

РАБОТА НАД ОШИБКАМИ

CRISPR (короткие, регулярно разделенные, палиндромные повторы, расположенные группами) – участки ДНК, отвечающие за адаптивный иммунитет микроорганизмов.

Технология CRISPR/Cas9 основана на механизмах защитной системы бактерий, препятствующей проникновению чужеродной ДНК в клетку. Биологи взяли ее на вооружение для изменения генов с целью исправления вредных или создания намеренных мутаций, имеющих положительный эффект: препятствующих старению, помогающих лечить наследственные, приобретенные или инфекционные заболевания человека.

Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 – мощный инструмент для внесения изменений в ДНК растений, животных и даже людей – получила в 2020 г. Нобелевскую премию по химии. Но как только речь зашла о ее применении не для селекции сельскохозяйственных культур, а для избавления человека от генетических поломок и даже противостояния старению. . . ряд стран и международных организаций, вроде ВОЗ и ЮНЕСКО, высказались за ее запрет. Одним из камней преткновения стал этический момент: не скатимся ли мы, модифицируя геномы, к евгенике? Но, с другой стороны, корректно ли приостанавливать развитие технологии, дающей ключ к несбыточной пока мечте – излечению от генетических болезней и увеличению продолжительности жизни? А ведь некоторые визионеры и вовсе считают, что связанные с CRISPR способы регенерации позволят человечеству достичь физического бессмертия. Подискутировать на эту тему мы пригласили **Алексея Янцевича**, заведующего лабораторией белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси, **Галину Мозгову**, руководителя Национального координационного центра биобезопасности (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси), **Татьяну Романовскую** – доцента кафедры генетики биофака БГУ, преподавателя дисциплины «Теория эволюции» и **Татьяну Новицкую**, научного сотрудника Института философии НАН Беларуси.

– Человек уже научился вмешиваться в естественный отбор: беременные проходят генетический скрининг, при ЭКО ведется типирование эмбрионов, медики выхаживают малышей весом 500 г и менее. Применение CRISPR-терапии логически продолжило бы этот ряд. Ведь, несмотря на все меры, и в нашей стране, и в мире примерно у 5% детей первого года жизни все равно выявляются редкие генетические заболевания, часто неизлечимые. Почему же вопросы о допустимости вмешательства в природные процессы возникли сейчас, а не на предыдущих этапах?



Т. Романовская. Давайте сразу определимся с предметом разговора. В теории, технология, основанная на системе CRISPR/Cas, позволяет изменить генетический текст в живой клетке согласно тому, какую редакцию было решено осуществить

специалистом-генетиком. Чтобы провести такую модификацию генома, в клетку нужно внести несколько составляющих компонентов системы (их может быть 2 или 3 в зависимости от решаемой задачи). На практике редактирование с некоторой вероятностью может пройти не совсем так, как задумывалось – это неизбежное следствие внутренних механизмов клеточной физиологии. Об этом аспекте важно помнить, когда мы обсуждаем возможности и риски, связанные с применением технологии. Еще один существенный момент касается того, какие именно клетки требуется модифицировать. Если производить манипуляции на уровне зиготы (оплодотворенной яйцеклетки), то полученные изменения генетической информации сохранятся во всех клетках растущего организма (женского или мужского), и они будут переданы и детям данной женщины или мужчины. Когда же манипуляции производятся на соматических тканях уже сформированного организма, то изменения не выйдут за рамки конкретной ткани и человека. Если говорить о потенциальном применении системы CRISPR/Cas для лечения генетически обусловленных заболеваний у человека, то под абсолютным запретом находится именно первый вариант – редактирование эмбрионов. Что касается второго – локального воздействия на соматические клетки, то это вовсе не запрещено, наоборот, сейчас интенсивно проводятся исследования, направленные на скорейшее использование потенциала этой технологии в сфере медицины. Дело дошло уже и до клинических испытаний с реальными пациентами.

Кому и чем могло бы помочь редактирование эмбрионов? Для того чтобы его осуществить, нужно провести ЭКО и делать все манипуляции на зиготе. То есть этот вариант имеет смысл только тогда, когда мы заранее ожидаем возможного рождения ребенка с пороками развития – работаем с родителями, которые сами больны из-за наличия каких-то мутаций. Один из способов для них произвести на свет здорового ребенка – использовать экстракорпоральное оплодотворение. На этапе ЭКО можно с помощью генетического тестирования отобрать эмбрионы, не содержащие мутаций. Применение CRISPR/Cas предполагает возможность переписать мутантный вариант гена в нормальный, но отбор эмбрионов все равно остается необходимым – ведь эта технология не работает со 100%-ной точностью. А хуже всего то, что возникающие при редактировании неточности очень легко не заметить – они могут присутствовать не во всех, а лишь в некоторых клетках эмбриона. Это потенциально может привести к самым разным осложнениям, включая повышенную предрасположенность к онкозаболеваниям, нарушения иммунной системы и пр. Те исследователи, которые при помощи этой же технологии получают животных с отредактированным геномом, хорошо знакомы с подобными проблемами. Но то, что допустимо в случае работы с животными (небольшой процент «брака») – совершенно неприемлемо при работе с людьми.

Вопрос о возможности редактирования генома человека ставится так остро, потому что все, прописанное в нем, автоматически становится наследием будущего человечества. Ответственность высочайшая. При ЭКО мы проводим в сущности все то же оплодотворение, какое существует в природе, при пренатальной диагностике воспроизводим по-своему процесс естественного отбора. Браться за переписывание генома – это существенно более высокий уровень претенциозности. Мы будем иметь последствия – хорошие или не очень – на поколения вперед.



Г. Мозгова. Несмотря на то, что молекулярная диагностика продвинулась очень далеко, обнаружить имеющимися методами отдельные мутации как у новорожденных, так и у родителей, к сожалению, еще не всегда возможно. Это связано с тем, что в настоящее время тесты на их выявление назначаются

по показаниям, если такие случаи были в семье, а полногеномное секвенирование всех людей не проводится. Зачастую такую мутацию можно определить только после рождения ребенка, потому что она рецессивна и выявить и предпринять что-то на самых ранних стадиях не всегда возможно. С развитием новых технологий, позволяющих изменять геном, вопросы о допустимости вмешательства в природные процессы будут стоять острее.



А. Янцевич. Генетический скрининг уже доказал свою значимость и эффективность для предотвращения появления генетических патологий. С этической точки зрения он в приоритете, поскольку позволяет найти точку равновесия

между этическими нормами и естественным отбором. Однако, как уже сказано, его возможности не безграничны. Для того чтобы решить проблему генетически обусловленных заболеваний, необходимо развивать и внедрять методы изменения геномов.

До открытия механизмов действия системы CRISPR/Cas9 для этой цели активно разрабатывались и использовались не универсальные, а потому трудоемкие и дорогие методы с применением эндонуклеаз TAL, и нуклеаз, содержащих цинковые пальцы. Сейчас ситуация изменилась, и редактирование генома становится рутинной задачей. Этические вопросы вышли на первый план, поскольку CRISPR-методология имеет более широкие возможности по сравнению с предыдущими.



Т. Новицкая. Генетический скрининг и отбор эмбрионов при ЭКО можно условно обобщить как методы негативной селекции: они позволяют выявить и в дальнейшем минимизировать заболевания и/или принять решение о рождении

ребенка с теми или иными патологиями. Биотехнология редактирования генома принципиально отличается от них тем, что предполагает конструктивное воздействие – изменение имеющегося биологического организма. Более того, с философско-этической точки зрения ее амбивалентность выражается в том, что с ней непосредственно связан не только колоссальный потенциал развития предиктивной, превентивной

и индивидуализированной медицины, то есть точечное терапевтическое воздействие на отдельный организм с целью его лечения, но и возможность влияния на популяцию в целом в случае инжиниринга зародышевой линии человека. Приобретенные таким образом изменения становятся наследственными, последствия этих воздействий – на грани вмешательства в естественные эволюционные процессы. Мечты трансгуманистов об автоэволюции могут стать реальностью. Речь идет об эволюции, которая перестала бы быть естественной, а целенаправлено управлялась бы ее объектом, по сути человек как объект эволюции стал бы одновременно и ее субъектом.

– Сейчас пациентам с тяжелыми генетическими заболеваниями предлагается либо паллиативная помощь, либо неподъемная по цене поддерживающая терапия, которую сподобно «потянуть» далеко не каждое государство, не говоря уже о семьях. Ферментозаместительная терапия при мукополисахаридозе стоит примерно 1 млн рублей в год, одна инъекция препарата Золгенсма при спинальной мышечной атрофии (СМА) – почти 2 млн долларов: это самый дорогой в мире препарат! Корректна ли на этом фоне безальтернативность и недоступность такого лечения для большинства? Не просматривается ли здесь интерес «биг-фармы», ее противостояние CRISPR-методам?

Г. Мозгова. Не думаю, что это интерес крупных компаний. Любая новая разработка, будь то лекарство, вакцина или технология, проходят долгий цикл исследований, включая лабораторные на модельных животных, разработку методик, технологических регламентов, длительную проверку по национальному и международному законодательству. Это оправдано, потому что здравоохранение не имеет права на ошибку. Кроме того, здесь на чаше весов биоэтические риски.

А. Янцевич. Высокая стоимость препаратов для терапии генетических заболеваний обусловлена не себестоимостью их производства, а прежде всего затратами на разработку и испытания. Для последнего требуются специальные лабораторные животные, имеющие изменения в геноме, аналогичные тем, которые вызывают причину патологии у человека. Создание таких животных – огромная работа, стоимость которой

включается в цену конечного препарата. Когда закончится патентная защита, разрыв между рыночной стоимостью оригинальных препаратов и дженериков может оказаться огромным.

Так, например, почти 5 лет понадобилось на получение подобной модели для тестирования препаратов против СМА. Исследователи сначала вырезали мышинный аналог гена SMN1 и вставили две или более копий человеческого SMN2. Затем начались тестирования и доклинические исследования целенаправленных молекул. Это длилось около 10 лет. И уже в 2016 г. на этапе клинических испытаний находились 6 препаратов. А в 2017-м FDA официально одобрен и зарегистрирован первый в мире препарат для лечения СМА – нусинерсен. Позже были одобрены еще два препарата, в том числе и Золгенсма.

В настоящее время создание трансгенных животных для разработки и испытаний новых лекарственных средств коммерциализировано и становится стандартной задачей именно благодаря CRISPR-методам.

Т. Романовская. В развитие технологии CRISPR/Cas вкладываются огромные средства и очень охотно. Об искусственном торможении речи и близко не идет. Если посмотреть базу научных публикаций биомедицинского профиля, то только за 2020 г. их было более 6 тыс. И с каждым годом их появляется все больше. С этой технологией сейчас работает чуть ли не каждая зарубежная биологическая лаборатория.

– В 2017 г. в Калифорнии впервые успешно отредактировали геном взрослого пациента с синдромом Хантера, а в 2019 китайские медики ввели отредактированные клетки крови пациенту с ВИЧ – правда, не достигли желаемого эффекта. Кроме несовершенства технологии ее риски эксперты связывают в первую очередь с тем, что она будет использоваться не только для профилактики и лечения, но и придания человеку желаемых качеств. Здесь встает вопрос и этики, и социальной справедливости, мол, кто-то сможет с ее помощью получить преимущества, особенно ценные с развитием генетического тестирования и паспортизации. А в чем, на ваш взгляд, кроются опасности?

Г. Мозгова. Несмотря на все преимущества этой технологии, в том числе точность выявления сайта разрезания ДНК, включающего, например, нуклеотид, наличие которого в молекуле

приводит к появлению нежелательного признака и который нужно удалить либо заменить, метод CRISPR/Cas9 все еще имеет недостатки. Существует целый ряд научных статей о так называемом нецелевом действии РНК-управляемой эндонуклеазы (до 50% по сравнению с естественным мутагенезом), применяемой в этой технологии, в сайтах, отличных от предполагаемого сайта-мишени. Это одна из основных проблем, препятствующих терапевтическому и клиническому применению. Ученые работают над тем, чтобы снизить либо нивелировать такое нецелевое воздействие. Создан и продолжает совершенствоваться целый ряд компьютерных программ: CCTop, Cas-OFFinder, CRISPOR, CRISPR-PLANT, CRISPR-P и других, позволяющих предсказывать этот эффект и получать молекулы с более точным воздействием на сайт-мишень. Появляются методы для точного вырезания больших фрагментов ДНК из генома – так, в 2020 г. специалистами университета Калифорнии (Сан-Франциско) был представлен новый подход – CRISPR/Cas3.

Вопросы биоэтики при этом крайне важны, каждый такой научный проект должен регулироваться государством, законами, техническими нормативными правовыми актами, потому что такие технологии могут нести как благо человечеству, так и вред. В случае разрешения такая работа на любом организме должна проходить биоэтическую экспертизу и оценку необходимости исследований.

Т. Романовская. Этические вопросы могут возникнуть, но сейчас гораздо актуальнее чисто технические моменты. Нельзя запретить генетическое тестирование и вообще медицину как такую просто потому, что это стоит денег и не всем доступно... Это вопросы, требующие законодательного регулирования в социальной сфере, а не отказа от технологии, которая реально может повысить качество жизни с учетом оценки рисков. Ну а идея производить улучшенную породу людей методом генной модификации – это скорее развлечение для фантастов и будет оставаться таковым еще очень долго, как мне кажется.

А. Янецвич. Придание человеку желаемых качеств – сложная задача. Благодаря возможностям генетического скрининга естественный отбор в популяциях человека превратился в искусственный, что и позволяет снизить генетический груз отрицательных мутаций. Такой

скрининг – это способ «улучшения» популяции. Редактирование геномов – это в перспективе способ «улучшения» индивида. Возможность коренных изменений возникла только сейчас. Однако для того, чтобы осуществлять их без последствий, нужно знать все про геном, протеом, метаболом и их связи. По мере накопления знаний редактирование генома человека вполне может стать обыденной задачей. Что касается социальной справедливости, то следует отметить, что все технические новшества проходили через определенный ряд стадий: сначала они были доступны энтузиастам, которые их создавали, потом очень богатым людям и наконец всему человечеству.

Т. Новицкая. Первый вопрос этического характера, возникающий при биомедицинских манипуляциях с эмбрионами с их модификацией на геномном уровне, – это моральный статус эмбриона. Обладая потенциалом стать субъектом, здесь он все же выступает в качестве объекта. Он еще не способен участвовать в принятии решения о своей дальнейшей судьбе. Может ли оно быть принято кем-то иным?

Еще один дискуссионный аспект связан с возможностями «улучшения человека». Действительно, в современной культуре получили широкое распространение и обсуждение идеи создания «дизайнерских младенцев», людей с определенными биологическими, физическими, когнитивными, психологическими качествами. Основные риски здесь – социальное неравенство между «улучшенным» и «естественным» человеком, а также развитых и развивающихся стран в доступе к биомедицинским технологиям, дискриминация по признаку биологических характеристик. Возникает опасность редуccionистского медико-биологизаторского подхода к человеку, согласно которому его специфические черты и особенности (как биологические, так и личностные, социальные) задаются наследственными факторами. Возникает идея, что генетические параметры человека могут быть направленно сконструированы, а значит, он сам со всеми своими внешними особенностями и внутренним миром, наклонностями и задатками рискует стать продуктом биомедицинских технологий. Например, распространение подобных способов коррекции когнитивных, социально-психологических и поведенческих проблем может вести к ослаблению их социальной регуляции и усилению биомедицинского манипулирования человеком.

Учитывая наследственную передачу приобретенных изменений существует опасность вмешательства в природу человека. И сегодня острейший вопрос биоэтики – это разграничение терапии как приемлемого воздействия и «улучшения человека» в духе транс- и постгуманизма, в частности генетической коррекции.

– Человечество всегда с недоверием воспринимало новое и непонятное – начиная от прививок и заканчивая ГМО: ученым до сих пор приходится объяснять плюсы и развенчивать мифы. Не сталкиваемся ли мы сейчас с тем же самым в научном сообществе по отношению к методу CRISPR? Запрет на часть исследований с его использованием – это инертность или разумная предосторожность?

Т. Романовская. Разумная предосторожность. На данный момент риски однозначно перевешивают потенциальные преимущества, если говорить о редактировании эмбрионов.

А. Янцевич. Менять геномы людей пока рано, нужно накопить опыт и знания в этой области. Однако забрать у отдельных людей их последний шанс на жизнь – это тоже преступление против этики.

Г. Мозгова. Запрет обусловлен принципом «не навреди». Любая новая технология или лекарство в применении к человеку должны быть проверены настолько, чтобы избежать рисков вообще либо нести самые минимальные. И если выявляется несовершенство технологии, то конечно же, осторожность оправдана. Именно поэтому основные разработки сейчас ведутся на растениях. В случае же применения CRISPR/Cas к человеку и животным либо использованию технологии геномного драйва для борьбы с малярийными комарами или грызунами обсуждение идет на уровне международных платформ соответствующих Конвенций и Протоколов, в том числе Конвенции о биологическом разнообразии и Картахенского Протокола по биобезопасности.

Т. Новицкая. В 2019 г. группа ученых из 7 стран мира, включая двух разработчиков технологии редактирования генома CRISPR/Cas, призвала к временному введению глобального моратория на все клинические применения редактирования зародышевой линии человека, то есть

изменения наследственной ДНК для создания генетически модифицированных людей. На мой взгляд, это разумная и обоснованная мера, ведь речь идет о вопросе, который в конечном итоге может затронуть весь человеческий вид. Технология должна быть в достаточной мере безопасной и эффективной для ее использования на людях. При принятии решения об ее применении следует учитывать как неудовлетворенные медицинские потребности, так и соотношение рисков и потенциальных преимуществ, а также наличие альтернативных подходов. По вопросу, который может повлиять на эволюцию человечества, принципиален и необходим международный консенсус, а для этого требуется время.

– Как вы оцениваете перспективы CRISPR в Беларуси? Что у нас делается в этой области? Должна ли работа сопровождаться общественным обсуждением? Как она регулируется?

Г. Мозгова. CRISPR рассматривается на мировой арене как очень перспективный метод, по крайней мере, для нужд сельского хозяйства и микробиологической промышленности. В нашей стране сильная школа генетиков, молекулярных биологов и микробиологов, и перспективы я оцениваю как высокие.

Как будет регулироваться такая технология, зависит от объекта исследования, а также от принимаемых решений на международной арене. Беларусь является стороной Картахенского Протокола по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии, и в рамках этого международного соглашения все еще идет обсуждение, относятся ли организмы, полученные с помощью технологий геномного редактирования, к генно-инженерным организмам (ГИО) и должны ли они регулироваться как таковые. На последнем совещании Конференции сторон Конвенции о биологическом разнообразии был одобрен доклад специальной группы технических экспертов, в котором они пришли к выводу о том, что «большинство живых организмов, уже созданных или находящихся на стадии исследований и разработки с использованием методов синтетической биологии, включая организмы, созданные для целей технологии геномного драйва, соответствуют определению живых измененных организмов (синоним «генно-инженерный организм») в рамках Картахенского Протокола». Это определение сохраняет свою актуальность.

Если организмы, разработанные методом CRISPR/Cas (растения, животные, микроорганизмы) будут относиться к ГИО, то работа с ними подпадет под Закон Республики Беларусь №96-З от 9.01.2006 г. «О безопасности генно-инженерной деятельности», который определяет двухступенчатый процесс экспертной оценки потенциальных рисков таких организмов для здоровья человека и окружающей среды (первый раз – для получения разрешения для высвобождения на опытные поля, соответствующие требованиям биобезопасности, для испытаний таких организмов, второй раз – для разрешения их использования в хозяйственной деятельности). В Законе и постановлении Совета Министров Республики Беларусь от 12.06.2019 г. №382 «Об оценке рисков в генно-инженерной деятельности и выдаче разрешительного документа» прописан процесс общественных обсуждений. При этом Закон не распространяется на отношения, связанные с применением генетической инженерии к человеку, его органам и тканям. Такие вопросы регулируются другим законодательством в стране.

Т. Новицкая. Хотелось бы подчеркнуть важность не только широкого общественного обсуждения при принятии решения о соционормативном регулировании CRISPR-технологии на государственном уровне, но и в особенности многосторонней междисциплинарной гуманитарной экспертизы данного метода, которая предполагала бы глубокий анализ его этических и социальных последствий и рисков.

Т. Романовская. В Минске мне известны как минимум 3 лаборатории (включая мою родную, на кафедре генетики БГУ), где начаты проекты, основанные на использовании системы CRISPR/Cas. Она очень удобна в качестве исследовательского инструмента, и именно так мы ее и планируем использовать, а не как средство терапии и уж тем более редактирования эмбрионов. Ограничений на такое использование этой системы нет ни в нашей, ни в какой-либо другой стране.

А. Янецвич. В Беларуси имеются все необходимые условия для активного использования современных методов редактирования геномов, начиная от оборудования и завершая высококвалифицированными специалистами. На самом деле это не такая сложная задача, как может показаться.

Конечно же, говорить о редактировании генома человека пока рано, но у методологии

CRISPR есть множество других важных применений. В нашей стране на первом этапе она должна быть ориентирована на генную инженерию микроорганизмов, сельскохозяйственных растений и животных – с целью получения штаммов-продуцентов биологически активных веществ, устойчивых к патогенам, высокопродуктивных сортов растений и пород животных.

Для реализации метода необходимы фермент – эндонуклеаза Cas9 и две молекулы РНК (crРНК и tracrРНК) – так называемый РНК-гид. Уже ранние работы показали, что эти две молекулы могут быть объединены в одну химерную sgРНК (sg=single guide). Таким образом, для редактирования генома нужно ввести в клетку два вида молекул: белок и РНК, остальное все произойдет спонтанно. Конечно, сама манипуляция имеет свои сложности: белок непросто переместить через мембрану, а РНК достаточно нестабильная молекула...

Однако есть и другая, более привлекательная стратегия: гены, кодирующие sgРНК и Cas9 можно объединить в одну молекулу ДНК и, используя классические методы (электро- и химическую трансформацию и др.), ввести ее в клетку. В этом случае клетка за счет своих ресурсов синтезирует sgРНК и фермент Cas9, используя внедренную в нее ДНК как матрицу, а далее произойдет планируемое изменение генома. Таким образом весь процесс редактирования генома можно свести к одной молекуле ДНК и способу ее переноса в клетку (изменение геномов многоклеточных организмов отдельная задача: в этом случае нужны специальные инструменты доставки). Далее необходима оценка результата: различные виды секвенирования ДНК, функционального скрининга и т.д. Все это уже сейчас доступно для реализации в нашей стране.

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси разработаны и внедрены в практику методы получения ряда реагентов для редактирования геномов. Получение двуцепочечной ДНК произвольной последовательности стало для нас рутинной задачей, которую в ближайшие годы мы планируем масштабировать от лабораторной до промышленной технологии. Сейчас мы разрабатываем способы получения протяженных фрагментов одноцепочечной ДНК, которая особенно ценна для редактирования геномов, поскольку позволяет свести к минимуму возникающие в геноме ошибки или так называемые «off-target» мутации. Ведется

работа по созданию фермента, способного синтезировать одноцепочечную ДНК произвольной длины, генерировать библиотеки генов для направленной эволюции белковых молекул.

Конечно, многие реагенты для редактирования геномов можно заказать у зарубежных компаний, например Sigma или Takara Bio. Однако одним из основных know-how в биотехнологических компаниях является именно последовательность, кодируемая генетическим кодом. По заказываемой последовательности специалисты всегда смогут распознать направление и тематику ваших разработок, выявить и скопировать новшество даже ретроспективно, после выхода готового продукта на рынок. Ожидание выполнения и доставки заказа также создает сложности при ведении собственных разработок и исследований. Кроме того, следует помнить, что наличие инфраструктуры, обеспечивающей прорывные технологии, в перспективе работает на экономическую независимость и безопасность государства.

В случае, если работа будет касаться вмешательства в генетический материал человека, она, несомненно, должна сопровождаться обсуждением. Но к нему должны привлекаться компетентные люди. Например, во времена электрификации в Великобритании газовые компании формировали общественное мнение о вредных свойствах электрического освещения и в 1879 г. подали в суд на «электричество». Свидетелями обвинения были торговцы Биллингсэтского рынка, английские леди и художники. Свидетелями защиты были ученые. В приговоре судебная комиссия постановила, что электрический свет вышел из области опытов и проб и ему необходимо предоставить возможность конкуренции с газовым освещением. И комиссия запретила передавать электрическое освещение газовым компаниям, «как некомпетентным в вопросах электротехники». Общественное мнение необходимо учитывать, но решение должны принимать эксперты на основе тщательного анализа рисков и перспектив. ■

Подготовила
Юлия ВАСИЛИШИНА

