трансплантации [14].

Описаны редкие случаи атипичного начала проявления остеопетроза. Так, при варианте заболевания, ассоциированном с гомозиготной транслокацией *TCIRG1 c.1536C < A*, наблюдалась тяжелая гипокальциемия [18]. Заболевание дебютировало с появления гипокальциемических судорог у пациентки с гиповитаминозом Д3. Была отмечена резистентность гипокальциемии к стандартной терапии препаратами кальция и Д25(ОН). Лечение активной формой витамина Д3 – 1,25(ОН)2 было эффективно и продемонстрировало нормализацию показателей кальция и щелочной фосфатазы в крови. Данное осложнение связано с нарушением минерального баланса Ca/P в остеооне [18] и сочетанным нарушением ацидификации в остеокластах и париетальных клетках желудка [19]. В этой работе отмечен интересный факт раннего выявления рентгенологических симптомов остеопетроза: симптомы «кость в кости» определялись у ребенка на 46-й день после рождения, а признаки гепатоспленомегалии сформировались к 54-му дню.

На сегодняшний день алло-ТГСК – единственный метод эффективной рациональной терапии ауто-сомно-рецессивной формы остеопетроза. Трансплантация обеспечивает излечение и длительную выживаемость таких пациентов [3, 14]. Впервые ТГСК (HSCT) для лечения МНОР выполнена в 1976 году [20]. В 1980-м [21] показаны результаты успешно проведенных алло-ТГСК у таких больных. После трансплантации приживление донорских макрофагов и их преобразование в остеокласты восстанавливает ремоделирование и метаболизм костной ткани и создает условия для нормального гемопоэза. В посттрансплантационном периоде поражение костей претерпевает обратное развитие: восстанавливается рост и ремоделирование костей, происходит

редукция экстрамедуллярных очагов кроветворения. Однако при атрофическом поражении черепно-мозговых нервов или патологии ЦНС компенсации утраченных функций не происходит [9]. В случае развития первичной нейропатической формы заболевание имеет неблагоприятный прогноз – прогрессирование симптоматики приводит к смерти большинства пациентов в возрасте до 2 лет.

Исходы алло-ТГСК проанализированы Европейской группой трансплантации костного мозга (EBMT) [6]: 5-летняя выживаемость составила 88% для реципиентов родственного HLA-совместимого трансплантата; 80% – для реципиентов неродственного HLA-совместимого трансплантата; 66% – для гаплоидентичного трансплантата.

С целью уменьшения риска развития тяжелой РТПХ в качестве источника стволовых клеток приоритетно использование стволовых клеток костного мозга; в случае использования в качестве источника периферических стволовых клеток предлагается применение Т-клеточной деплеции (CD3+, CD19+) для снижения уровня до $10\text{--}50 \times 10^6/\text{кг}$.

Предпринимались попытки использования стволовых клеток пуповинной крови [4, 7] в качестве источника стволовых клеток. Лейкоцитарное приживление отмечено у 67% пациентов на +23-й день после трансплантации; 6-летняя выживаемость составила 46%. В связи с высоким риском неприживления/отторжения трансплантата применение трансплантата клеток пуповинной крови при ГО ограничено.

Для достижения успешности трансплантации используют миелоаблативный режим кондиционирования. Первоначально курс кондиционирования для таких пациентов включал бусульфан, циклофосфамид, алемтузумаб. Исследователи отмечают тот факт, что уровень токсических осложнений алло-ТГСК, таких как легочная артериальная гипертензия и веноокклюзионная болезнь печени, выше у пациентов с МНОР, чем в группах пациентов с другими нозологиями. При использовании циклофосфамида в режиме кондиционирования 5-летняя выживаемость для групп пациентов с родственным и неродственным совместимым донором составила 62 и 42% соответственно [6]. Проведено исследование использования вместо циклофосфамида флюдарабина, обладающего меньшей эндотелиальной токсичностью [3], при этом отмечено снижение доли токсических осложнений от кондиционирования при сохранении уровня приживления трансплантата. Проводятся пилотные исследования использования треоосульфана вместо бусульфана. В большинстве работ доказано снижение токсичности при треоосульфан-ассоциированном режиме и улучшение переносимости ТГСК у пациентов с МНОР [22]. Согласно рекомендациям [3, 14]

актуально использование как бусульфана, так и тресульфана в сочетании с флюдарabiном в режимах кондиционирования.

Учитывая успешный опыт трансплантации с достижением перекрестной коррекции патологического процесса в ЦНС при мукополисахаридозе I типа (синдром Гурлер), проводились попытки трансплантации у пациентов с нейропатической формой остеопетроза. Трансплантацию выполняли у пациентов первых месяцев жизни – носителей транслокаций *CLCN7*, *OSTM1* – при условии отсутствия поражения головного мозга к моменту трансплантации [9, 23]. При использовании как бусульфана, так и тресульфана-аблативного режима кондиционирования не было получено «неврологического приживания» и заместительного эффекта трансплантата у пациентов с первичной нейропатической формой МИОР. Считается, что предшествующее тяжелое поражение ЦНС или наличие мутаций в генах, связанных с развитием поражения ЦНС, – противопоказание к проведению трансплантации [14].

При использовании гаплоидентичного донора успешность трансплантации резко снижается (около 25%) вследствие роста частоты развития гиподисфункции и отторжения трансплантата. Попытки использования трансплантата гаплоидентичного донора с применением циклофосфамида в посттрансплантационном периоде не доказали свою эффективность в данной группе больных в связи с возрастанием осложнений, обусловленных эндотелиальной токсичностью [24]. Проведено лечение 3 детей в возрасте до 1-го года с мутацией в гене *TCIRG1*. Только у одного из этих пациентов отмечено лейкоцитарное приживание с полным донорским химеризмом; у двух других пациентов наблюдалась гиподисфункция трансплантата с быстрым отторжением (оба пациента умерли от токсичности повторной трансплантации). Многообещающим выглядит использование Т-деплеированного гаплотрансплантата [25]: у 4 пациентов с МИОР на +100-й день после трансплантации достигнуто функционирование гемопоэза при полном донорском химеризме. В раннем посттрансплантационном периоде все пациенты получали дефибротид ввиду высокого риска осложнений, ассоциированных с эндотелиальной токсичностью: веноокклюзионная болезнь печени, легочная гипертензия, тромботическая микроангиопатия. Двум из 4 пациентов потребовалось проведение *boost* (введение дополнительного трансплантата ГСК без кондиционирования) в связи с отсутствием тромбоцитарного приживания на +45 и +49-й дни.

Посттрансплантационный период у пациентов с МИОР имеет особенности, более длительный период становления функции трансплантата [4]. При успешной трансплантации, полном донорском химеризме

и отсутствии осложнений может наблюдаться длительная гиподисфункция трансплантата с сохранением трансфузионной зависимости до 6 мес. (собственный опыт). В этот период у большинства больных регистрируется гиперкальциемия, что, вероятно, связано с приживлением остеокластов и их функцией. Уровень кальция нормализуется на фоне инфузионной терапии, использовании диуретиков. У части пациентов требуется использование бифосфонатов. Описаны случаи, когда гиперкальциемия носила тяжелый рецидивирующий характер, при этом показано эффективное использование денотузумаба (Пролиа) [26].

По данным литературы, у пациентов с ГО наблюдается большая частота таких осложнений, как веноокклюзионная болезнь печени, развитие пульмонарной артериальной гипертензии, идиопатической пневмонии в период до 90 дней после трансплантации. Описан случай развития пульмонарной артериальной гипертензии позднее 100-го дня после трансплантации у пациента, не имевшего тяжелых осложнений, находившегося на амбулаторном наблюдении в хорошем соматическом статусе. Остается неясным патогенетический механизм развития отсроченных осложнений у пациентов с остеопетрозом; не обнаружено пока и достоверной лекарственной обусловленности развития пульмонарной артериальной гипертензии [27].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 2010 по 2018 год в отделении ТКМ РДКБ выполнена алло-ТГСК у 7 пациентов с аутосомно-рецессивной формой ГО (2 мальчика и 5 девочек). Медиана возраста пациентов на момент трансплантации составила 3,6 года (1–11 лет). Данное исследование поддержано Независимым этическим комитетом Российской детской клинической больницы.

У всех пациентов симптомы заболевания появились в ранние сроки после рождения: гидроцефальный синдром был выявлен у детей в возрасте от 0 до 4 мес., у одного пациента отмечали выраженный краниосиностоз, в момент родов развилось внутрижелудочковое кровоизлияние. Атрофию зрительного нерва, впервые проявившуюся в возрасте 2–4 мес., диагностировали у всех 7 пациентов; только у одного из них атрофия была односторонней. Анемия и тромбоцитопения средней степени тяжести появились у детей в период от 1 до 9 мес. жизни. Гепатоспленомегалия диагностирована у всех пациентов до 9 мес. жизни. На момент диагностики у всех детей были отмечены омоложение лейкоцитарной формулы, анемия, тромбоцитопения, гепатоспленомегалия, гиперспленизм. Тяжелая гипокальциемия не отмече-

на ни у одного пациента. У всех детей было нарушено формирование зубов. Поражение челюстей, остеомиелит выявлены у 4 пациентов. У 3 детей младше 2 лет остеомиелита не было; вероятно, это связано с отсутствием микротравматизации твердой пищей.

У всех пациентов были сложности с диагностикой заболевания; диагноз был установлен в возрасте от 9 мес. до 5 лет (медиана – 2,3 года).

Генетическое исследование, проведенное 3 пациентам из Чувашии и одному из Нижнего Новгорода, показало наличие характерной генетической транслокации *TCIRG1 c.807+5G > A*. У 3 остальных пациентов при генетическом исследовании генов *TCIRG1*, *CLCN7*, *PLEKLE1* транслокации не обнаружены.

В неврологическом статусе 6 пациентов отмечена умеренно выраженная степень задержки психомоторного развития; череп – ассиметричный, гидроцефальной формы, мозговой отдел преобладал над лицевым. Ликвородинамика субкомпенсирована, по данным КТ/МРТ-исследования. У 2 из 7 пациентов отмечено формирование мальформации Киари. У одного пациента с генотипом *TCIRG1 c.807+5G > A*, перенесшего внутрижелудочковое кровоизлияние во время родов на фоне тяжелого краниосиностаза, в неврологическом статусе отмечена грубая задержка психомоторного развития. У этого пациента внешние размеры черепа соответствовали возрастной норме, наблюдалось увеличение размеров большого родничка и его выбухание. По данным КТ-головного мозга, размеры полостей черепа резко сужены, имеются признаки гипертензионно-гидроцефального синдрома, перивентрикулярно снижение плотности белого вещества, корковая атрофия, снижение плотности паренхимы затылочных долей, проминирование паренхимы мозга в области большого родничка и каудальная эктопия миндалин мозжечка в области большого затылочного отверстия. Констатировано развитие вторичной нейродегенеративной формы остеопетроза.

У всех пациентов использовали миелоаблативный режим кондиционирования: тресульфат – 42 г/м²; флударабин – 150 мг/м²; мельфалан – 140 мг/м² (у 4 пациентов) или тиофосфамид – 10 мг/кг (у 1 пациента). В случае неродственных алло-ТГСК при кондиционировании с иммуносупрессивной целью вводили АТГ в дозе 90 мг/кг. У одного пациента в кондиционировании использовали один алкилирующий агент – тресульфат в комбинации с флударабином и АТГ.

Алло-ТГСК от полностью совместимого неродственного донора была выполнена 5 пациентам (4 – костный мозг; 1 – периферические стволовые клетки крови); одному пациенту – трансплантация периферических стволовых клеток крови от полно-

стью совместимого родственного донора, одному – два образца неродственной пуповинной крови с совместимостью 8/10 и 9/10 по HLA-системе.

Доза CD34+ клеток составила 1,1 × 10⁶/кг для пуповинной крови и 6,9 × 10⁶/кг – 9,5 × 10⁶/кг (медиана 8,1 × 10⁶/кг) – для КМ и ПСК. Профилактику РТПХ проводили с использованием ритуксимаба, метотрексата, такролимуса/циклоsporина А.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Восстановление донорского лейкопоза было зафиксировано у 6 из 7 пациентов в период с +13 по +22-й день (медиана +17-й день). У реципиента пуповинной крови, получившего один миелоаблативный препарат в кондиционировании, приживление трансплантата не зафиксировано, восстановился собственный гемопоэз.

У 5 из 6 пациентов на +30-й день после алло-ТГСК был отмечен полный донорский химеризм; у одного – смешанный химеризм; доля собственных клеток нарастала и к +90-му дню составила 50%. Проводили терапию флударабином – 90 мг/м², дополненную тремя трансфузиями донорских лимфоцитов (максимальная доза – 6,5 × 10⁶/кг); после этого зафиксировано достижение донорского химеризма в течение 2 мес.

Ранний посттрансплантационный период осложнялся орофарингеальным мукозитом до 2-й степени тяжести у 7 пациентов; нейтропенический энтероколит до 2-й степени развивался у 4 пациентов; 3-й степени – у 3 пациентов. Грамотрицательный сепсис возник у 3 пациентов (двое из них успешно вылечены); у двоих была отмечена транзиторная ЦМВ-виремия.

В период восстановления лейкопоза у одного пациента, трансплантированного от неродственного донора, развилась кожная форма РТПХ 1-й степени. Этот пациент имел смешанный химеризм на +30-й день от ТГСК. У другого пациента на +40-й день было отмечено развитие до 4-й степени интестинальной формы РТПХ, которая имела затяжное рецидивирующее течение и была купирована через 6 мес. после возникновения. У этого пациента сохранялся полный донорский химеризм в течение всего периода после ТГСК.

Поздние осложнения трансплантации. У всех успешно трансплантированных 5 пациентов была отмечена гипофункция трансплантата в течение 5 мес. после трансплантации, требовавшая дополнительных трансфузий компонентов крови. У всех пациентов через 2–5 мес. после трансплантации наблюдался недлительный период гиперкальциемии, купированный 1–2 введениями бифосфонатов и инфузионной терапией.

Неблагоприятный исход заболевания наблюдался у двух пациентов. Один летальный исход произошел у ребенка с нейродегенеративной формой остеопетроза, выраженным нарушением ликвородинамики на ранних сроках после трансплантации на фоне нарастания гидроцефально-гипертензионного синдрома, сопровождающегося отеком и набуханием вещества головного мозга с вклиниванием его в большое затылочное отверстие. Этому пациенту было проведено вентрикулярное шунтирование на +21-й день после ТГСК с целью снижения внутричерепного давления; отмечено приживление донорского трансплантата и на +30-й день зафиксирован полный донорский химеризм. Во втором случае наблюдалось первичное неприживление трансплантата у реципиента пуповинной крови; к +60-му дню произошла реконституция собственного гемопоэза. После выписки из отделения дальнейшая судьба этого пациента не известна.

Через 4–6 мес. после трансплантации у пяти успешно трансплантированных пациентов восстанавливался рост осевого скелета. На момент трансплантации дефицит роста у пациентов в возрасте до 5 лет составлял 7 см от нижней границы среднего значения, а у пациента 11 лет – 13 см от нижней границы возрастной нормы. Через два года после трансплантации отставание роста у этих пациентов, включая ребенка, трансплантированного в 11 лет, сократилось до 3–4 см от нижней границы возрастной нормы.

У всех пациентов уменьшилась выраженность деформации черепа на фоне отсутствия новых очагов компрессии черепных нервов. У пациента в возрасте 11 лет сохраняется выраженная деформация черепа, экзофтальм, что привело к развитию депрессивного состояния в пубертате. МРТ-исследование пациентов в динамике демонстрирует уменьшение выраженности гидроцефально-гипертензионного синдрома,

Рисунок 1

Компьютерная томография головного мозга: состояние канала зрительного нерва до ТГСК у пациента РДКБ (собственные данные)



его компенсацию, однако не произошло увеличения размера просвета канала зрительного нерва (рисунки 1, 2).

После трансплантации состояние зрения пациентов не изменилось: ребенок, имевший одностороннее повреждение зрительного нерва, сохранил зрение, а у 4 пациентов сохранилось только светоощущение.

Таким образом, успешно завершены 5 аллогенных трансплантаций; длительность посттрансплантационного наблюдения – от 8 до 50 мес. (медиана – 30 мес.). Трансфузионная зависимость у всех пациентов сохранялась до 5 мес., это связано с малым плацдармом костномозгового кроветворения, гиперспленизмом и сменой группы крови. В течение 5–6 мес. после трансплантации у всех детей отмечено сохранение и нарастание органомегалии, а затем сокращение размеров печени и селезенки, редукция экстрамедуллярного гемопоэза. В настоящее время у всех пациентов наблюдается стабильная функция трансплантата.

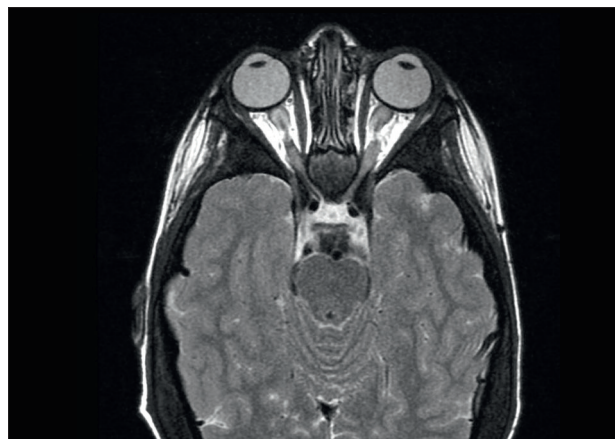
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Алло-ТГСК – единственный на сегодня эффективный метод терапии у пациентов с аутосомно-рецессивной формой остеопетроза. Эффективность этой процедуры обусловлена восстановлением функции остеокластов донорскими клетками трансплантата. В результате трансплантации происходят восстановление ремоделирования костей скелета, формирование плацдарма костномозгового кроветворения, инволюция экстрамедуллярного гемопоэза; создаются условия для роста и психоневрологического развития ребенка.

Однако алло-ТГСК эффективна не при всех формах остеопетроза. Для предсказания эффективности этой процедуры перед ее выполнением в междуна-

Рисунок 2

Компьютерная томография головного мозга: состояние канала зрительного нерва после ТГСК у пациента РДКБ (собственные данные)



родной практике определяют вариант генетической поломки, а также оценивают неврологический статус пациента. На данный момент определение генетического варианта заболевания возможно только в 70% случаев; у остальных пациентов с характерной клинической и рентгенологической картиной заболевания генетический вариант его не известен. В литературе описаны два возможных генетических варианта, при которых алло-ТГСК неэффективна. Один из них – повреждение в гене *RANKL*, функция которого не восстанавливается после алло-ТГСК и обусловлена другим патологическим механизмом, не связанным с функцией остеокластов. Этот вариант остеопетроза, по данным литературы, встречается в 1–2% случаев. Второй вариант предсказуемой неэффективности процедуры – развитие у пациента тяжелого неврологического дефицита первичного и вторичного происхождения.

По данным литературы, повреждения в генах *CLCN7* и *OSTM1* выделены как варианты заболевания, протекающие с сопутствующим тяжелым повреждением ЦНС. Не доказано, что первичное поражение ЦНС встречается только при этих вариантах поломки генов, участвующих в остеокластогенезе. Более того, определить известные генетические варианты не удается в 30% случаев. А при наличии мутации *CLCN7* гена имеется промежуточный вариант течения остеопетроза, характерный отсроченным началом первичных проявлений. У таких пациентов заболевание проявляется в возрасте старше 1–2 лет и имеет относительно мягкое течение без органического поражения ЦНС, оцениваемого по компьютерной визуализации.

Возможная эффективность процедуры алло-ТГСК для данной группы пациентов не определена. Важно подчеркнуть, что без точной генетической диагностики трудно определить наличие первичного неврологического поражения, так как развитие остеопетроза приводит к вторичному повреждению ЦНС, а первичное повреждение ЦНС у ребенка на ранних сроках после рождения не всегда имеет клиническую манифестацию и проявления по данным компьютерной томографии или МРТ. В нашем исследовании процедуру ТГСК проводили 4 пациентам старше 2 лет, когда заболевание находилось в стадии стабилизации, компенсации, это позволяло исключить пациентов с тяжелыми формами поражения ЦНС уже по неврологическому статусу. Показано, что ТГСК пациенту с нейродегенеративной формой заболевания, обусловленной выраженным ранним краниосиностозом, неэффективна. Невозможность компенсации ликвородинамики в случае развития синдромов, связанных с нарушением «капиллярной проницаемости» вследствие эндотелиального поражения, приводит к ограничению

выполнения алло-ТГСК. Есть основание предполагать, что пациенты не только с первичными нейродегенеративными формами заболевания, но и с любым вариантом раннего тяжелого поражения ЦНС не достигают фазы стабилизации и умирают в раннем возрасте.

Вместе с тем, по данным международных исследований, показано, что проведение трансплантации более эффективно в раннем возрасте, так как в этом случае возможно сохранение функции черепно-мозговых нервов, в первую очередь зрения. Двустороннее поражение зрительных нервов – главная причина тяжелой инвалидизации таких больных. Основной задачей для улучшения лечения больных является ранняя диагностика остеопетроза. В основе диагностики лежит выявление больных с системными повреждениями, характерными для остеопетроза. Так, в группе пациентов с гидроцефально-гипертензионным синдромом следует выделять пациентов с гематологическими проявлениями и выполнять рентгенодиагностику для выявления признаков остеопетроза. Для детей с указанными симптомами из эндемических регионов республик Чувашия и Марий Эл такая диагностика должна быть обязательной.

Решение о необходимости трансплантации следует принимать не только на основе оценки неврологического статуса, но и с учетом данных визуализации (КТ и МРТ) и генетических показателей для получения более объективной картины процесса и возможности проводить динамический контроль и пренатальную диагностику. В нашей клинике рассматривается необходимость организации консолидационного центра, где проводилась бы оценка данных инструментальных и генетических исследований пациентов с МНОП и формировался опыт проведения ТГСК. Учитывая значительное количество генетических aberrаций при остеопетрозе, в практических целях для решения вопроса о проведении трансплантации необходимо оценить наличие мутаций генов *RANKL*, *OSTM1*, *CLCN7* (с ранним клиническим дебютом) для исключения вариантов заболевания, при которых лечение с использованием алло-ТГСК заведомо не эффективно.

На основании нашего клинического опыта имеется два практических варианта подходов к проведению трансплантации. В нашей клинике проходили лечение пациенты старше 1–1,5 года, в компенсаторной стадии течения остеопетроза. Оценка неврологического статуса этих пациентов не сложна – осмотр и инструментальное обследование (МРТ или КТ головного мозга). Как показывает наш опыт, проведение трансплантации у таких пациентов эффективно восполняет дефекты кроветворения, развития мышечной и костной систем; происходит дальнейшее психоневрологическое развитие, но поражение

черепно-мозговых нервов, в первую очередь зрения, приводит к необратимой инвалидизации пациентов этой группы.

Второй путь основан на имеющихся литературных данных и предполагает проведение алло-ТГСК в раннем возрасте – до 1 года. Ранние сроки ТГСК могут снизить процент больных с потерей зрения, обеспечить гармоничное нервно-психическое и физическое развитие пациентов. Однако проведение алло-ТГСК в ранние сроки, вероятно, снизит процент успешности процедуры. На ранних этапах развития заболевания нет достоверных способов предсказания и оценки развития неврологического поражения. Возможно, более позднее появление и прогрессирование поражения ЦНС при остеопетрозе может не иметь четких диагностических критериев, по данным инструментальных исследований к моменту ТГСК. Предварительно следует исключить пациентов с генетическими абберациями, при которых ТГСК неэффективна. Остается открытым вопрос эффективности трансплантации для лечения промежуточной формы у пациента с мутацией *CLCN7*.

В нашем исследовании задержка психомоторного развития в рамках гидроцефально-гипертензионного синдрома была у всех 7 пациентов с дебютом в возрасте от 1 до 4 мес. Однако пациент, которому была выполнена успешная трансплантация в возрасте 3 лет, сохранил зрение и успевает в обычной средней школе. Существует сложность объективной оценки неврологического статуса таких пациентов. Мы принимали коллегиальное решение о проведении трансплантации – неврологом и трансплантологом индивидуально для каждого пациента.

Еще одна «серая» зона в подходах к лечению остеопетроза – оперативное лечение таких пациентов. Существуют сложности при составлении лечебного плана, связанные с определением показаний, времени выполнения операции, а также, например, с необходимостью профилактической установки люмбоперитонеального шунта. По-видимому, у боль-

шинства пациентов потеря зрения происходит за счет нарушения венозного оттока на фоне повышенного внутричерепного давления, что подталкивает доктора к скорейшему выполнению трансплантации как наименее травматичному и общезффективному варианту лечения.

Таким образом, раннее проведение алло-ТГСК обеспечивает большую терапевтическую эффективность процедуры, но при этом возможно повышение частоты неудач, обусловленное попаданием на трансплантацию пациентов с прогрессирующим ухудшением неврологического статуса.

ВЫВОДЫ

Необходимо организовать раннюю диагностику остеопетроза по крайней мере в эндемических районах [10]. Следует проводить психоневрологическое обследование, МРТ-КТИ-визуализацию, генетические исследования для исключения форм остеопетроза, не поддающихся лечению с применением ТГСК, а также с целью накопления базы данных. Алло-ТГСК следует проводить на ранней стадии заболевания для предупреждения тяжелой инвалидизации пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Burya A.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4170-7152>

Kirgizov K.I. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2945-284X>

Pristanskova E.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4569-657X>

Melnikova M.B. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3616-1976>

Palm V.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8436-1070>

Mikhailova S.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2115-985X>

Skorobogatova E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4431-1444>

Литература

1. Askmyr M.K., Fasth A., Richter J. Towards a better understanding and new therapeutics of osteopetrosis. *Br J Haematol* 2008 Mar; 140: 597–609.
2. Boyce B.F., Yao Z., Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19: 171–80.
3. Natsheh J., Drozdinsky G., Simanovsky N., Lamdan R., Erlich O., Gorelik N., et al. Improved Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Infantile Malignant Osteopetrosis Using Fludarabine-Based Conditioning. *Pediatr Blood Cancer* 2016 Mar; 63: 535–40.
4. Orchard P.J., Fasth A.L., Le Rademacher J., He W., Boelens J.J., Horwitz E.M., et al. Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Blood* 2015 Jul 9; 126: 270–6.
5. Stark Z., Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009 Feb 20; 4: 5.
6. Sobacchi C., Villa A., Schulz A., Kornak U. *CLCN7-Related Osteopetrosis*. In: GeneReviews((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens., et al. Eds., ed Seattle (WA), 2016.
7. Chiesa R., Ruggeri A., Pavigliani A., Zecca M., Gonzalez-Vicent M., Bordon V., et al. Outcomes after Unrelated Umbilical Cord Blood Transplantation for Children

- with Osteopetrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016 Nov; 22: 1997–2002.
8. Steward C.G. Hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis. *Pediatr Clin North Am* 2010 Feb; 57: 171–80.
 9. Overholt K.M., Rose M.J., Joshi S., Herman G.E., Bajwa R., Abu-Arja R., et al. Hematopoietic cell transplantation for a child with OSTM1 osteopetrosis. *Blood Adv* 2017 Jan 10; 1: 279–81.
 10. Sobacchi C., Frattini A., Orchard P., Porras O., Tezcan I., Andolina M., et al. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 2001 Aug 15; 10: 1767–73.
 11. George A., Zand D.J., Hufnagel R.B., Sharma R., Sergeev Y.V., Legare J.M., et al. Biallelic Mutations in MITF Cause Coloboma, Osteopetrosis, Micro-phthalia, Macrocephaly, Albinism, and Deafness. *Am J Hum Genet* 2016 Dec 1; 99: 1388–94.
 12. Stattin E.L., Henning P., Klar J., McDermott E., Steckslen-Blicks C., Sandstrom P.E., et al. SNX10 gene mutation leading to osteopetrosis with dysfunctional osteoclasts. *Sci Rep* 2017 Jun 7; 7: 3012.
 13. Laway B.A., Mubarik I. Renal Tubular Acidosis, Osteopetrosis, and Cerebral Calcification: A Rare Syndrome Caused by Carbonic Anhydrase II Deficiency. *Indian J Nephrol* 2017 Jul-Aug; 27: 330–1.
 14. Schulz A. Osteopetrosis – Consensus Guide-lines of the ESID and the EBMT Working Party Inborn Errors [online]; <https://esid.org/layout/set/print/Working-Parties/Inborn-Errors-Working-Party-IEWP/Resources/UPDATE-on-the-study-Genotype-phenotype-correlation-and-resulting-treatment-decisions-in-Osteopetrosis>, 2011.
 15. McMahon C., Will A., Hu P., Shah G.N., Sly W.S., Smith O.P. Bone marrow transplantation corrects osteopetrosis in the carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Blood* 2001 Apr; 97:1947–50.
 16. Bliznetz E.A., Tverskaya S.M., Zinchenko R.A., Abrukova A.V., Savaskina E.N., Nikulin M.V., et al. Genetic analysis of autosomal recessive osteopetrosis in Chuvashiya: the unique splice site mutation in TCIRG1 gene spread by the founder effect. *Eur J Hum Genet* 2009 May; 17: 664–72.
 17. Cao W.H., Wei W.B., Yu G., Li L., Wu Q. Complex Heterozygous Mutation in the T-cell Immune Regulator 1 Gene Associated with Severe Ocular Characteristics of Osteopetrosis in an Infant. *Chin Med J (Engl)* 2018 Feb 5; 131: 354–6.
 18. Olgac A., Tumer L., Boyunaga O., Kizilkaya M., Hasanoglu A. Diagnostic dilemma: osteopetrosis with superimposed rickets causing neonatal hypocalcemia. *J Trop Pediatr* 2015 Apr; 61: 146–50.
 19. Barvencik F., Kurth I., Koehne T., Stauber T., Zustin J., Tsiakas K., et al. CLCN7 and TCIRG1 mutations differentially affect bone matrix mineralization in osteopetrotic individuals. *J Bone Miner Res* 2014 Apr; 29: 982–91.
 20. Ballet J.J., Griscelli C., Coutris C., Milhaud G., Maroteaux P. Bone-marrow transplantation in osteopetrosis. *Lancet* 1977 Nov 26; 2: 1137.
 21. Coccia P.F., Krivit W., Cervenka J., Clawson C., Kersey J.H., Kim T.H., et al. Successful Bone-Marrow Transplantation for Infantile Malignant Osteopetrosis. *New England Journal of Medicine* 1980; 302: 701–8.
 22. Shadur B., Zaidman I., NaserEddin A., Lokshin E., Hussein F., Oron H.C., et al. Successful hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis using reduced intensity conditioning. *Pediatr Blood Cancer* 2018 Feb 22.
 23. Kasper D., Planells-Cases R.J., Fuhrmann C., Scheel O., Zeitz O., Ruether K., et al. Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J* 2005 Mar 9; 24: 1079–91.
 24. Bahr T.L., Lund T., Sando N.M., Orchard P.J., Miller W.P. Haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide following reduced-intensity conditioning for osteopetrosis: outcomes in three children. *Bone Marrow Transplant* 2016 Nov; 51: 1546–8.
 25. Moshous F.T.D., Castelle M., Elkaim E.M.-L., Fremond A.M., Cavazzana M., Schulz A., et al. Excellent donor engraftment after T-cell replete haploidentical bone marrow transplantation in Malignant Infantile Osteopetrosis – a preliminary single center experience. In EBMT, Valencia, Spain, 2016, p. S261.
 26. Shroff R., Beringer O., Rao K., Hofbauer L.C., Schulz A. Denosumab for post-transplantation hypercalcemia in osteopetrosis. *N Engl J Med* 2012 Nov 1; 367: 1766–7.
 27. Kuroyanagi Y., Kawasaki H., Noda Y., Ohmachi T., Sekiya S., Yoshimura K., et al. A fatal case of infantile malignant osteopetrosis complicated by pulmonary arterial hypertension after hematopoietic stem cell transplantation. *Tohoku J Exp Med* 2014 Dec; 234: 309–12.