История генетической идентификации Романовых

Два этапа генетических исследований убедили ученых в принадлежности «екатеринбургских останков» членам императорской семьи Романовых

Захоронение предполагаемых останков цесаревича Алексея и великой княжны Марии Романовых — детей императора Николая II, отложено на неопределенное время. «Восемнадцатое октября отменено. Новая дата не утверждена. Все зависит от времени прохождения всех необходимых процедур » — заявил председатель комитета по культуре Петербурга Константин Сухенко. Как известно, основная процедура – это новая генетическая экспертиза предполагаемых останков Императора Николая II и Императрицы Александры Федоровны. Поэтому предлагаем вновь открыть страницы непростой истории генетической идентификации костных останков из двух захоронений близ Екатеринбурга – именно эти генетические исследования убедили ученых в их принадлежности членам царской семьи. Это отражено в заключении межведомственной правительственной комиссии, но уголовное дело вновь открыто: предстоит повторная экспертиза. В ее преддверии итоги уже пройденного пути подвел директор Института общей генетики РАН член-корреспондент РАН Н.К. Янковский.

Одна из самых громких новостей этого месяца – возобновление Следственным комитетом уголовного дела об убийстве царской семьи в 1918 году и эксгумация захороненных останков семьи Романовых. «Необходимо провести эксгумацию останков Императора Николая II (Романова) и Императрицы Александры Федоровны (Романовой) в Петропавловском соборе города Санкт-Петербурга. Кроме того, в задачу следствия входит изучение архивных материалов, обнаруженных после 2011 года и связанных с «белогвардейским» следствием, проводившимся в 1918–1924 годах, а также с судьбой вещественных доказательств по данному уголовному делу», — подчеркнул официальный представитель Следственного комитета России Владимир Маркин.

Эксгумация проведена 23 сентября, и в этот же день директор Института общей генетики РАН член-корреспондент РАН Николай Казимирович Янковский в НИИ и Музее антропологии МГУ прочитал лекцию о том, что же на сегодняшний день известно генетикам про генетическую идентификацию членов семьи Романовых. В своей лекции он использовал данные, полученные профессором Евгением Ивановичем Рогаевым (руководителем отдела геномики и генетики человека Института общей генетики РАН).

История двух захоронений

Экспертиза останков царской семьи проводилась в два этапа, поскольку в истории этой экспертизы фигурируют два групповых захоронения.

Первое, найденное А.Н. Авдонином и Г.Т. Рябовым на Старой Коптяковской дороге близ Екатеринбурга, было вскрыто в 1991 году: в нем найдены останки девяти человек. Но из «записки Юровского» (подлинность которой некоторыми историками подвергается сомнению) — коменданта Ипатьевского дома, руководившего расстрелом царской семьи, — известно о существовании второго захоронения. Для его поисков была организована археологическая экспедиция, и в 2007 г. в 70 метрах от первого захоронения найдены следы кострища, под которым покоились останки двух человек.

Как и почему тела семи расстрелянных членов царской семьи, а также их врача, повара, камердинера и горничной, оказались в двух разных захоронениях, поясняется в той же «записке Юровского» и воспоминаниях еще двух других участников убийства. После расстрела тела убитых погрузили на грузовик и попытались спрятать их в ближайших шахтах. Однако они показались недостаточно глубоки. Тогда решили отвезти тела к более глубоким шахтам, но по дороге к ним грузовик застрял. Тогда тела расстрелянных попытались уничтожить – два тела на пробу облили кислотой и предприняли попытку сжечь на костре — но и это полностью сделать не удалось. Под кострищем выкопали яму и закопали сожженные останки. Остальные девять тел захоронили в общей могиле прямо на дороге. Такое деление на два захоронения давало убийцам надежду запутать следы — чтобы никто впоследствии не догадался об их принадлежности царской семье по количеству захороненных.

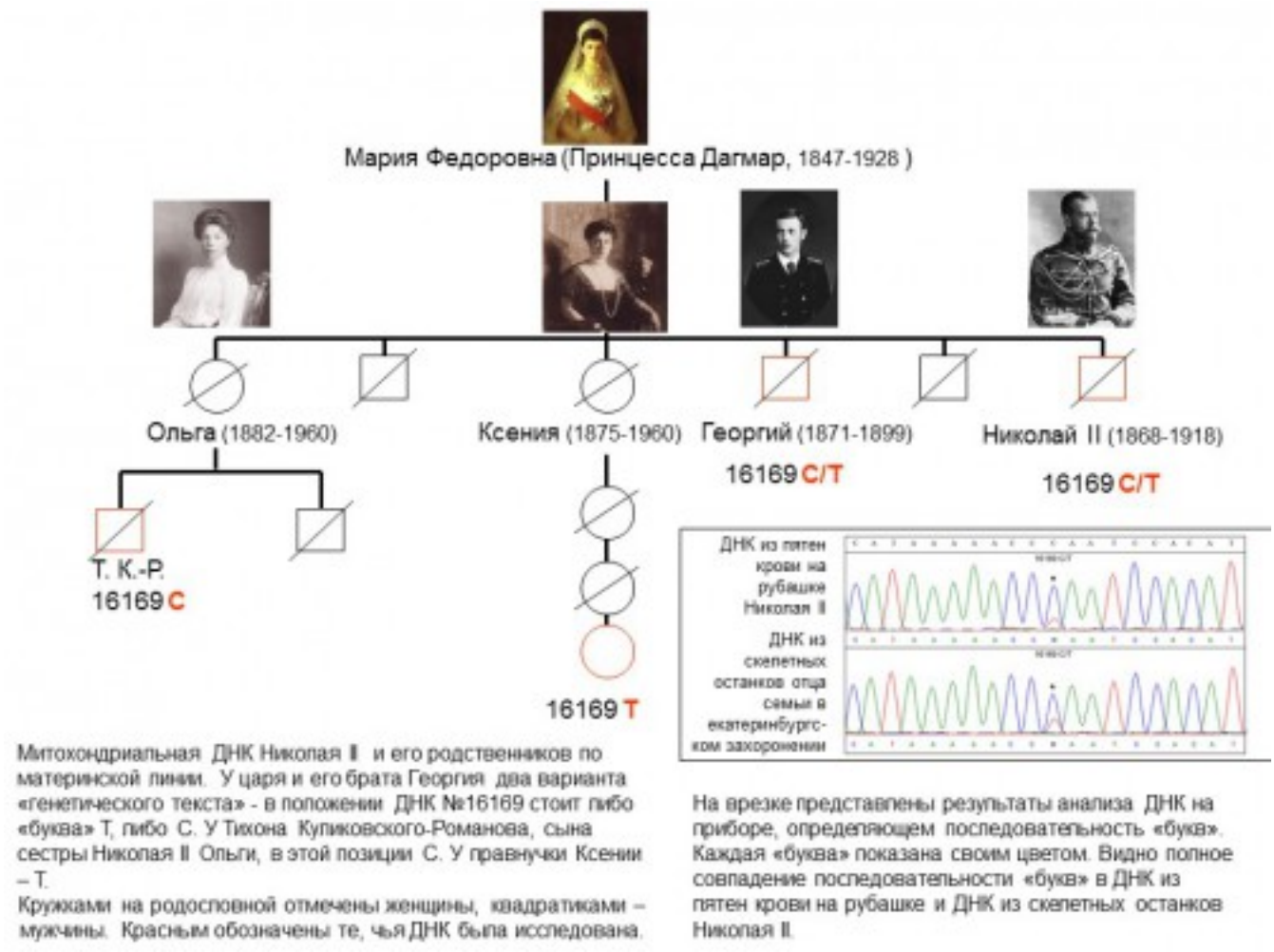
Первая экспертиза

После вскрытия первого захоронения генетическая экспертиза костных останков была организована руководителем Центра молекулярно-генетических экспертиз Павлом Леонидовичем Ивановым. По имеющейся информации, эта экспертиза проводилась не в России, а в лабораториях Англии и США. Она показала, что среди останков находятся пять членов царской семьи, за исключением царевича Алексея и одной из дочерей. Рассмотрим основные шаги первой экспертизы.

Первый шаг – определение пола. Эксперты-генетики определили половую принадлежность останков по наличию или отсутствию Y-хромосомы. Для этого служит специальный маркер (в интроне гена амелогенина), который в X- и Y-хромосомах различается по длине.

Второй шаг — найти среди останков семейную группу. С этой целью использовали STR-маркеры (короткие тандемные повторы, микросателлиты) – повторы коротких последовательностей нуклеотидов, число которых часто различно у неродственных индивидов. После проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), многократно размножающей участок ДНК, ее продукты анализировались методом электрофореза. Разное число повторов соответствует разной длине фрагментов ДНК — и на картинке электрофореза они выглядят как не совпадающие полоски. В ДНК ребенка обязательно должны присутствовать одна полоска от матери (расположенная точно там же, что и на ее электрофореграмме) и одна полоска от отца (соответствующая электрофореграмме отца). Если соответствия нет – отцовство или материнство исключается. Этим методом было выявлено, что из останков девяти человек изученного захоронении пятеро относятся к одной семейной группе: отец, мать и три дочери.

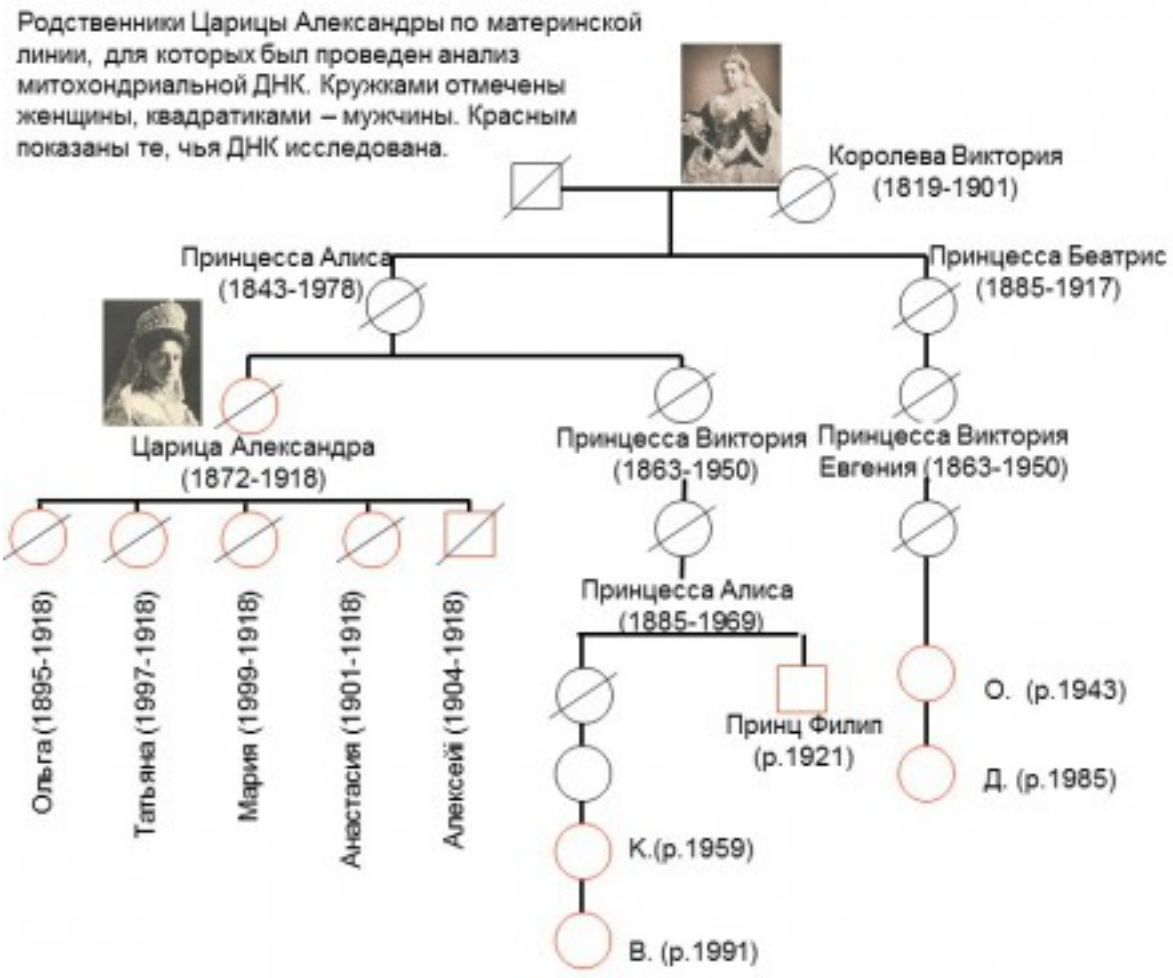
Третий шаг — проверка, действительно ли останки этих пятерых принадлежат царской семье. В то время проверить это можно было только при анализе родственников императорской семьи. Было проведено сравнение однонуклеотидного полиморфизма (SNP) митохондриальной ДНК останков №4 (предположительно Николая II) с его ныне живущими родственниками по женской линии — Ксенией Шереметьевой-Сфири и герцогом Файфом. Однако обнаружилось неполное совпадение. Картина прояснилась после того, как была проведена эксгумация останков великого князя Георгия – брата императора Николая II, похороненного в Петропавловском соборе. По всем позициям мтДНК великого князя Георгия и Николая II, как и ожидалось, совпали, поскольку оба брата должны были унаследовать мтДНК от своей матери Марии Федоровны, принцессы Дагмар. Причем в одной позиции мтДНК у великого князя Георгия эксперты нашли ту же самую особенность, что раньше их озадачила в мтДНК предположительных останков царя – гетероплазмию: смесь двух типов молекул мтДНК, различающихся одной буквой — T (тимин) и C (цитозин) в позиции 16169.



Митохондриальная ДНК Николая II и его родственников по материнской линии. Из статьи Evgeny I. Rogaev et al, 2009 (PNAS), Григоренко и соав., 2009 (Acta Naturae).

ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ. То, что сначала было источником сомнений, оказалось явлением, которое теперь вошло во все учебники под названием гетероплазмия. Оно заключается в том, что иногда в клетках одного человека может содержаться смесь разных мтДНК. Молекул мтДНК в клетках множество, они могут мутировать, и некоторые мутации сохраняются и передаются дальше при делении клетки. И у великого князя Георгия обнаружилась такое сочетание двух вариантов мтДНК в одной позиции — мтДНК с С- и Т-нуклеотидами в позиции 16169 (гетероплазмия С/Т 16169). Эксперты П.Л. Иванова клонировали эти молекулы и получили два типа клонов мтДНК – один из них содержал только С-нуклеотид, а другой — только Т-нуклеотид. Таким образом, гетероплазмия была подтверждена. Что же касается потомков, у которых ее не оказалось, то это объясняется тем, что в процессе передачи мтДНК потомкам гетероплазмия обычно исчезает. В разных линиях потомков зафиксировались разные варианты мтДНК в позиции 16169: у правнучки сестры Николая II, Ксении, в этой позиции мтДНК присутствует только Т, а у Тихона Куликовского-Романова, сына другой сестры Николая II, Ольги, – осталась в этой позиции мтДНК только С.

Другая линия митохондриальной ДНК — императрицы Александры Федоровны – идет от ее бабушки королевы Великобритании Виктории. Было установлено, что такой же вариант мтДНК (совпадающий по SNP-маркерам), как у предполагаемых останков Александры Федоровны и ее дочерей, обнаружен у принца Филиппа, герцога Эдинбургского, внука сестры Александры Федоровны.



Митохондриальная ДНК императрицы Александры Федоровны и ее родственников. Из статьи Evgeny I. Rogaev et al, 2009 (PNAS), Григоренко и соав., 2009 (Acta Naturae).

Профессор Лев Животовский (заведующей лабораторией в том же Институте общей генетики РАН) и американский генетик Алек Найт исследовали предполагаемые мощи (фрагмент пальца) сестры царицы — великой княгини Елизаветы Федоровны, и нашли у нее иной вариант мтДНК. Подробнее об этом — ниже.

ДОПОЛНЕНИЕ ЧЛЕН-КОРР. РАН. Н.К. Янковского. Перед публикацией этого текста мы обратились к Н.К. Янковскому и он добавил важный комментарий: «»Первый этап» экспертизы был закончен после того как официально

правительственная Комиссия обратилась к Е.И. Рогаеву для проведения также мтДНК анализа (скелета 4) в России. Что и было сделано. Сразу после представления Рогаевым заключения в 1998 было проведено захоронение.» Таким образом, уже первая экспертиза была проведена как в лабораториях Великобритании и США, так и в России, и результаты не противоречили друг другу.

Вторая экспертиза

Вторым этапом генетической экспертизы, проведенном в 2007 году, руководил профессор Евгений Иванович Рогаев. В этом исследовании анализировались предполагаемые останки уже всех семи членов царской семьи – и из первого, и из второго захоронений. Ставилась задача не только проверить результаты первой экспертизы более современными методами, включив в исследование останки еще двух человек, — появился новый источник генетической информации. Профессору Е.И. Рогаеву теперь был доступен для идентификации прижизненный образец крови Николая II – кровь на его рубашке, которая хранилась в Эрмитаже. Она связана с покушением на него (в то время наследника российского престола), во время его визита в Японию в 1891 году.

Рубашка Николая II с пятнами крови, в которой он был во время нападения в Японии. Реликвия царской семьи, хранившаяся в Эрмитаже и обнаруженная следователем Владимиром Соловьевым при расследовании дела об обнаружении останков. Внизу справа – тампон с взятым мазком крови для дальнейшего генетического анализа.

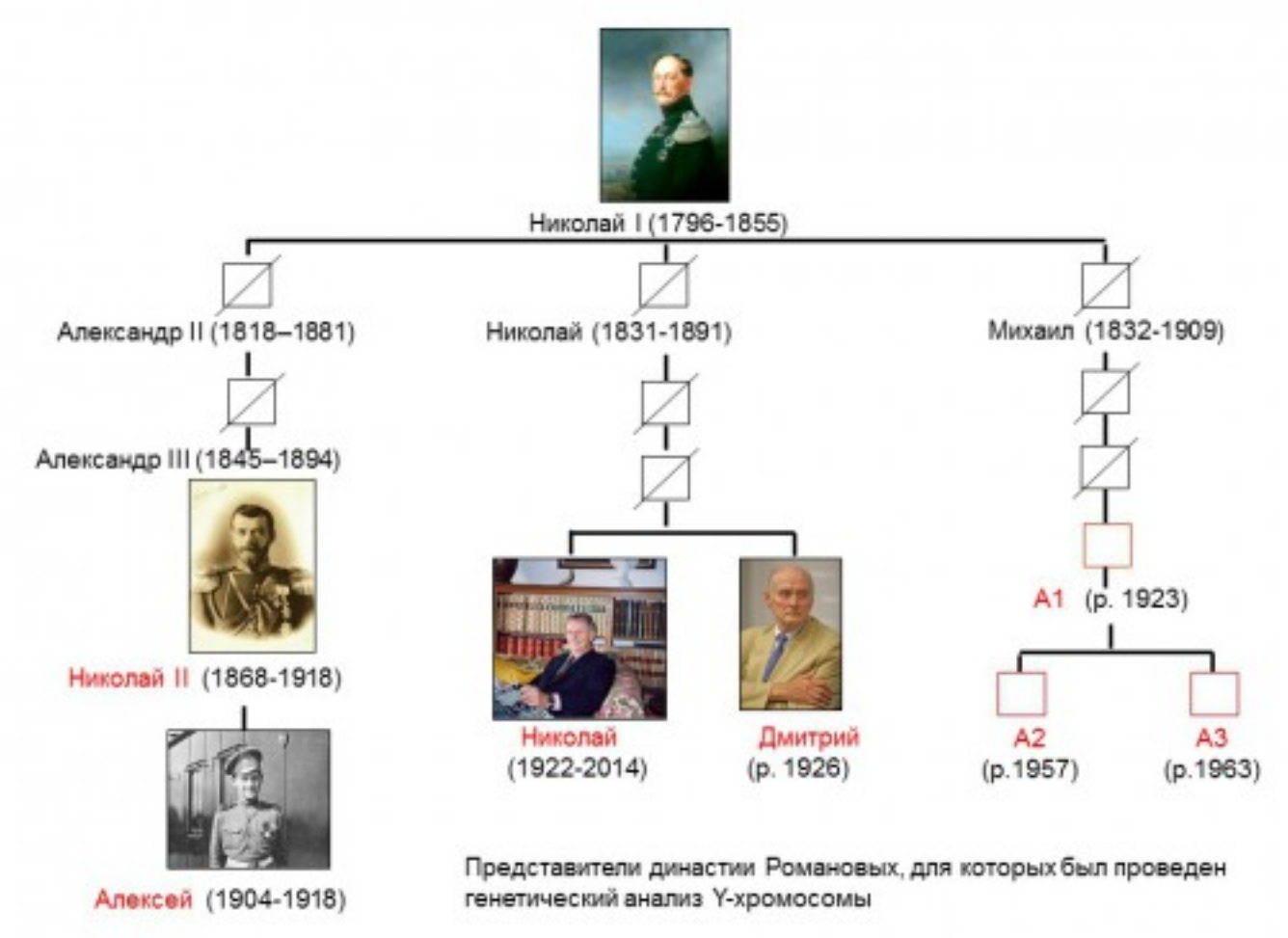
Рубашка Николая II с пятнами крови из коллекции Эрмитажа. Из статьи Evgeny I. Rogaev et al, 2009 (PNAS), Григоренко и соав., 2009 (Acta Naturae).

Для проведения экспертизы в Институте общей генетики было специально оборудовано помещение, пригодное для работы с древней ДНК, а часть работы была проведена параллельно в лаборатории Е.И. Рогаева в Медицинской школе Массачусетского университета в США. При изучении образца крови на «японской рубашке», генетики сначала убрали все верхние слои образца, которые могли содержать ДНК очень многих людей, трогавших эту рубашку. Количество материала, из которого удалось извлечь ДНК, в 10 раз меньше того, с которым обычно работают криминалисты. А при работе с костными останками из второго захоронения, которые были обработаны кислотой и сожжены, количество выделенной ДНК было крайне малым.

И все же даже на таком минимальном материале команде Е.И. Рогаева удалось получить убедительные для научного мира результаты. 1) Они полностью секвенировали мтДНК, а также генотипировали ее по SNP-маркерам. 2) Они проанализировали Y-хромосому по STR-маркерам. 3) Провели анализ и аутосомного генома (на неполовых хромосомах) по STR-маркерам.

Результаты, полученные командой Е.И. Рогаева, не противоречили ранее полученным выводам. В этом втором исследовании была расширена панель тестируемых ДНК маркеров; в экспертизу были включены уже всех семь предполагаемых членов царской семьи; провели сравнение не только с родственниками императорской семьи, но и прямое сравнение с прижизненным образцом крови Николая II. Результаты этой работы были опубликованы в 2009 году в журнале Proceedings of the National Academy of Sciences.

При полном секвенировании мтДНК (передающейся по материнской линии) подтверждена идентичность мтДНК из костных останков императора Николая II и из образца крови на его «японской рубашке». Причем в обоих образцах найдена гетероплазмия C/T в позиции 16169. Подтверждена идентичность мтДНК останков императрицы Александры Федоровны, и других четырех потомков королевы Виктории по женской линии.



Представители династии Романовых, для которых был проведен анализ Y-хромосомы. Из статьи Evgeny I. Rogaev et al, 2009 (PNAS), Григоренко и соав., 2009 (Acta Naturae).

По STR-маркерам профиль Y-хромосомы из костных останков N 4 совпал с ее профилем в ДНК из крови на «японской рубашке» Николая II и пяти ныне живущих родственников по мужской линии (Дмитрий, Николай и еще трое родственников, пожелавшие остаться анонимными).

При работе с останками из второго захоронения было установлено, что одни принадлежат мужчине, а другие — женщине (предположительно, это останки царевича Алексея и великой княжны Марии). По мтДНК эти останки соответствовали семейной группе из первого найденного захоронения: их мтДНК идентична как друг другу (как и должно быть у брата и сестры), так и мтДНК в останках N 7 (императрицы Александры Федеоровны). По STR-маркерам профиль Y-хромосомы из мужских останков (царевича Алексея) оказался идентичен профилю Y-хромосомы из останков N 4 (Николая II) и из образца

крови на его «японской рубашке».

Более того, проф. Е.И. Рогаеву удалось найти мутацию, из-за которой царевич Алексей страдал гемофилией. Эта мутация, состоящая в замене аденина на гуанин на границе интрона с экзоном 4 в гене фактора IX свертываемости крови (IVS3-3A>G), выявлена в Х-хромосоме останков царевича. Она же обнаружена в Х-хромосоме императрицы Александры Федоровны, получившей ее от матери, принцессы Алисы, а та – от королевы Виктории. Когда мутацию изучили, оказалось, что она не полностью блокировала функцию гена, благодаря чему царевич имел возможность жить. Ту же мутацию нашли и в останках одной из дочерей. Статья с результатами этого исследования опубликована в Science.

Потомки королевы Виктории, страдавшие гемофилией (мужчины) и носительницы мутации (женщины). Из статьи Evgeny I. Rogaev et al, 2009 (Science).

Что в итоге.

На настоящий момент полностью идентифицированы:

— Останки **императора Николая II** — совпадение по мтДНК и по Y-хромосоме при сравнении с братом великим князем Георгием и с ныне живущими родственниками, а главное – с его собственной кровью на «японской рубашке».

— Останки **императрицы Александры Федоровны** — совпадение по мтДНК с ныне живущими родственниками и с останками всех детей, мутация гемофилии, унаследованная сыном и дочерью.

— Останки **царевича Алексея** — совпадение по мтДНК с матерью и сестрами, совпадение по Y-хромосоме с останками Николая II и образцом его крови на «японской рубашки», обнаруженная мутация гемофилии, которой он страдал и идентичная мутация у матери и сестры.

Что касается дочерей царской семьи Романовых – четырех великих княжон Ольги, Татьяны, Марии и Анастасии, то их

персональная идентификация проводилась по антропологическим признакам. Криминалисты-антропологи определили по останкам возраст и реконструировали скульптурные портреты.

Из Заключения, направленного в Правительственную комиссию за подписью проф. Е.И. Рогаева:

«В целом, проведенный анализ представляет достаточные доказательства того, что костные останки семи человек, обнаруженные во время раскопок, проведенных 11 июля – 18 августа 1991 г. и 29 июля 2007 г. на участке Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, принадлежат последнему российскому императору Николаю II Романову (№4) и членам его семьи – супруге императрице Александре Федоровне (№7) и пяти детям: великим княжнам Ольге (№3), Татьяне (№5), Анастасии (вероятно, №6), Марии (вероятно, №147) и царевичу Алексею (вероятно №146). Соответствие номеров скелетных останков и имен предполагаемых детей проводится в соответствии с результатами антропологического заключения».

Ответы скептикам

Сомнения сопровождают эту историю с начала до конца. Рассмотрим все три ветви сомнений.

Гетероплазмия. Самым большим источником сомнений была обнаруженная П.Л. Ивановым гетероплазмия C/T в позиции 16169 в мтДНК предположительных останков Николая II. В 1998 году проф. Е.И. Рогаевым был заново изучен фрагмент костных останков Николая II , а также образец крови Тихона Куликовского-Романова, племянника царя. Новое исследование подтвердило факт гетероплазмии (оба варианта – и C, и T) в предполагаемых останках Николая II, но у его племянника в позиции 16169 обнаружился только один вариант — C. Появление гетероплазмии C/T в костных останках могло быть связано со спонтанной деаминацией и метилированием цитозина, в результате чего образуется тимин. Если бы это было так, то все представители данной семейной линии мтДНК должны были бы иметь в позиции 16169 мтДНК лишь исходный вариант C в позиции 16169. Но сам изученный фрагмент царской мтДНК представлял собой отнюдь не уникальный гаплотип — такой же встречается у нескольких миллионов европейцев. Лишь наличие гетероплазмии делает его практически неповторимым.

Сомнения были высказаны в 1997 году японским ученым Тацуо Нагаи. Он утверждал, что выделил ДНК из следов крови Николая II, оставшейся после покушения на платке, который хранился в музее в Японии. Он заявил, что полученный им профиль ДНК не совпадает с тем, что был найден для екатеринбургских останков. Однако эти результаты никогда не были опубликованы в научных журналах. Позже, в 1999 году, он сообщил, что провел анализ мтДНК из волос Великого князя Георгия, брата Николая II, и не обнаружил гетероплазмию в позиции 16169. Обстоятельства получения им волос великого князя Георгия довольно туманны: официально следственные органы никаких материалов японскому эксперту не передавали. Тем не менее, он опубликовал статью на японском языке, где описал результаты своего исследования. (Nagai T, Araki N, Yanagisawa Yuko, Popov VL: DNA identification of Georgij Romanov, a direct brother of the Russian Tsar Nicolas II: sequence of mitochondrial DNA. Igaku To Seibutsugaku1999, 139:247-25.) Результаты детального анализа ошибок Нагаи опубликованы Майклом Коблом, занимавшим пост руководителя Исследовательского отдела Лаборатории ДНК – идентификации Вооружённых сил США и проводившего независимый анализ ДНК из останков (Coble M.D. The Identification of the Romanovs: Can we (finally) put the controversies to rest? Investigative Genetics 2011, 2:20).

Очень показательно, что пресса упорно тиражировала заявление Нагаи об «отсутствии в изученном им образце гетероплазмии в позиции 16169″, но обошла вниманием куда более интересный факт. Приведенные в статье нуклеотидные замены не требуют знания японского, чтобы понять, что получено в результате. Опубликованная Нагаи последовательность фрагмента мтДНК относится к гаплогруппе C1a, варианту, распространенному на Дальнем Востоке, в Корее и Японии. Кроме того, в ней была найдена «гетероплазмия» по 7 другим позициям. Нагаи с соавторами не дали никакого объяснения такому огромному количеству «гетероплазмий» в волосах Георгия Романова. Наиболее вероятное объяснение – то, что проанализирована была смесь ДНК от нескольких человек.

Как бы то ни было, когда проф. Е.И. Рогаев обнаружил гетероплазмию и в прижизненном образце крови Николая II на его «японской» рубашке, и в костных останках Николая II, основания для этой ветви сомнений попросту исчезли.

То, что японский исследователь Т. Нагаи не обнаружил гетероплазмии в мтДНК великого князя Георгия — «это опубликованное доказательство методической слабости его работы, опираться на которую в научном отношении нельзя, даже если считать, что Т. Нагаи вообще имел в руках биологический образец от Г.А. Романова» — как сказано в официальной справке, подписанной Н.К. Янковским.

Сравнение с останками Елизаветы Федоровны. Другую ветвь сомнений вызывало несовпадение мтДНК Александры Федоровны с мтДНК ее сестры – мученицы Елизаветы Федоровны, извлеченной из ее останков (фрагмент пальца), который исследовали профессор Л.А. Животовский и американский генетик Алек Найт. Но они не смогли получить чистую ДНК, без примеси других индивидов. И, главное, полученные ими гаплотипы не совпадают с гаплотипами мтДНК ныне живущих

потомков королевы Виктории, хотя Елизавета Федоровна является ее внучкой. Так что гораздо логичнее сомневаться или в подлинности изученного образца Елизаветы Федоровны, или в результатах их анализа.

Из уже упомянутой справки: «Отсюда можно сделать один из двух выводов. Или авторы работы не смогли выявить этот генотип в костном образце пальца Елизаветы Федоровны (получив, как описывают сами авторы, смесь загрязненной ДНК), либо исследованный образец ДНК вообще не имеет отношения к кому-либо из потомков королевы Виктории». И далее: «данные, опубликованные в статье А. Найта, невозможно использовать для идентификации и, более того, они не имеют какого-либо отношения к объектам экспертизы – останкам в найденных захоронениях».

Другие сомнения. Есть еще одно направление исследования, о котором сказал Н.К. Янковский в своей лекции. Поскольку предполагается, что череп из останков Николая II был в какой-то момент унесен, а затем принесен обратно, возникла необходимость подтвердить идентичность черепа и остальных костей. Но это как раз вполне логичное требование, и оно будет выполнено.

Что же касается скептиков, которые сомневаются в достоверности генетического исследования ныне живущих родственников императорской семьи, Н.К.Янковский прокомментировал это так: «Я не могу построить модель, которая могла бы дать разумное объяснение словам сомневающихся. Как можно подменить свою ДНК? На что?» Он особенно подчеркнул, что за шесть лет с момента публикации результатов второй экспертизы в 2009 г. не появилось ни одной научной статьи, где бы высказывались сомнения в ее достоверности.

Все данные по экспертизе останков семьи Романовых были представлены на правительственной межведомственной комиссии, которая вынесла официальное заключение. На заседании этой комиссии присутствовали и представители Русской Православной Церкви.

Документы по истории идентификации царской семьи выложены на сайте Института общей генетики.

Литература:

1. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. // Nat Genet. 1994 Feb;6(2):130-5

2. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. // Nat Genet. 1996 Apr;12(4):417-420.

3. Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. Evgeny I. Rogaev, Anastasia P. Grigorenko, Yuri K. Moliaka, Gulnaz Faskhutdinova, Andrey Goltsov Arlene Lahti, Curtis Hildebrandt, Ellen L. W. Kittler and Irina Morozova http://www.pnas.org/content/early/2009/02/26/0811190106.abstract

4. Genotype Analysis Identifies the Cause of the «Royal Disease». Evgeny I. Rogaev, Anastasia P. Grigorenko, Gulnaz Faskhutdinova, Ellen L. W. Kittler, Yuri K. Moliaka. // Science 6 November 2009: Vol. 326 no. 5954 p. 817, DOI: 10.1126/science.1180660

5. Авдонин А.Н. Ганина яма. История поисков останков Царской семьи. Екатеринбург: Ре-ал-медиа, 2013. – 296с.

6. Григоренко А.П., Боринская С.А., Янковский Н.К., Рогаев Е.И. Достижения и особенности в работе с древней ДНК и с ДНК из сложных криминалистических образцов. // Acta Naturae 2009, № 3, 56-68.

7. Звягин В.Н., Алексеева Т.И., Зубов А.А, Лебединская Г.В, Рыкушина Г.В., Васильев С.В., Королев В.В, Березовский М.Е., Григорьева М.А., Нарина Н.В, Тишин В.С, Иванов Н.В. Медико-антропологическое исследование костных останков из Екатеринбургского некрополя // Покаяние. Материалы правительственной комиссии по изучению вопросов, связанных с исследованием и перезахоронением останков Российского Императора Николая II и членов его семьи. М.: Выбор, 1998, с. 95-164.

8. Звягин В.Н., Березовский М.Е., Королев В.В Исследование костных объектов, обнаруженных в районе Четырехбратского рудника. // Проблемы в экспертизе и медицине. – Ижевск: Экспертиза, 2001, с.38-39.

9. Звягин В.Н. Екатеринбургские находки 2007 года: итоги медико-криминалистического исследования. // «Мир измерений» (Ежемесячный метрологический научно-технический журнал), 2009, № 7(101), с. 50-59.

10. Покаяние. Материалы правительственной комиссии по изучению вопросов, связанных с исследованием и перезахоронением останков Российского Императора Николая II и членов его семьи. М.: Выбор, 1998. – 288 с.