

О.Г. Макеев, А.В. Коротков, И.Х. Измайлов,
С.В. Костюкова, М.П. Анапьев

МЕСТО МУТАЦИИ 16.169 В ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ИСТОРИИ

*Уральская государственная медицинская академия,
Лаборатория радиоизотопных методов ЦНИЛ*

В этом году исполняется 10 лет с тех пор, как было официально вскрыто групповое захоронение, ранее обнаруженное группой А.Н. Авдонина. Изначально происхождение останков связывалось с семьей последнего русского императора, расстрелянной в ночь с 16 на 17 июля 1918 года, а все последующие усилия были направлены на поиск соответствующих доказательств.

Первый этап исследований включал краниофациальную идентификацию, медико-антропологическую, судебно-стоматологическую экспертизы и судебно-медицинскую оценку повреждений костей. Кроме этого в 1992-1993 гг. выполнялась генетическая экспертиза в Алдермастонском Криминалистическом центре МВД Великобритании. Генетическое исследование основывалось на анализе последовательности D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК), экстрагированной из костных останков. Важной особенностью мтДНК является ее наследование исключительно по материнской линии. Поэтому была предпринята попытка воссоздания женской родословной линии, к которой относится Николай Романов (Рис. 1). Для этого была изучена последовательность фрагментов мтДНК образцов крови прямых потомков ветви: герцога Файфа (пра-правнука Луизы Гессен-Кассель, дистанция 4 поколения) и графини Ксении Шереметевой Сфири (пра-пра-правнучка Луизы Гессен-Кассель, дистанция 5 поколений) в сравнении с последовательностью мтДНК фрагментов скелета 4, предположительно Николая Романова (внук Луизы Гессен-Кассель, дистанция 2 поколения).

Итогом исследования, имеющим важнейшее значение для дальнейшей идентификации останков, было выявление несовпадения последовательности нуклеотидов между ныне живущими потомками и фрагментами скелета №4 в положении 16.169 цепи мтДНК. В последнем случае было также определено, как тогда считали, редчайшее явление, описываемое термином гетероплазмии – одновременное присутствие у одного

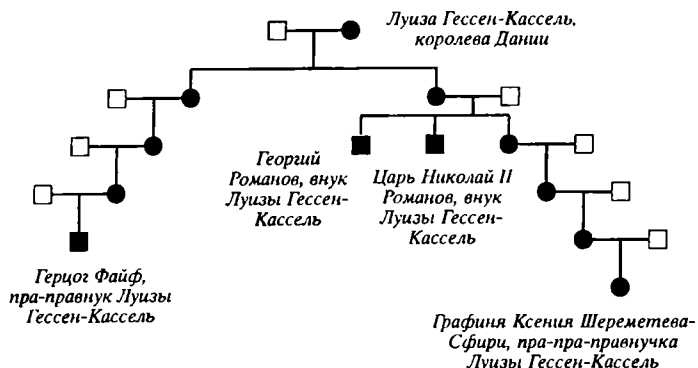


Рисунок 1. Материнская генеалогическая ветвь потомков Луизы Гессен-Кассель.

В каждой ветви линия родственников, имеющих одинаковые последовательности мтДНК, выделена затушеванными квадратами и кружками.

обследуемого объекта как мутантного генома (мутантный нуклеотид в положении 16.169), так и генома «дикого» или естественного типа, присущего остальному населению. Эти заключения были сделаны на основании сравнения с данными о 4.950 разновидностях участка D-петли, имевшихся на тот период в базе данных центра.

Если придерживаться неопределенно-мутационной модели предполагающей, что факт мутационного изменения мтДНК в Гессенской родословной линии окончательно не установлен (так, собственно и было к концу I этапа экспертизы), то вероятность принадлежности костного образца скелета №4 Николаю Романову составляет 70:1.

Принимая во внимание результаты всего комплекса выполненных исследований была установлена вероятность принадлежности останков царской семье в 98.6%. Однако «с точки зрения современной криминалистики результат нельзя было считать достаточно доказательным для такого экстраординарного случая» (Иванов П.Л., Ж-л.: Судебно-медицинская экспертиза, № 4, 1998, С. 30-47).

Следует отметить, что величина вероятности 98.6% явилась следствием неопределенности впервые зарегистрированного феномена гетероплазмии и невозможностью апеллировать к другим примерам. Для под-

тверждения мутационной природы гетероплазмии, исследования были продолжены в Военно-медицинском институте Министерства обороны США, куда в 1995 году были представлены образцы костной ткани младшего брата Николая Романова - Георгия, умершего в 1899 году. Параллельно в США исследовались все объекты, ранее изучавшиеся в Великобритании.

В процессе анализа мтДНК Георгия Романова присутствие гетероплазмии в положении 16.169 было подтверждено с несколько иным соотношением, чем у фрагмента скелета № 4 (у Георгия отношение цитидин/тимин (С/Т) – 40/60; у скелета №4 С/Т – 70/30).

На основании выполненных исследований был сделан вывод о том, что в Гессенской ветви Романовых произошла мутация мтДНК, проявляющаяся у обследованных объектов в виде гетероплазмии. Последняя является результатом дифференциальной сегрегации общего пула материнской мтДНК, который, по-видимому, также был гетероплазмичным. В свете этих данных гомоплазмичное состояние мутации четвертого и пятого поколений свидетельствует о фиксации мутации. Именно переход от гетероплазмии к гомоплазмии, четко указывает на мутационную природу выявленных различий.

Полученные результаты позволили перейти к определенно-мутационной модели, с вероятностью 1:84.800 и к 99.99% доказательности позитивности идентификации.

На сделанное заключение никак не повлиял результат исследования образца ДНК покойного племянника Николая II – Т.Н. Куликовского, который не совпал с представителями Гессенской ветви.

В ходе выполнения наших исследований по оценке уровня накопленных мутаций в митохондриальном геноме у жителей некоторых территорий Свердловской области, часть клонированной мтДНК обследованных обычно сохраняется в специальных условиях и составляет внутрिलाбораторный идентификационный банк ДНК. В связи с сомнениями, высказанными в личной беседе Александром Николаевичем Авдониным касательно достоверности выводов генетической идентификации, было выполнено исследование нуклеотидной последовательности фрагмента D-петли мтДНК 62 человек, являющихся потомками жителей наиболее загрязненной территории зоны Восточно-Уральского радиационного следа Каменского района области. Выполнение задачи было значительно облегчено

целевым поиском мутации в положении 16.169 из более чем тысячи нуклеотидных пар D-петли мтДНК.

Оказалось, что у одной жительницы Каменского района, чьи родители были отселены после аварии 1957 года на ПО «Маяк» вследствие высокого радиационного загрязнения, в положении 16.169 выявлена транзигия нуклеотида, качественно совпадающая с классической Гессенской мутацией. Интересно, что аналогичная мутация определена и у ее сына. Это подтверждает «неслучайность» данного отклонения, переданного ребенку от матери.

Последовательности нуклеотидов участка L-цепи D-петли мтДНК из фрагментов костей скелетов №4 и Георгия Романова, крови Ксении Шереметева-Сфири (из статьи Иванова П.Г., 1998) и последовательности L-цепи матери и сына Н., представлены на рисунке 2.

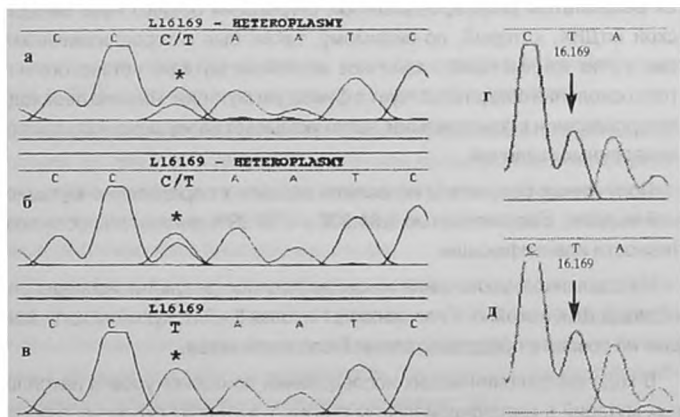


Рисунок 2. Фрагменты последовательностей мтДНК скелета 4 (а), В. кн. Георгия Александровича Романова (б), графини Ксении Шереметева-Сфири (в) и последовательностей мтДНК матери Н. (г) и ее сына Н. (д).

Звездочкой и стрелкой помечено положение 16.169.

К сожалению, особенности методики исследования не позволили дифференцировать данную мутацию по признаку плазмии. Так же не исследовалась возможная принадлежность семьи Н. к Гессенской ветви, хотя уже само предположение о проживании потомков этой ветви по ма-

теринской линии в одной из деревень Свердловской области вряд ли заслуживает серьезного обсуждения.

По-видимому, появление подобной мутации могло быть обусловлено либо высоким мутагенным фоном территории (не только техногенного, но и природного происхождения, в частности, значительной эманацией радона), либо краевым характером данной мутации (распространенностью в местной популяции).

Ключевым положением идентификации скелета №4, позволившим сменить неопределенную модель на определенную, стала впервые выявленная гетероплазмия.

Однако, анализ современных данных о распространенности гетероплазмии среди всех известных к настоящему времени 124 дифференцированных по состоянию плазмии и фенотипически значимых мутаций мтДНК позволил определить, что 72 мутации или 58.1% являются абсолютно гетероплазмичными, 18 мутаций или 14.5% встречаются в состоянии как гетеро-, так и гомоплазмии и лишь для 34 мутаций мтДНК (27.4%) подтверждено состояние гомоплазмии. Распространенность гетероплазмии среди мутаций мтДНК обусловлена состоянием частичной фиксации, то есть существованием короткоживущего переходного состояния, завершающегося формированием мутантного гена, или возвратом к гену «дикого» типа.

Итогом выполненных исследований и современных данных о распространенности гетероплазмии может стать переход к третьей модели, учитывающей частоту встречаемости мутации 16.169 в популяции местного населения. При этом вероятность доказательности идентификации останков последнего русского императора составит не более 70:1. Тем не менее очень хочется верить, что этап российской истории завершен в июле 1998 года с захоронением последних участников той трагедии.