

© Коллектив авторов, 2019

Т.А. НАЗАРЕНКО, А.Г. БУРДУЛИ, Я.О. МАРТИРОСЯН, Л.Г. ДЖАНАШВИЛИ

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА  
У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

*В обзор включены данные зарубежных и отечественных статей, найденных в PubMed по рассматриваемой теме и опубликованных в последние годы. Обсуждается современное состояние проблемы сохранения репродуктивного материала у онкологических больных молодого возраста. Подчеркивается необходимость расширения и интенсификации исследований в области онкофертильности вследствие растущей клинической потребности и нерешенности многих задач. В статье рассмотрены предлагаемые способы защиты яичников перед химио-/лучевой терапией, современные методики получения и консервации ооцитов/эмбрионов, определены протоколы стимуляции яичников, их эффективность и безопасность. Приведены данные об экспериментальных направлениях в этой области и перспективах их использования в клинической практике.*

**Ключевые слова:** онкологические больные, сохранение репродуктивного материала, онкофертильность, криоконсервация, ооциты, эмбрионы, ткань яичника, аутотрансплантация, созревание *in vitro*.

**Вклад авторов.** Назаренко Т.А., Бурдули А.Г., Мартиросян Я.О., Джанашвили Л.Г.: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

*Для цитирования:* Назаренко Т.А., Бурдули А.Г., Мартиросян Я.О., Джанашвили Л.Г.  
Криоконсервация репродуктивного материала у онкологических больных.  
Акушерство и гинекология. 2019; 9:40-9.  
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.9.40-49>

T.A. NAZARENKO, A.G. BURDULI, YA.O. MARTIROSYAN, L.G. DZHANASHVILI

**CRYOPRESERVATION OF REPRODUCTIVE MATERIAL IN CANCER PATIENTS**Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology,  
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

*The review includes data from foreign and Russian articles published in the past years and found in PubMed on the topic under consideration. It discusses the current state of the problem of preserving reproductive material in young cancer patients. The review underlines the need to expand and intensify investigations of oncofertility due to the growing clinical need and the unresolved nature of many tasks. The paper considers the proposed techniques to protect the ovaries before chemotherapy and radiotherapy and up-to-date procedures to obtain and preserve oocytes and embryos, defines ovarian stimulation protocols, and evaluates their effectiveness and safety. There are data on experimental directions in this area and on prospects for their use in clinical practice.*

**Keywords:** cancer patients; preservation of reproductive material; oncofertility; cryopreservation; oocytes; embryos; ovarian tissue; autotransplantation; *in vitro* maturation.

**Author contributions:** Nazarenko T.A., Burduli A.G., Martirosyan Ya.O., Dzhnanashvili L.G.: development of the design of the investigation; obtaining data for analysis; review of publications on the topic of the article; analysis of the findings; writing the text of the manuscript.

**Conflict of interests.** The authors declare that there are no possible conflicts of interest.

**Financing.** The investigation has not been sponsored.

*For citation:* Nazarenko T.A., Burduli A.G., Martirosyan Ya.O., Dzhnanashvili L.G.  
Cryopreservation of reproductive material in cancer patients.  
Akusherstvo i Ginekologiya/ Obstetrics and gynecology. 2019; 9: 40-9. (In Russian)  
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.9.40-49>

За последние несколько лет наблюдается растущий интерес к сохранению фертильности онкологических больных, что связано с улучшением выживаемости при раке, повышением внимания к качеству жизни онкологических больных в ремиссии, постоянным прогрессом в области вспомогательных

репродуктивных технологий, а также с большей осведомленностью врачей и больных о возможностях сохранения репродуктивного материала.

К сожалению, растет число заболевших раком, в том числе молодых людей. По данным Всемирной организации здравоохранения и International Agency

for Research on Cancer, в 2018 г. в мире зарегистрировано более 18 млн новых случаев заболевания раком. К 2030 г. ожидается увеличение числа заболевших раком до 23,6 млн человек в год [1].

Из 100 000 случаев гинекологических злокачественных новообразований, диагностируемых каждый год, 15–20% обнаруживаются у женщин до 40 лет. Раннее выявление и улучшение протоколов лечения значительно увеличили выживаемость; так, 5-летняя выживаемость при раке молочной железы (РМЖ) у женщин в репродуктивном и пубертатном периодах составляет 90% [2].

Вместе с тем в современном обществе существует явная тенденция к сдвигу репродуктивного возраста в сторону его поздних границ, что уже приводит к тому, что у значительной части женщин рак диагностируется раньше, чем рождается первый ребенок. К сожалению, вероятнее всего, такая ситуация в дальнейшем может стать привычной.

В этой связи сохранение репродуктивного материала молодых женщин для отсроченного материнства является актуальной и крайне сложной проблемой современной медицины.

За последнее десятилетие накоплен определенный международный опыт, позволяющий делать обоснованные выводы и рекомендации для клинического применения. Тем не менее вопросов, требующих решения, больше, чем однозначных ответов, что обуславливает необходимость продолжения и активизации исследований в этом направлении.

Во-первых, необходимо решить, кому показано проведение программ, направленных на сохранение репродуктивного материала. Решение этого вопроса лежит в плоскости взаимодействия онкологов и репродуктологов, совместно определяющих целесообразность сохранения репродуктивного материала. Онкологи оценивают перспективы долгосрочного выживания после лечения основного заболевания, что зависит, естественно, от стадии онкологического процесса. Важной и не вполне решенной проблемой является степень риска потери репродуктивной функции при проведении терапии онкологического заболевания. В этой связи существует необходимость выделения группы больных, у которых лечение онкологического заболевания не приводит к снижению репродуктивной функции. Это в основном те случаи, когда не проводится химио-/лучевая терапия или пациентке не грозит удаление репродуктивных органов. Примером могут служить органосохраняющие операции при раке шейки матки (РШМ) 1А стадии, раке щитовидной железы и ряде других ситуаций [3]. Но периоды лечения, реабилитации, в том числе и психологической, требуют времени. Если женщина изначально имеет сниженные репродуктивные возможности в силу возраста, низких показателей овариального резерва, наличия гинекологических заболеваний, бесплодия в анамнезе, то это время может быть фатальным для ее дальнейших репродуктивных намерений, что еще раз подчеркивает необходимость совместного определения возможностей каждой пациентки для отсроченного деторождения. Недаром американским обществом клинической онкологии (ASCO)

в 2006 г. было декларировано, что все медицинские работники должны учитывать возможность бесплодия, вызванного лечением рака, и направлять пациентов, которые просят сохранить фертильность, к врачам-репродуктологам как можно скорее, до начала лечения [4]. Ключевыми словами в этом заявлении являются «как можно скорее» и «до начала лечения», так как сегодня мы не можем абсолютно точно предсказать степень гонадотоксичности проводимой терапии и влияние времени лечения на репродуктивные возможности пациентки. Следует заметить, что это утверждение относится не только к доказанно токсичным видам лечения, но и к использованию длительной терапии гормональными препаратами – антиэстрогенами, агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ), прогестинами [5].

Большие надежды специалисты возлагали на предварительную защиту яичников при проведении гонадотоксичной терапии. В качестве способа сохранения функции яичников использовали препараты агонистов ГнРГ, которые обязательно назначали больным. Оправдались ли эти надежды?

Эффект агониста ГнРГ основан на гипотезе о том, что подавление гипофиза и «инактивация» активности яичников приведет к снижению чувствительности к цитотоксическим средствам. Однако, по мнению специалистов, активация первичных и вторичных фолликулов не зависит от гонадотропинов, поэтому защитное влияние агонистов ГнРГ не может быть объяснено таким образом [6]. Следует признать, что возможное защитное действие агонистов ГнРГ и способ этого действия в настоящее время неясны.

Тем не менее большинство метаанализов с 2011 г. показали более низкую частоту возникновения преждевременной недостаточности яичников после введения агониста ГнРГ при проведении химиотерапии. Однако не удалось достоверно доказать, связано ли это с назначением агониста ГнРГ или с другими факторами – дозами препаратов, возрастом пациенток и исходным состоянием овариального резерва. Привлекает внимание работа Demeestere et al. [7], которые опубликовали первое исследование по долгосрочному действию агонистов ГнРГ и не смогли продемонстрировать преимуществ со средним периодом наблюдения 5,3 года после химиотерапии. В настоящее время все еще существуют потребность в пояснениях и необходимость дополнительных проспективных рандомизированных исследований по использованию агонистов ГнРГ.

В качестве новых возможных методик защиты яичников рассматривается применение иматиниба – конкурентного ингибитора тирозинкиназы, сфингозин-1-фосфата (S1P) – ингибитора апоптотического пути, колониестимулирующего фактора роста гранулоцитов (G-CSF), антимюллерова гормона (АМГ), AS101 и, возможно, других веществ [8]. Сегодня проводится поиск новых способов защиты яичников, и, к сожалению, нельзя гарантировать сохранение репродуктивной функции, назначая агонисты ГнРГ. Стоит ли тогда применять

с этой целью столь дорогостоящее лечение, имеющее выраженные побочные эффекты?

Транспозиция яичников – метод, давно известный и широко применяемый в клинической практике [9]. По мнению специалистов, транспозицию яичников следует рекомендовать при проведении целевой лучевой терапии на область малого таза, но она не подходит для пациентов, которые подвергаются общему облучению тела. Результаты транспозиции яичников перед лучевой терапией зависят от различных факторов: хирургического метода [10], характера облучения, исходного состояния яичников. Данные метаанализа, состоящего из 24 публикаций с общим количеством 892 пациентов, демонстрируют, что показатель успешности в смысле сохраненной функции яичников достигает 90% [11]. Однако даже эти оптимистичные результаты не позволили специалистам сделать однозначные выводы вследствие неоднородности случаев и отсутствия проспективных рандомизированных исследований.

Резюмируя сказанное, вывод о приоритетности методов предварительного забора и консервации репродуктивного материала не подлежит сомнению, в чем единодушны все специалисты [12]. Значимыми при принятии конкретных решений являются ответы на вопросы кому, когда, какой материал и как консервировать. Если с точки зрения онкологии имеют бесспорное значение характер и выраженность онкологического процесса, определяющие долгосрочные перспективы выживаемости больных, то с точки зрения репродуктивной медицины важными параметрами являются возраст пациентки и состояние ее овариального резерва. Нельзя гарантировать получение яйцеклеток и полноценных эмбрионов у женщин позднего репродуктивного возраста, о чем свидетельствуют многочисленные исследования. Так, по консолидированному мнению специалистов, частота наступления беременности в программах ЭКО у женщин в возрасте 38–40 лет не превышает 20% на попытку лечения, 40–42 года – не больше 12%, после 43 лет – стремится к нулю; и это без учета неразвивающихся беременностей, частота которых у женщин позднего возраста достигает 25% [13]. В этой связи целесообразность органосохраняющего лечения и сохранения репродуктивного материала у женщин старшего возраста вызывает большие сомнения. Справедливым можно считать высказывание Y. Yoshimura [14], что целью онкофертильности является не только сохранение фертильности, но и переосмысление рождения детей, включая вариант жизни без детей. Подтверждением этого являются работы, оценивающие частоту использования пациентками ранее консервированного материала. Так, исследование Garcia-Velasco и соавт. (2018 г.) [15] включало в себя самое большое зафиксированное на данный момент количество циклов ЭКО, выполненных у пациенток с ранее криоконсервированными ооцитами. В нем отмечается, что показатели возвращения пациенток для реализации репродуктивной функции низкие, составляя 12,1% в группе женщин, консервировавших ооциты по

социальным показаниям, и 7,4% – в группе пациенток с онкологическими заболеваниями. Это связано в первую очередь с изменением психологических и социальных установок пациенток, а не с рецидивом заболевания или смертью. Все сказанное подчеркивает значимость психологического консультирования больных.

В ранге реальных методов, обеспечивающих сохранение репродуктивного материала пациентки, несомненно, первое место занимает предварительная консервация эмбрионов [16]. Наличие 4 консервированных бластоцист практически обеспечивает наступление беременности и рождение ребенка [17]. Однако возникают определенные юридические и этические проблемы [18], так как консервированные эмбрионы в равной степени принадлежат обоим партнерам, что создает трудности в их использовании при разрыве отношений. Поэтому целесообразно проведение криоконсервации некоторого количества ооцитов в неоплодотворенном состоянии, даже в случае наличия стабильного партнера. Показатели рождаемости у женщин после переноса замороженных до химио/лучевой терапии эмбрионов сопоставимы с контрольными группами, подобранными по возрасту, однако наблюдаются низкие показатели использования сохраненных эмбрионов [19].

Эффективной методикой, но уступающей консервации эмбрионов, является предварительная консервация ооцитов. Американское общество репродуктивной медицины (ASRM) декларирует, что криоконсервация ооцитов – эффективный метод онкофертильности, основанный на соответствующем консультировании пациентов [20]. По мнению некоторых специалистов, успешное размораживание ооцитов достигает 92,3%, оплодотворение происходит в 76,6% [21]. Клиническая беременность после переноса эмбрионов на размороженный ооцит составляет от 4,5 до 33,3% [22]. Существует вполне обоснованное мнение, что возможность наступления беременности зависит от количества криоконсервированных ооцитов и возраста женщины на момент их забора [23]. По результатам многоцентрового исследования женщин разного возраста (1468 женщин), которым была произведена витрификация ооцитов, наблюдается увеличение кумулятивного показателя живорождения после размораживания ооцитов в зависимости от их числа, достигнув максимального значения – 85,2%, если консервировано 15 ооцитов [24]. Используя в своих расчетах количество ооцитов, полученных до начала химиотерапии, и количество успешно оплодотворенных яйцеклеток, исследование Ferti-PROTEKT [25] рассчитало теоретическую рождаемость в зависимости от возраста женщины. В группе пациенток моложе 26 лет предполагаемая частота наступления беременности составила 40%, у пациенток от 26 до 30 лет – 35%, от 31 до 35 лет – 30%, от 36 до 40 – 25%. В исследовании Alvarez et al. [26] из 306 женщин с онкологическими заболеваниями репродуктивной системы, крови, желудочно-кишечного тракта, которым было произведено сохранение генетического материала (ооциты/



эмбрионы), 22 был произведен перенос эмбрионов; при этом частота живорождения составила 22,72%. Исследование с участием A. Cobo et al. [15] включает в себя самую большую на сегодняшний день выборку пациенток: более 6000 женщин, прошедших более 8000 программ сохранения репродуктивного материала, из которых около 700 вернулись для последующей беременности и получили 162 и 25 здоровых детей, рожденных в группе женщин, сохраняющих ооциты по желанию, и в группе онкофертильности соответственно. Целью исследования было изучение возможности функционирования программ по онкофертильности в клинической практике. Также стремились определить влияние заболевания на исход ЭКО у больных раком, у которых витрифицировали ооциты, путем сравнения с результатами, достигнутыми у женщин, которым проводилась плановая криоконсервация ооцитов по социальным показаниям. Никаких различий в количестве полученных ооцитов между двумя группами не наблюдалось. Тем не менее меньшее количество ооцитов МП было витрифицировано у онкологических больных, стимулированных с помощью летрозола, по сравнению с пациентами, у которых использовали традиционную стимуляцию гонадотропинами в протоколе с антагонистами ГнРГ [27].

Представленные данные и ряд других исследований однозначно подтверждают положение о том, что для реального сохранения репродуктивной функции онкологических больных необходима предварительная консервация достаточного количества ооцитов/эмбрионов, для чего, в свою очередь, необходимо провести стимуляцию яичников до назначения гонадотоксичной терапии. Количество полученных ооцитов зависит не только от возраста пациентки, но и от овариального резерва, который значительно варьирует у каждой женщины. По данным реестра FertiPROTEKT [28], включающего в себя сведения о 4060 женщинах, которым проводилось сохранение генетического материала с 2007 по 2013 гг., среднее количество ооцитов, собранных в зависимости от возраста, составило: в группе пациенток  $\leq 30$  лет – 12,9, в группе 31–35 лет – 12,3, в группе 36–40 лет – 9,0 и у женщин в возрасте  $>40$  лет – 5,7. Пациенткам, имеющим не гормональнозависимый рак, стимуляцию следует проводить по общим принципам, используя протокол с антагонистами ГнРГ, как более короткий и менее нагрузочный, вводя гонадотропины с начала фолликулярной фазы. Сразу же после забора ооцитов можно начать лечение онкологического заболевания. В среднем необходимо 12–14 дней для выполнения этой процедуры, и здесь крайне важны предварительные договоренности онкологов и репродуктологов, что не всегда осуществляется на практике. Пациентки обращаются в любой день менструального цикла, а онкологи определяют время до начала лечения 10–14 днями. В связи с этим репродуктологами разработаны так называемые Random start-протоколы, когда стимуляция яичников может быть начата в любой день менструального цикла [29]. Исследователи отмечают, что частота беременности

после начала стимуляции в поздней фолликулярной или лютеиновой фазе так же высока, как и после начала стимуляции в ранней фолликулярной фазе, а частота встречаемости пороков развития не изменяется [30]. Согласно исследованиям, проведенным на сегодняшний день, стимуляция, начавшаяся в лютеиновую фазу, занимает на 1–2 дня дольше и требует немного более высокой дозы гонадотропинов, нежели при начале стимуляции в раннюю фолликулярную фазу [28]. В зависимости от фазы цикла, стимуляция может осуществляться следующим образом:

- начало стимуляции в раннюю и среднюю фолликулярную фазу: традиционный протокол с антагонистом ГнРГ, гонадотропины – человеческий менопаузальный гонадотропин (ЧМГ) или рекомбинантный ФСГ (рФСГ), добавление антагониста ГнРГ при диаметре доминантного фолликула  $\geq 14$  мм, введение агониста ГнРГ в качестве триггера овуляции (трипторелин 0,2 мг) при наличии не менее 3 фолликулов  $\geq 17$  мм;
- в конце фолликулярной фазы, при наличии преовуляторного фолликула вводят агонист ГнРГ 0,2 мг в качестве триггера овуляции, фолликул можно пунктировать и продолжать стимуляцию в лютеиновую фазу;
- начало стимуляции в лютеиновую фазу: гонадотропины – ЧМГ или рФСГ, агонист ГнРГ (трипторелин 0,2 мг) в качестве триггера овуляции. При такой стимуляции доза гонадотропинов несколько выше, чем при начале стимуляции в раннюю фолликулярную фазу;
- двойная стимуляция. При двойной стимуляции [31] первоначально проводится стимуляция по классическому протоколу с антагонистами ГнРГ, в качестве триггера овуляции используют агонист ГнРГ. Можно предположить, что первая стимуляция также может быть начата в любой фазе цикла (случайное начало стимуляции). Мелкие фолликулы не аспирируют. Вторая стимуляция начинается примерно через 5 дней. Время, необходимое для двойной стимуляции, составляет около 30 дней.

Было проведено несколько исследований для обнаружения корреляций между онкологическим заболеванием и предполагаемым ответом на стимуляцию яичников. В одних исследованиях сделали выводы о более низком ожидаемом ответе на стимуляцию, по сравнению с контрольными группами [27, 32], в то время как другие специалисты опровергли эти выводы [33–36]. В работе Turan et al. [37] в метаанализ было включено 10 ретроспективных когортных исследований по типу случай-контроль, сравнивавших ответ яичников на стимуляцию у женщин, больных раком, и у здоровых женщин соответствующего возраста (контрольная группа). Авторы не установили снижения количества полученных ооцитов у женщин с РМЖ. Ученые собираются проводить дальнейшие расширенные исследования, в которых будет учитываться наличие мутации гена *BRCA*, что предоставит более полную информацию об общем влиянии РМЖ на предполагаемую реакцию яичников на стимуля-

цию. И все-таки большинство специалистов считают, что разница в числе получаемых зрелых ооцитов у онкологических больных и других пациенток программ ЭКО объясняется не влиянием заболевания на ответ яичников, а более мягкими и ненагрузочными протоколами лечения, которые используют у больных раком. Прежде всего, это относится к гормональнозависимым заболеваниям, а среди них РМЖ встречается наиболее часто у молодых женщин [38]. Можем ли мы стимулировать яичники у больных РМЖ, когда и как? Несомненно, до начала химиотерапии. Наши исследования продемонстрировали тактику ведения больных РМЖ, когда четкая согласованность действий онколога и репродуктолога позволила консервировать ооциты/эмбрионы в промежуток времени между операцией и химиотерапией. При этом использовались разные протоколы стимуляции, и сразу после забора ооцитов пациентки получали первый курс химиотерапии [39]. Главная задача при проведении стимуляции яичников у этой группы больных – не допустить сверхвысоких уровней эстрогенов в преовуляторном периоде и в то же время получить достаточное количество зрелых ооцитов. Большинство исследователей рассматривают использование ингибиторов ароматазы – с одной стороны, как индуктора фолликулогенеза, с другой – как протективное антиэстрогенное средство при эстрогензависимых заболеваниях. Тем не менее работы, оценивающие показатели эффективности и безопасности, достаточно противоречивы [40]. По данным Oktay K. et al. [41], в циклах стимуляции с летрозолом антральное пространство формируется раньше, и критерии введения триггера должны быть расширены на 2–3 мм, с целью достижения тех же показателей зрелости ооцитов, что и при стандартных протоколах. Использование стандартных критериев можно объяснить низким ответом на стимуляцию, о котором сообщалось в некоторых исследованиях. Никаких различий в количестве полученных ооцитов между двумя группами не наблюдалось, тем не менее, меньшее количество ооцитов МП было витрифицировано у онкологических больных, стимулированных с помощью летрозола, по сравнению с пациентами, у которых использовались стандартные протоколы стимуляции [27]. Вероятно, более низкие дозы гонадотропинов, применяемые у этих пациентов, объясняют меньшее количество зрелых ооцитов. Недавнее исследование показало, что в протоколах с использованием летрозола получали сравнимое количество ооцитов, но зрелых среди них было меньше [36]. Тем не менее преовуляторные уровни эстрадиола у онкологических больных при использовании специальных протоколов были как минимум в два раза ниже, чем у пациенток, применяющих стандартную стимуляцию, что, несомненно, – главный итог в контексте рассматриваемой проблемы. С этой целью в большинстве исследований рекомендуется применять ингибиторы ароматазы, например, летрозол 5 мг (2,5 мг каждое утро и вечер с первого дня стимуляции) [42]. Очевидно, что существует необходимость в обобщении имеющегося опыта и разработке про-

токолов стимуляции, объединяющих показатели безопасности и эффективности лечения. Внушают оптимизм последние исследования, подтверждающие безопасность проведения стимуляции отсутствием значительного увеличения долгосрочного риска РМЖ у женщин после ЭКО [43, 44].

Получение незрелых ооцитов без стимуляции яичников и доращивание их *in vitro* до зрелого состояния (*in vitro maturation, IVM*) – направление, которое известно больше 30 лет [45]. Несмотря на первоначальный интерес, методика дозревания ооцитов не стала широко использоваться в клинической практике вследствие низкой частоты беременностей, по сравнению с традиционным ЭКО. Ученые объясняют это низким качеством дозревших ооцитов в результате асинхронного созревания ядра и интрацитоплазматических структур клетки в условиях *in vitro* [46]. Новый интерес к указанному направлению возник в контексте сохранения репродуктивного материала у онкологических больных. Действительно, в ряде случаев нельзя и нет времени проводить стимуляцию и забирать ооциты у пациентки. Прежде всего, это касается опухолей яичников, когда используют методики дозревания и последующей консервации ооцитов, полученных из удаленного яичника. Исследования в этом направлении интенсивно проводятся, результаты пока не очевидны. Отмечается, что после дополнительной криоконсервации ооцитов, которая необходима в качестве меры по сохранению фертильности, показатели успешности IVM снижаются [47]. Cao et al. [48] сообщили, что только 13% созревших, криоконсервированных и оплодотворенных ооцитов развивались в эмбрионы, по сравнению с 33% – без предварительной криоконсервации. Roesner и соавт. [49] сообщили только о 2 родах после 32 циклов оттаивания в 61 случае криоконсервирования *in vitro* созревших ооцитов. Авторы делают вывод, что процедура IVM не очень эффективна и должна проводиться только у женщин с большим количеством антральных фолликулов, и только если 2 недели, необходимые для стимуляции яичников, недоступны. Huang et al. [50] сообщают о результатах IVM у 4 женщин в возрасте 21–38 лет. У 3 женщин была выполнена частичная овариэктомия и у 1 – полная овариэктомия. В общей сложности из ткани от 4 женщин было получено 11 ооцитов, из которых только 8 ооцитов смогли созреть, в дальнейшем была проведена их витрификация. Это и другие более поздние сообщения показывают, что из удаленной ткани яичника может быть собрано очень мало ооцитов. Кроме того, если учесть низкие темпы развития бластоцисты и низкую рождаемость, очевидно, что этот метод не столь эффективен, что, по всей видимости, послужило основанием для разработки еще одной экспериментальной методики – технологии *ex vivo* получения и дальнейшего *in vitro* дозревания ооцитов. Источником незрелых ооцитов, способных к дозреванию в условиях *in vitro*, служит мозговой слой яичника [51]. Сегодня существует значительный интерес исследователей к этому направлению, разрабатываются способы эффективного дозрева-

ния ооцитов, полученных из мозгового слоя яичников и, что особенно важно, методов тестирования качества эмбрионов при их оплодотворении.

Нельзя не упомянуть о продолжающихся исследованиях, направленных на получение половых клеток из стволовых. В настоящее время эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, обнаруженные в кортексе яичника, были дифференцированы в ооциты. Кульминацией исследований стало успешное рождение потомства у мышей. Имеются данные экспериментальных исследований об успешно завершенных программах IVМ, проведенных на клетках человека [52, 53].

Криоконсервация и трансплантация овариальной ткани – направление, которое обсуждается довольно давно. Согласно обновленным клиническим рекомендациям Американской Ассоциации Клинических Онкологов, на данный момент трансплантация криоконсервированной овариальной ткани все еще остается экспериментальной методикой, но может рассматриваться в качестве метода выбора у онкологических больных препубертатного возраста. Ожидается пересмотр отношения сообщества к данному направлению и более широкое его внедрение в клиническую практику [54].

Поскольку объем криоконсервированной ткани невелик, а некоторые из фолликулов дегенерируют во время криоконсервации и трансплантации, трансплантаты активны только в течение нескольких лет; трансплантат не может долгосрочно восстановить функцию яичников и выступить в роли заместительной терапии, а также отсрочить менопаузу, на чем настаивали ряд авторов [55]. Исходя из чего, трансплантацию предварительно консервированной ткани яичника можно рассматривать только в кон-

тексте сохранения и восстановления репродуктивной функции [56]. Специалисты указывают на риски метода, связанные с повторными хирургическими вмешательствами, потенциальной возможностью метастазов в яичнике и рядом других [57]. Тем не менее это направление интенсивно разрабатывается. На данный момент предлагается большое количество экспериментальных методик для повышения эффективности криоконсервации овариальной ткани. В исследовании Man L. et al. [58] с целью уменьшения ишемии и, таким образом, увеличения частоты наступления беременности у пациенток, подвергающихся аутотрансплантации, описывается метод совместной трансплантации экзогенных эндотелиальных клеток (ЕхЕС) с криоконсервированной тканью яичника на мышинной модели ксенотрансплантата для ускорения перфузии ткани яичника. Совместная трансплантация с ЕхЕС увеличивала объем и качество фолликулов, а ЕхЕС, экспрессирующие АМГ, способствуют сохранению покоящихся первичных фолликулов. Эта комбинированная стратегия может быть полезным инструментом для уменьшения ишемии и модуляции фолликулярной активации в контексте сохранения фертильности и/или лечения бесплодия в целом. Новая двухэтапная процедура трансплантации овариальной ткани совместно со стволовыми клетками, полученными из жировой ткани, направленная на повышение выживаемости фолликулов за счет усиления ревазуляризации в ксенотрансплантированной ткани яичника (ASC), была недавно предложена Manavella et al. [59]. При использовании этого подхода наблюдаются более высокие показатели выживаемости трансплантированной ткани. Кроме того, были продемонстрированы значительно более низкие показатели роста фолликулов и апоптоза.

**Таблица. Методы сохранения фертильности у молодых пациенток с онкологическими заболеваниями**

	Эмбрионы	Ооциты	Ткань яичника
Показатель	Лейкемия, рак молочной железы, лимфома, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак яичников и органов репродуктивной системы, злокачественная меланома, опухоль мозга, саркома и т.п.	Лейкемия, рак молочной железы, лимфома, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак яичников и органов репродуктивной системы, злокачественная меланома, опухоль мозга, саркома и т.п.	Рак молочной железы, лимфома и т.п. (при рассмотрении возможности аутотрансплантации)
Возраст, годы	16–45	14–40	0–40 (включая детей)
Продолжительность лечения, недели	2–8	2–8	1–2
Метод криоконсервации	Витрификация	Витрификация	Витрификация или медленная заморозка
Выживаемость после оттаивания, %	95–99	90	90
Стоимость в Японии	3000–4500	2000–3500	5500–7000 (+5500–7000 для трансплантации)
Количество родов	40 000/год в Японии	6000 во всем мире	100 во всем мире (на этапе исследований)
Частота наступления беременности (ЧНБ)	ЧНБ 30–40% на эмбрион	ЧНБ 4,5–12% на ооцит	ЧНБ 20–30% на одну трансплантацию



Учитывая urgency ситуации, многие специалисты не без основания настаивают на необходимости использования всех доступных методик. Интересной может быть обобщенная тактика, представленная в работе японских ученых [14], определяющая место тех или иных способов сохранения репродуктивного материала при ряде онкологических заболеваний (таблица).

Оптимизм внушает интенсивное развитие методик, которые сейчас считаются экспериментальными, но через непродолжительное время, несомненно, станут широко использоваться в клинической практике.

## Заключение

Резюмируя представленные данные, можно с уверенностью сказать, что, несмотря на все сложности, в медицине реально существует направление сохранения репродуктивного материала у онкологических больных, востребованность которого повышается. Залогом успеха являются быстрые и координированные действия онкологов и репродуктологов, а клиническими способами для сохранения репродуктивного материала сегодня могут быть консервация ооцитов и эмбрионов, полученных при стимуляции яичников.

## Литература/References

1. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
2. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>
3. *Lindegaard J.C.* et al. The European Society of Gynaecological Oncology/ European Society for Radiotherapy and Oncology/ European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2018; 28: 641-655.
4. *Loren A.W., Mangu P.B., Beck L.N., Brennan L., Magdalinski A.J., Partridge A.H., Quinn G., Wallace W.H., Oktay K.* Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*. 2013; 31: 2500-2510.
5. ACOG Committee Opinion No. 747. *Obstetrics & Gynecology*. 2018; 132(2): e67-e77.
6. *Lambertini M., Horicks F., Del Mastro L., Partridge A.H., Demeestere I.* Ovarian protection with gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy in cancer patients: From biological evidence to clinical application. *Cancer Treatment Reviews*. 2019; 72: 65-77.
7. *Demeestere I., Brice P., Peccatori F.A., Kentos A., Dupuis J., Zachee P., Casasnovas O., Van Den Neste E., De Maetelaer V., et al.* No evidence for the benefit of gonadotropin-releasing hormone agonist in preserving ovarian function and fertility in lymphoma survivors treated with chemotherapy: Final long-term report of a prospective randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2016; 34: 2568-2574.
8. *Rones H., Kashi O., Meirou D.* Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. *Fertility and Sterility*. 2016; 105: 20-29.
9. *Moawad N.S., Santamaria E., Rhoton-Vlasak A., Lightsey J.L.* Laparoscopic Ovarian Transposition Before Pelvic Cancer Treatment: Ovarian Function and Fertility Preservation. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2017; 24: 28-35.
10. *Arian S.E., Goodman L., Flyckt R.L., Falcone T.* Ovarian transposition: a surgical option for fertility preservation. *Fertil Steril*. 2017; 107(4): e15.
11. *Gubbala K., Laios A., Gallos I., Pathiraja P., Haldar K., Ind T.* Outcomes of ovarian transposition in gynaecological cancers; a systematic review and meta-analysis. *Journal of ovarian research*. 2014; 7: 69.
12. *von Wolff M., Germeyer A., Liebenthron J., Korell M., Nawroth F.* Practical recommendations for fertility preservation in women by the FertiPROTEKT network. Part II: fertility preservation techniques. *Arch Gynecol Obstet*. 2017; 297(1): 257-267.
13. *Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., Werner M.D., Upham K.M., Treff N.R., Scott R.T.* The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility*. 2014; 101 (3): 656-663.
14. *Takai Y.* Recent advances in oncofertility care worldwide and in Japan. *Reproductive medicine and biology*. 2018; 17(4): 356-368.
15. *García-Velasco J., Domingo J., Cobo A., Remohí J., Pellicer A.* Elective and Oncofertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Human Reproduction*. 2018; 33: 2222-2231.
16. *Rajabi Z., Aliakbari F., Yazdekhasti H.* Female Fertility Preservation, Clinical and Experimental Options. *Journal of reproduction & infertility*. 2018; 19(3): 125-132.
17. *Назаренко Т.А., Сухих Г.Т., Мишьева Н.Г.* Бесплодие и возраст. М.: МедПресс-Информ, 2014; 266 с. [Nazarenko T.A., Suhikh G.T., Mishieva N.G. *Besplodie i vozrast*. M.: MedPress-Inform, 2014; 266 s. (In Russian)]
18. *Weinberg M., Dirnfeld M.* Fertility Preservation and Women's Hopes- The Dilemmas of Social Egg Freezing. *Ann Infert Rep Endocrin*. 2018; 1(1): 1001.
19. *Cardozo E.R., Thomson A.P., Karmon A.E., Dickinson K.A., Wright D.L., Sabatini M.E.* Ovarian stimulation and in-vitro fertilization outcomes of cancer patients undergoing fertility preservation compared to age matched controls: a 17-year experience. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(4): 587-96.
20. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility*. 2012; 99(1): 37-43.
21. *Rabadan S., Cobo A., Martínez M., García-Velasco J.A., Pellicer A., Domingo J.* Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 29: 722-728.
22. *Kato K.* Vitrification of embryos and oocytes for fertility preservation in cancer patients. *Reprod Med Biol*. 2016, 15: 227-233.
23. *Stillman R.J., Richter K.S., Tucker M.J., Graham J.R., Doyle J.O., Lim J.* Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval. *Fertility and Sterility*. 2015; 105: 459-466.e2
24. *Coello A., Cobo A., García-Velasco J.A., Remohí J., Domingo J., Pellicer A.* Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertility and Sterility*. 2015; 105: 755-764.e8.
25. *Lawrenz B., Jauckus J., Kupka M., Strowitzki T., Von Wolff M.* Efficacy and safety of ovarian stimulation before chemotherapy in 205 cases. *Fertility and Sterility*. 2010; 94: 2871-2873.
26. *Alvarez R.M., Ramanathan P.* Fertility preservation in female oncology patients: The influence of the type of cancer on ovarian stimulation response. *Human Reproduction*. 2018; 33: 2051-2059.
27. *Domingo J., Guillén V., Ayllón Y., Martínez M., Muñoz E., Pellicer A., García-Velasco J.A.* Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment. *Fertility and Sterility*. 2012; 97: 930-934.
28. *Boots C.E., Meister M., Cooper A.R., Hardi A., Jungheim E.S.* Ovarian stimulation in the luteal phase: systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(8): 971-80.
29. *Kuang Y., Hong Q., Chen Q., Lyu Q., Ai A., Fu Y., Shoham Z.* Luteal-phase ovarian stimulation is feasible for producing competent oocytes in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment, with optimal pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*. 2014; 101: 105-111.
30. *Chen H., Wang Y., Lyu Q., Ai A., Fu Y., Tian H., Cai R., Hong Q., Chen Q., Shoham Z., et al.* Comparison of live-birth defects after luteal-phase ovarian stimulation vs. conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization

- and vitrified embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*. 2015; 103: 1194-1201.e2.
31. *de Ziegler D., Wolf J.P., Moffat R., Pirtea P., Gayet V., Chapron C.* Dual ovarian stimulation is a new viable option for enhancing the oocyte yield when the time for assisted reproductive technology is limited. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 29: 659-661.
  32. *Klock S.C., Zhang J.X., Kazer R.R.* Fertility preservation for female cancer patients: early clinical experience. *Fertility and Sterility*. 2010; 94: 149-155.
  33. *Quintero R.B., Helmer A., Huang J.Q., Westphal L.M.* Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertility and Sterility*. 2010; 93: 865-868.
  34. *Almog B., Azem F., Gordon D., Pauzner D., Amit A., Barkan G., Levin I.* Effects of cancer on ovarian response in controlled ovarian stimulation for fertility preservation. *Fertility and Sterility*. 2012; 98: 957-960.
  35. *Robertson A.D., Missmer S.A., Ginsburg, E.S.* Embryo yield after in vitro fertilization in women undergoing embryo banking for fertility preservation before chemotherapy. *Fertility and Sterility*. 2011; 95: 588-591.
  36. *Quinn M.M., Cakmak H., Letourneau J.M., Cedars M.I., Rosen M.P.* Response to ovarian stimulation is not impacted by a breast cancer diagnosis. *Human Reproduction*. 2017; 32: 568-574.
  37. *Turan V., Quinn M.M., Dayioglu N., Rosen M.P., Oktay K.* The impact of malignancy on response to ovarian stimulation for fertility preservation: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*. 2018; 110: 1347-1355.
  38. *Creux H., Monnier P., Son W.Y., Buckett, W.* Thirteen years' experience in fertility preservation for cancer patients after in vitro fertilization and in vitro maturation treatments. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018; 35: 583-592.
  39. *Назаренко Т.А., Шарипова Н.Ю., Пароконная А.А. и соавт.* Возможности сохранения генетического материала у больных раком молочной железы. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2011; 22 (1).[Nazarenko T.A., Sharipova N.Ju., Parokonnaja A.A. i soavt. Vozmozhnosti sohraneniija geneticheskogo materiala u bol'nyh rakom molochnoj zhelezy. Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN. 2011; 22 (1).(In Russian)]
  40. *Ben-Haroush A., Wertheimer A., Klochendler E., Sapir O., Shufaro Y., Oron G.* Effect of letrozole added to gonadotropins in controlled ovarian stimulation protocols on the yield and maturity of retrieved oocytes. *Gynecological Endocrinology*. 2018; Dec 31: 1-4.
  41. *Oktay K., Hourvitz A., Sahin G., Oktay O., Safro B., Cil A., Bang H.* Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006; 91: 3885-3890.
  42. *Oktay K., Turan V., Bedoschi G., Pacheco F. S., Moy F.* Fertility Preservation Success Subsequent to Concurrent Aromatase Inhibitor Treatment and Ovarian Stimulation in Women With Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015; 33(22): 2424-9.
  43. *Van Den Belt-Dusebout A.W., Spaan M., Lambalk C.B., Kortman M., Laven J.S.E., Van Santbrink E.J.P., Van Der Westerlaken L.A.J., Cohen B.J., Braat D.D.M., Smeenk J.M.J., et al.* Ovarian stimulation for in vitro fertilization and long-term risk of breast cancer. *JAMA – Journal of the American Medical Association*. 2016; 316: 300-312.
  44. *Rodgers R. J., Reid G. D., Koch J., Deans R., Ledger W. L., Friedlander M., Gilchrist R. B., Walters K.A., Abbott J. A.* The safety and efficacy of controlled ovarian hyperstimulation for fertility preservation in women with early breast cancer: a systematic review. *Human Reproduction*. 2017; 32 (5): 1033-1045.
  45. *Lim K.S., Chae S.J., Choo C.W., Ku Y.H., Lee H.J., Hur C.Y., Lim J.H., Lee W.D.* In vitro maturation: Clinical applications. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2013; 40(4): 143-7.
  46. *Lu C., Zhang Y., Zheng X. et al.* *Sci. China Life Sci.* 2018; 61: 633.
  47. *Khalili M.A., Shahedi A., Ashourzadeh S., Nottola S.A., Macchiarelli G., Palmerini M.G.* Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017; 34(11): 1413-1426.
  48. *Cao Y.X., Chian R.C.* Fertility preservation with immature and in vitro matured oocytes. *Semin Reprod Med*. 2009; 27: 456-464.
  49. *Roesner S., von Wolff M., Eberhardy I., Beuter-Winkler P., Toth B., Strowitzki T.* In vitro maturation: a five-year experience. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2012; 91: 22-27.
  50. *Huang J.Y.J., Tulandi T., Holzer H., Tan S.L., Chian R.C.* Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertility and Sterility*. 2008; 89: 567-572.
  51. *Park C.W., Lee S.H., Yang K.M., Lee I.H., Lim K.T., Lee K.H., Kim T.J.* Cryopreservation of in vitro matured oocytes after ex vivo oocyte retrieval from gynecologic cancer patients undergoing radical surgery. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2016; 43(2): 119-25.
  52. *Sarma U., Findlay J.K., Hutt K.* Oocytes from stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018; 55: 14-22.
  53. *Smitz J.E.J., Gilchrist R.B.* Are human oocytes from stem cells next? *Nature Biotechnology*. 2016; 34: 1247-1248.
  54. *Oktay K., Harvey B.E., Partridge A.H., Quinn G.P., Reinecke J., Taylor H. S., Loren A.W.* Fertility preservation in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*. 2018; 36(19): 1994-2001.
  55. *Andersen C.Y., Kjærsgaard M., Ernst E., Birkebæk N.H., Clausen N.* Case report: Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *European Journal of Cancer*. 2012; 49: 911-914.
  56. *von Wolff M., Stute P.* Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue exclusively to postpone menopause: technically possible but endocrinologically doubtful. *Reprod Biomed Online*. 2015; 31: 718-721
  57. *Masciangelo R., Bosisio C., Donnez J., Amorim C.A., Dolmans M.M.* Safety of ovarian tissue transplantation in patients with borderline ovarian tumors. *Human Reproduction*. 2018; 33: 212-219.
  58. *Man L., Park L., Bodine R., Ginsberg M., Zaninovic N., Schattman G., Schwartz R. E., Rosenwaks Z., James D.* Co-transplantation of Human Ovarian Tissue with Engineered Endothelial Cells: A Cell-based Strategy Combining Accelerated Perfusion with Direct Paracrine Delivery. *J. Vis. Exp.* 2018; (135): e57472.
  59. *Donnez J., Desmet C.M., Manavella D.D., Cacciottola L., Jordan B.F., Amorim C.A., Dolmans M.M.* Adipose tissue-derived stem cells in a fibrin implant enhance neovascularization in a peritoneal grafting site: a potential way to improve ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction*. 2017; 33: 270-279.

Поступила 25.03.2019

Принята в печать 19.04.2019

Received 25.03.2019

Accepted 19.04.2019

#### Сведения об авторах:

**Назаренко Татьяна Алексеевна**, д.м.н., профессор, директор института репродуктивной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» МЗ России. Тел.: +7 (495)4381341. E-mail: t.nazarenko@mail.ru. Адрес: 117997, Россия, ул. Академика Опарина, д. 4.

**Бурдули Анна Георгиевна**, к.м.н., с.н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495)5314444. E-mail: burdulianna@gmail.com

Адрес: 117997, Россия, ул. Академика Опарина, д. 4.

**Мартиросян Яна Ованнесовна**, ординатор ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» МЗ России. Тел.: +7(916)9500745. E-mail: marti-yana@index.ru

Адрес: 117997, Россия, ул. Академика Опарина, д. 4.

**Джанашвили Лана Георгиевна**, аспирант ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» МЗ России. Тел. +7 (962)918-5619. E-mail: lana.janashvili@gmail.com

Адрес: 117997, Россия, ул. Академика Опарина, д. 4.



**About the authors:**

*Tatiana A. Nazarenko*, MD, Professor, Director of the Research and educational center for assisted reproductive technologies named after F. Paulsen-senior, National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Health of Russia. Tel.: 8(495)5314444.

E-mail: t.nazarenko@mail.ru

117997, Russia, Moscow Ac. Oparina Street 4.

*Anna G. Burduli*, MD, Candidate of Medical Science, Senior researcher in IVF department named after B.V. Leonov in National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Health of Russia. Tel.: 8(495)5314444. E-mail: burdulianna@gmail.com

117997, Russia, Moscow Ac. Oparina Street 4.

*Yana O. Martirosyan*, clinical resident, National Medical Research Center of Obstetrics, Gynaecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Ministry of Helth of Russia. Tel.: +79169500745. E-mail marti-yana@index.ru

117997, Russian, Moscow, Ac. Oparina str. 4.

*Lana G. Dzhnashvili*, fellow, National Medical Research Center of Obstetrics, Gynaecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov,

Ministry of Helth of Russia. Tel.: +79629185619 E-mail lana.janashvili@gmail.com

117997, Russian, Moscow, Ac. Oparina str. 4.

Bionika Media