

to the low frequency as well as the high variability of ACAs in patients with chronic phase CML. In this study, rate of this phenomenon and its impact on the resistance to TKI therapy in CML patients was evaluated.

Overall, 502 (91.8%) patients had only the classic translocation t(9;22)(q34;q11) without ACAs at diagnosis. 45 (8.2%) patients presented with additional cytogenetic findings at diagnosis: 29 (5.3%) patients had variant translocations t(9;V;22), which were formed by three chromosomes, and in 16 patients (2.9%) had ACAs. One patient had both and was included in the group of patients with ACAs.

The analysis of the tumor clone reduction dynamics by the Kaplan-Meier method did not reveal statistically significant differences in the cumulative complete cytogenetic and major molecular response rates ($p = 0.712$ and $p = 0.111$ respectively) between the patients with classical translocation t(9;22), patients with variant translocations and patients with ACAs. Analysis of long-term outcomes demonstrated inferior event-free (EFS), progression-free (PFS) and overall survival (OS) in CML patients with ACA at diagnosis. At 3 years, for patients with a classic translocation, patients with ACAs, and patients with a variant translocation t(9;V;22), the probability of EFS was 84,9% (95% CI, 81,2% – 88,6%), 93,8% (95% CI, 81,8% – 100,0%) and 43,9% (95% CI, 17,4% – 70,4%), respectively. The probability of PFS was 92,0% (95% CI, 89,3% – 94,7%), 93,3% (95% CI, 80,8% – 100,0%) and 60,6% (95% CI, 35,9% – 85,3%), respectively. The probability of OS was 93,8% (95% CI, 91,3% – 96,4%), 93,8% (95% CI, 82,1% – 100,0%) and 76,2% (95% CI, 65,2% – 87,2%), respectively. No statistical difference was observed between the patients with classic translocation t(9;22) and those with variant translocations in terms of EFS, PFS and OS.

Chromosomal abnormalities that appeared in CML patients at diagnosis and are not classic CML-specific translocation t(9;22)(q34;q11) may impair the prognosis of disease outcome. The presence of variant transactions in diagnosis does not impact the TKI therapy effectiveness. Additional chromosomal abnormalities in Ph+ cells lead to loss of the achieved cytogenetic and/or molecular response, disease progression, and the overall survival reduction in CML patients, treated with TKI.

Key words: chromosomal aberrations, chronic myeloid leukemia, prognostic factors, resistance, tyrosine kinase inhibitors.

Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 23.03.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-234-237

УДК 618.111-008:612.621.31:575.113

Феськов О. М., Жилкова Є. С., Феськов В. О., Сотник Н. М., Руденко В. А.

ОСОБЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ ВІД ЧОЛОВІКІВ З ВИРАЖЕНИМ ПОРУШЕННЯМ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Центр Репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.» (м. Харків)

zhilkova@feskov.com.ua

Вступ. Згідно літературним даним, практично у 60% випадків причиною непліддя у подружжі є зниження репродуктивної функції чоловіків [1]. Досягнення сучасної медицини, зокрема застосування методів допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) з використанням процедури інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда у ооцит (ІКСІ), дають можливість отримати запліднення навіть від пацієнтів з такими порушеннями сперматогенезу, як зниження рухливості, концентрації та частки морфологічно нормальних сперматозоїдів [2]. Наразі дані досліджень щодо впливу порушення репродуктивної функції у чоловіків на розвиток ембріонів та виникнення у них анеуплоїдії є неоднозначними. Одним з головних критеріїв нормального розвитку ембріона є формування бластоцисти на п'яту добу культивування. Індекс частоти формування бластоцист (ЧФБ) прийнято розглядати як один з основних критеріїв для вибору ембріона, здатного до імплантації [3,4]. Згідно результатам досліджень Charuis A. (2017), зниження кількості сперматозоїдів в еякуляті (олігозооспермія) негативно впливає на ранній розвиток ембріонів [5]. З іншого боку, French D.B. з колегами (2010) показали, що зниження таких параметрів репродуктивної функції чоловіків, як концентрація та частка морфологічно нормальних форм сперматозоїдів в еякуляті, не впливають на процес формування бластоцист у програмах екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) [6].

Окрім того, залишається відкритим питання щодо зв'язку появи анеуплоїдії у бластоцистах з вираженим зниженням параметрів чоловічої фертильності. Наприклад, у своєму дослідженні Gat I. (2017) показав відсутність асоціації між порушенням сперматогенезу і виникненням анеуплоїдії у бластоцистах [7]. З іншого боку, Ganza A.L. з колегами (2016) довели у своїй роботі, що виражена олігозооспермія впливає на наявність хромосомних порушень у ембріонах та веде до зниження результативності лікування непліддя при використанні ДРТ [8].

Мета дослідження. У зв'язку з вищевикладеним, метою даної роботи стало дослідження залежності процесу формування і плідності бластоцист, при отриманні ембріонів від чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією методами допоміжних репродуктивних технологій, від таких параметрів, як концентрація, рухливість та морфологія сперматозоїдів в еякуляті.

Об'єкт і методи дослідження. Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводили в «Клініці професора Феськова О.М.» (м. Харків). За період 2017–2018 рр. була проведена передімплантатійна генетична діагностика (ПГД) 229 ембріонів на стадії бластоцисти, отриманих у програмах екстракорпорального запліднення від 67 чоловіків віком від 32 до 46 років зі значним зниженням репродуктивної функції. Результати щодо частки анеуплоїдних ембрі-

онів, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, було порівняно з висновками передімплантаційної генетичної діагностики для 122 бластоцист, отриманих від 24 чоловіків віком від 28 до 39 років з нормальними показниками репродуктивної функції. Мікроскопічний аналіз еякуляту виконано з інтерпретацією показників репродуктивної функції згідно рекомендаціям ВООЗ від 2010 року [9].

Для всіх пацієнтів зі значними порушеннями сперматогенезу було проведено молекулярно-генетичний аналіз мікрделецій AZF-локусу Y хромосоми: sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ) і гену SRY як внутрішнього контролю методом ПЛР [10]. Виділення ДНК зі зразків периферичної крові проводилося за допомогою наборів для екстракції ДНК «NucleoSpin Blood» (Німеччина). ПЛР виконано з використанням системи «ABI PRISM 7500 real-time PCR system» (США). Послідовність використаних праймерів відповідає рекомендаціям National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Було досліджено каріотип пацієнтів зі зниженою репродуктивною функцією. Для проведення цитогенетичних досліджень препарати хромосом отримували з лімфоцитів периферичної крові за стандартною методикою із застосуванням GTG-методу диференційного забарвлення хромосом [11]. Результати цитогенетичного дослідження наведені відповідно до Міжнародної системи номенклатури цитогенетики людини [12].

У рамках програм екстракорпорального запліднення для контрольованої стимуляції овуляції (КСО) донорів ооцитів застосовували довгий протокол з а-ГнРГ. Отримані після трансвагінальної пункції ооцити запліднені методом ІКСІ. Культивування ембріонів до стадії бластоцисти виконано в середовищах GAIN medium Early Stage та GAIN medium Blastocyst (Австрія) за температури 36,8°C – 37,0°C та вмісті CO₂ 5,5% – 5,7% [13]. Передімплантаційну генетичну діагностику ембріонів на стадії бластоцисти проведено з використанням метода секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) [14].

При проведенні статистичного аналізу дані перевірені на відповідність закону нормального розподілу. Для виявлення зв'язку між показниками параметрів мікроскопічного аналізу еякуляту з рівнем анеуплоїдії у бластоцистах та морфологічними особливостями ембріонів використано кореляційний аналіз за Спірменом. Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критерію χ^2 за рівнів значущості 0,05, 0,025, 0,01 [15].

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті молекулярно-генетичного тестування у чоловіків зі зниженими параметрами спермограми не



Рис. 1. Бластоциста 5АА за класифікацією D. K. Gardner *in vitro* перед процедурою біопсії. Збільшення x250.

виявлено мікрделецій AZF-локусу Y хромосоми sY84 (DYS273), sY86 (DYS148), sY127, sY134 (DYS224), sY254 (DAZ), sY255 (DAZ). У всіх пацієнтів зазначеної групи встановлено нормальний чоловічий каріотип 46,XY.

З 229 бластоцист, отриманих від пацієнтів зі зниженою репродуктивною функцією, біопсія на п'ятий день культивування була виконана для 144 ембріонів та на шостий день – для 85 бластоцист, відповідно. Фото бластоцисти перед процедурою біопсії наведено на **рисунок 1**.

За результатами ПГД встановлено, що частка еуплоїдних ембріонів, отриманих від пацієнтів з вираженими порушеннями сперматогенезу, статистично значуще менша у порівнянні з даними контрольної групи – 33,6% проти 53,3%, відповідно ($df = 1$, $\chi^2_{\text{крит.}} = 6,635$, $\chi^2_{\text{факт.}} = 7,897$, $p < 0,01$).

Під час дослідження зв'язку наявності анеуплоїдії у бластоцистах, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, з класичними показниками спермограми продемонстровано статистично значущу позитивну кореляцію між часткою еуплоїдних ембріонів та концентрацією сперматозоїдів в еякуляті. Вплив таких показників чоловічої репродуктивної функції як рухливість та морфологія сперматозоїдів на частку анеуплоїдних бластоцист у даній досліджуваній групі не доведено (**таблиця**).

Досліджено зв'язок показників чоловічої репродуктивною функції з морфологічними властивостями ембріонів, отриманими від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, беручи до уваги морфологію внутрішньоклітинної маси (ВКМ) та трофектодерми (ТЕ) бластоцист (**рис. 2, 3**). Встановлено, що порушення рухливості сперматозоїдів веде до зниження якості

Таблиця. морфології як внутрішньоклітинної маси ($r_s = 0,184$, $R_{\text{критичне}} = 0,182$, $N = 229$, $p < 0,01$) та і трофектодерми бластоцист ($r_s = 0,170$, $R_{\text{критичне}} = 0,139$, $N = 229$, $p < 0,05$). Доведено, що порушення морфології сперматозоїдів (тератозооспермія) впливає на морфологічні ознаки ТЕ ($r_s = 0,154$, $R_{\text{критичне}} = 0,139$, $N = 229$, $p < 0,05$). Вплив концен-

Зв'язок наявності анеуплоїдії у бластоцистах, отриманих від пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, з класичними параметрами спермограми

Параметр спермограми		Кількість чоловіків, N	Кількість бластоцист, N	Частка еуплоїдних бластоцист, %	r_s	$R_{\text{кр}}$	p
Найменування	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$						
Рухливість, %	5,3±3,6	67	229	33,6	-0,020	0,139	$p > 0,05$
Концентрація, млн./мл	53,0±19,3	67	229	33,6	0,151	0,139	$p < 0,05$
Морфологія, %	13,2±9,3	67	229	33,6	0,137	0,139	$p > 0,05$

Примітки: p – рівень значущості, r_s – коефіцієнт кореляції Спірмена.

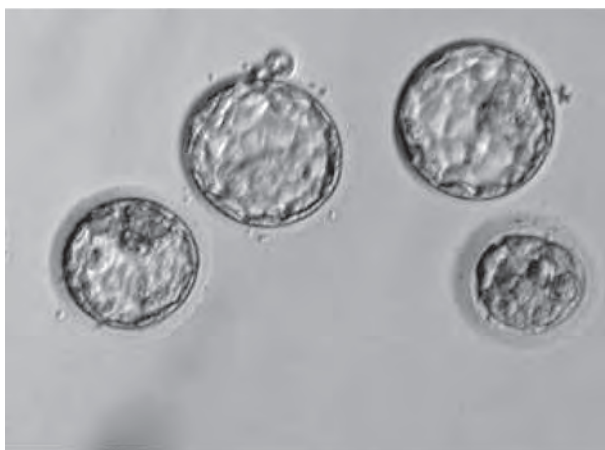


Рис. 2. Бластици з нормальною морфологією. Збільшення x100.



Рис. 3. Бластици з порушеннями морфологічних параметрів. Збільшення x250.

трації сперматозоїдів в еякуляті на морфологію ембріонів, отриманих від чоловіків зі зниженими параметрами репродуктивної функції, у даному дослідженні не доведено.

Продемонстровано зв'язок морфології бластоцист з результатами передімплантаційної генетичної діагностики. Показано статистично значущу позитивну кореляцію між зниженням якості морфології трофобласту бластоцист з наявністю анеуплоїдії у ембріонах ($r_s = 0,183$, $R_{\text{критичне}} = 0,182$, $N = 229$, $p < 0,01$). Зв'язок між результатами ПГД та морфологією ВКМ у даній роботі не доведено ($r_s = 0,095$, $R_{\text{критичне}} = 0,139$, $N = 229$, $p > 0,05$).

Отримані у даній роботі результати свідчать про те, що виявлення значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення генетичної діагностики ембріонів на передімплантаційному етапі. Даний висновок має важливе практичне значення, беручи до уваги наведені раніше у літературі дані про відсутність зв'язку результатів ПГД з якістю сперми. Наприклад, Sills E. Scott зі співавт. (2014) у своїй роботі показали відсутність зв'язку між результатами генетичної діагностики на передімплантаційному етапі, проведеної на ембріонах, отриманих від донорів ооцитів, від параметрів сперми [16]. V. Burruel (2014), у своєму дослідженні показав, що на 7-й та 8-й день розвитку анеуплоїдні бластоцисти мають такі ж саме морфологічні властивості, як й еуплоїдні ембріони [17]. Наведені у даній роботі дані підтверджують зв'язок між

зниженням чоловічої репродуктивної функції й якістю ембріонів, отриманих у рамках програм ЕКЗ, що має важливе практичне значення, беручи до уваги, що ряд авторів стверджує, що якість ембріонів залежить лише від якості ооцитів [18-21].

Висновки. Доведено зв'язок між зниженням чоловічої репродуктивної функції й якістю ембріонів, отриманих у рамках програм екстракорпорального запліднення. Продемонстровано статистично значущу позитивну кореляцію між часткою еуплоїдних ембріонів, отриманих від чоловіків з порушеннями сперматогенезу, та концентрацією сперматозоїдів в еякуляті. Показано прямий зв'язок між зміною морфологічних ознак бластоцист і наявністю анеуплоїдії у ембріонах. Виявлення значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення генетичної діагностики ембріонів на передімплантаційному етапі.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати щодо зв'язку морфологічних властивостей бластоцист з наявністю у них анеуплоїдії може бути суттєвим у практиці. Висока якість морфології ембріону не завжди корелює з високою частотою імплантації. Значна частка морфологічно нормальних ембріонів після перенесення до матки пацієнтки у програмах ЕКЗ не імплантується. Наразі, актуальним є розробка методів, що дадуть можливість обрати найкращий ембріон в результаті лікування непліддя з використанням ДРТ для настання здорової вагітності та отримання здорового потомства.

Література

1. Bhasin S. Approach to the infertile man. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(6):1995-2004.
2. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. Int Braz J Urol. 2011;37(1):5-15.
3. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. Human Reprod. 2002;17(8):2415-8.
4. Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage – stage embryos. Hum Reprod. 2001;16(9):1970-5.
5. Chapuis A, Gala A, Ferrières-Hoa A, Mullet T, Bringer-Deutsch S, Vintejoux E, et al. Sperm quality and paternal age: effect on blastocyst formation and pregnancy rates. Basic Clin Androl [Internet]. 2017 Jan;27(2). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12610-016-0045-4>
6. French DB, Sabanegh ES Jr, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? Fertil Steril. 2010;93(4):1097-103.
7. Gat I, Tang K, Quach K, Kuznetsov V, Antes R, Filice M, et al. Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. PLoS One [Internet]. 2017;12(6):e0179002. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179002>
8. Ganza AL, Whitehouse MC, Lee JA, McGovern PG, Bar-Chama N, Copperman AB, et al. Male factor infertility and aneuploidy: do couples with male factor infertility have a lower rate of euploid embryos? Fertility and Sterility. 2016;106(3):226-7.
9. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 287 p.
10. Fesai OA, Pampukha VM, Solovyov OO, Livshits LA. Molecular-genetic analysis of AZF gene defects located on Y-chromosome, and CFTR gene in male infertility. Biopolymers and Cell. 2008;24(3):231-7.

11. Zerova-Lyubimova TE, Gorovenko NG. Standarti analizu preparativ hromosom lyudini (metodichni rekomendaciyi). Kiyiv: Kiyivska medichna akademiya pislyadiplomnoyi osviti imeni P.L. Shupika; 2003. 52 s. [in Ukrainian].
12. Shaffer KG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 2009. 138 p.
13. Martin J. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil. Steril.* 2013;99(4):1054-61.
14. Kulakov VI, Leonov BV. Ekstrakorporalnoe oplodotvoreniye i ego novye napravleniya v lechenii zhenskogo i muzhshkogo besplodiya (teoreticheskie i prakticheskie podhody). Rukovodstvo dlya vrachej. 2-e izdanie. Moskva: Medicinskoe informacionnoe agenstvo; 2004. 784 s. [in Russian].
15. Petrie A, Sabin C. Medical Statistics at a Glance. Winnipeg: Blackwell Science; 2000. 157 p.
16. Sills ES. Determining parental origin of embryo aneuploidy: analysis of genetic error observed in 305 embryos derived from anonymous donor oocyte IVF cycles. *Mol. Cytogenet* [Internet]. 2014;7:68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-014-0068-5>
17. Burrue V. Abnormal early cleavage events predict early embryo demise: sperm oxidative stress and early abnormal cleavage. *Sci. Rep* [Internet]. 2014;4:6598. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep06598>
18. Lopez G. Diagnostic value of sperm DNA fragmentation and sperm high-magnification for predicting outcome of assisted reproduction treatment. *J. Androl.* 2013;15(6):790-4.
19. Speyer BE. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* 2012;25(7):1609-18.
20. Brahem S. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology.* 2011;78(4):792-6.
21. Osman A. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed Online* [Internet]. 2015;30(2):120-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.10.018>

ОСОБЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНОЇ ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ ВІД ЧОЛОВІКІВ З ВИРАЖЕНИМ ПОРУШЕННЯМ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Феськов О. М., Жилкова Є. С., Феськов В. О., Сотник Н. М., Руденко В. А.

Резюме. Отримані в ході дослідження дані підтверджують зв'язок між зниженням чоловічої репродуктивної функції та якістю ембріонів, отриманих в рамках програм ЕКЗ. Доведено вплив концентрації сперматозоїдів в еякуляті на еуплоїдність бластоцист, отриманих із застосуванням методів ДРТ ($r_s = 0,151$). Виявлено прямий зв'язок між морфологією бластоцист і такими параметрами класичної спермограми як рухливість і частка сперматозоїдів з нормальною морфологією в еякуляті ($r_s = 0,184$ і $r_s = 0,170$, відповідно). Зниження якості морфології бластоцист позитивно корелює з наявністю анеуплоїдій в ембріоні ($r_s = 0,183$). Виявлення значних відхилень параметрів спермограми при мікроскопічному аналізі еякуляту є показанням до проведення генетичної діагностики ембріонів на передімплантаційній етапі.

Ключові слова: чоловіча репродуктивна функція, ПГД, ЕКЗ, сперматогенез.

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭМБРИОНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МУЖЧИН С ВЫРАЖЕННЫМИ НАРУШЕНИЯМИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Феськов А. М., Жилкова Е. С., Феськов В. А., Сотник Н. Н., Руденко В. А.

Резюме. Полученные в ходе исследования данные подтверждают связь между снижением мужской репродуктивной функции и качеством эмбрионов, полученных в рамках программ ЭКО. Доказано влияние концентрации сперматозоидов в эякуляте на euploidность бластоцист, полученных с применением методов ВРТ ($r_s = 0,151$). Выявлена прямая связь между морфологией бластоцист и такими параметрами классической спермограммы как подвижность и доля сперматозоидов с нормальной морфологией в эякуляте ($r_s = 0,184$ и $r_s = 0,170$, соответственно). Снижение качества морфологии бластоцист положительно коррелирует с наличием анеуплоидий в эмбрионе ($r_s = 0,183$). Выявления значительных отклонений параметров спермограммы при микроскопическом анализе эякулята является показанием к проведению генетической диагностики эмбрионов на предимплантационном этапе.

Ключевые слова: мужская репродуктивная функция, ПГД, ЭКО, сперматогенез.

FEATURES OF PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS OF EMBRYOS OBTAINED FROM MEN WITH SEVERE SPERMATOGENESIS FAILURES

Feskov O., Zhyilkova Ye., Feskov V., Sotnyk N., Rudenko V.

Abstract. Recently high attention in the reproductive medicine is paid to the paternal genome failures. Assisted reproductive techniques, and especially intracytoplasmic sperm injection, allow couples whose sperm characteristics are impaired to obtain a pregnancy, whereas a few years ago, these couples would have had to use sperm donation in order to obtain their child.

The effect of spermatogenesis failures on the process of the blastocysts' formation and embryos' euploidy in IVF practice was studied in present work. Preimplantation genetic diagnostics was carried out for 229 blastocysts obtained from 67 men with low reproductive function by the methods of assisted reproductive techniques. It was showed the relationship between the failures in male reproductive function and the quality of embryos in IVF cycles. The effect of the concentration of spermatozoa in the ejaculate on the euploidy of blastocysts in ART is proved ($r_s = 0.151$). A strong positive correlation between the blastocyst morphology and such sperm parameters as motility and the morphology of spermatozoa in the ejaculate is demonstrated ($r_s = 0.184$ and $r_s = 0.170$, respectively). Poor blastocyst morphology is positively correlated with the presence of aneuploidy in the embryo ($r_s = 0.183$).

The observed data indicate that the detection of significant deviations of the microscopic sperm parameters is an indication for a preimplantation genetic diagnosis (preimplantation genetic testing for aneuploidies) of embryos in IVF cycles. This conclusion is of great practical significance, as the results of the most published studies demonstrated no association between the embryos' euploidy and sperm quality. The obtained results regarding the correlation of the blastocysts' morphology with the presence of aneuploidy can be significant in practice as the high quality of the embryo's morphology does not always correlate with the high frequency of implantation.

Key words: male reproductive function, PGD, IVF, spermatogenesis.

*Рецензент – проф. Тарасенко К. В.
Стаття надійшла 25.03.2019 року*