

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**В Правительственную Комиссию
по вопросам, связанным с исследованием и перезахоронением находящихся в Государственном архиве Российской Федерации останков цесаревича Алексея Николаевича и
великой княжны Марии Николаевны Романовых**

Заключение по генетическому исследованию предполагаемых останков императора Николая II Романова и членов его семьи

По факту обнаружения останков неопознанных трупов в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга в 1991 г и 2007 г..

В исследовании были поставлены вопросы:

- 1) Выделить ДНК и определить полную последовательность митохондриального генома и аутосомные STR-профили из образцов костной ткани фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга.
- 2) Выделить ДНК и определить профиль однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNP) мтДНК и аутосомные STR-профили из образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20.
- 3) Определить половую принадлежность образцов костной ткани фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга и образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20.
- 4) При наличии образцов, на основе анализа ДНК отнесенных к мужским скелетам, определить в них STR-профили нерекомбинирующего региона Y-хромосомы для образцов костной ткани фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга и образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20.
- 5) Выделить ДНК и определить SNP-профили митохондриального генома из биологических образцов ныне живущих родственников по материнской линии семьи императора Николая II Романова.
- 6) Выделить ДНК и определить STR-профили нерекомбинирующего региона Y-хромосомы из биологических образцов ныне живущих родственников по отцовской линии императора Николая II Романова.
- 7) Провести сравнительное исследование определенных SNP-профилей мтДНК из образцов костной ткани и фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, и образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20, а также ныне живущих родственников по материнской линии императорской семьи Романовых.

8) Провести сравнительное исследование определенных STR-профилей Y-хромосомы из образцов костной ткани и фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, и образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20, а также ныне живущих родственников по мужской линии императора Николая II Романова.

9) Провести сравнительное исследование определенных аутосомных STR-профилей из образцов костной ткани и фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, и образцов костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20.

10) Выделить ДНК и определить SNP-профиль мтДНК, аутосомные и Y-хромосомные STR-профили из архивных пятен крови с рубашки Николая II, хранящейся в архивах Государственного музея Эрмитаж в Санкт-Петербурге.

11) Провести сравнительное исследование полученных SNP-профилей мтДНК, аутосомных и Y-хромосомных STR-профилей из архивных пятен крови с рубашки Николая II, хранящейся в архивах Государственного музея Эрмитаж в Санкт-Петербурге, и образца костной ткани скелета №4, обнаруженного во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20.

ИССЛЕДОВАНИЕ

Исследование в рамках данной генетической экспертизы проведено преимущественно на базе двух научных учреждений:

Института Общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук (ИОГен РАН), в г. Москва и Медицинской школы Массачусетского университета (UMASS) в г. Ворчестер, США.

Для экспертизы были предоставлены образцы костной ткани фрагментов костей, обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, предположительно принадлежащих двум детям императора Николая II Романова (образцы № 146 и № 147), и образцы костной ткани скелетированных останков пяти человек, обнаруженных во время раскопок, проведенных с 11 июля по 18 августа 1991 г. на участке Старой Коптяковской дороги неподалеку от Мостоотряда № 20, предположительно принадлежащих императору Николаю II, его жене императрице Александре Федоровне и трем дочерям (скелеты № 4, № 7, № 3, № 5, № 6).

Для сравнительного анализа были получены биологические образцы от ныне живущих родственников семьи императора Николая II Романова.

Для повышения разрешающей способности генетической экспертизы для анализа также была предоставлена рубашка Николая II предположительно с пятнами его крови, находящаяся в архиве Государственного музея Эрмитаж в Санкт-Петербурге.

Лаборатории для выделения и анализа ДНК

ДНК была выделена в двух независимых, изолированных, заново оборудованных лабораториях (в ИОГен РАН, Москва, Россия и в UMASS, Ворчестер, США), до этого не использовавшихся для работы с человеческой ДНК и специально предназначенных для работы с древней ДНК. Еще одна независимая экстракция ДНК для нескольких выбранных образцов была осуществлена в третьей ДНК-криминалистической лаборатории (Molecular World Inc., Канада). Все экспериментальные процедуры выполнялись в стерильных ПЦР-боксах согласно стандартам, принятым для работы древней ДНК, с выполнением всех мер предосторожности во избежание риска загрязнения молекулами современной ДНК. Перед началом исследования в каждом эксперименте все поверхности лаборатории и оборудование обрабатывались 0.2-0.6 %-м раствором гипохлорита натрия, деионизированной водой и облучались лампами ультрафиолетового света в течение ночи. Обработку и облучение повторяли ежедневно в конце рабочего дня. Перед входом в лабораторию надевали бахилы, защитный комбинезон, маску, защитный головной убор и медицинские перчатки.

Выделение ДНК

Выделение ДНК из костных образцов

Принципиальными этапами при экстракции ДНК в используемой нами методологии являются 1) деминерализация костных фрагментов в растворе ЭДТА высокой концентрации (0.5 М, pH 8.3); 2) связывание ДНК и очистка с помощью «силики» на фильтрах. Данный метод позволил в рамках проводимой экспертизы выделить ДНК высокой степени очистки в количестве, достаточном для анализа, из столь малого количества, как 200 мг костного вещества.

При выделении ДНК из костных образцов на первом этапе верхний слой костного материала удалялся, очистка и промывка проводилась по процедурам, описанным для выделения ДНК из древних палеонтологических и антропологических образцов, с рядом существенных модификаций. Параллельно с выделением ДНК из экспертных об-

разцов все процедуры экстракции повторялись в образцах с H₂O (негативный контроль). Подробный протокол доступен по требованию.

Для каждой системы генотипирования проводилось не менее 2-4 независимых экстракций ДНК для каждого костного образца. В каждом экстракте определялось количество ДНК. Отдельные экстракты использовались в дальнейшем для более детального анализа митохондриальной и ядерной ДНК.

Выделение ДНК из архивных пятен крови

Визуальная инспекция рубашки выявила несколько пятен с возможными следами крови, особенно обильными на манжете и воротнике. Биологический материал был получен из 4-х различных пятен крови. Материал собирался влажным тампоном с сухого кровавого пятна и смывался как минимум 3 раза. Первый смыв выбрасывался как потенциально содержащий загрязнения внешней ДНК. Для минимизации любых возможных проблем с загрязнением, ДНК выделялась только из вторых и третьих смывов каждого пятна с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Выделение проводилось в соответствии с протоколом DNA Purification from Dried Blood Spots, предоставленным производителем, с минимальными изменениями, описанными ниже. Смывы помещались в 2 мл пробирки, содержащие 360 мкл буфера ATL, и инкубировались при 85⁰С в течение 15 минут. Затем добавлялось 40 мкл протеиназы К, раствор перемешивался с помощью вортекса, и образцы инкубировались при 56⁰С в течение 20 минут. Затем добавлялось 400 мкл буфера AL, образцы инкубировались при 70⁰С в течение 15 минут, смешивались с 400 мкл этанола, супернатанты помещались в «силика»-колонок. После стандартных процедур промывки с буферами AW1 и AW2 ДНК элюировалась в 35 мкл буфера AE (1-я элюция) и 50 мкл воды (2-я элюция).

Выделение ДНК из современных образцов

Все процедуры анализа ДНК ныне живущих родственников Романовых проводились в других зданиях, физически удаленных от лабораторий древней ДНК. Сбор щечных соскобов проводился с использованием наборов Whatman's Sterile Omni Swabs (Whatman). Капли крови помещались на стерильную марлевую салфетку и затем высушивались в кабинете врача. ДНК экстрагировалась из каждого образца с использованием наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя для соскобов и высушенных пятен крови.

Молекулярный анализ митохондриальной ДНК

Для амплификации коротких перекрывающихся фрагментов мтДНК размером 164-383 п.н., покрывающих весь митохондриальный геном, было разработано 88 пар олигонуклеотидных ПЦР-праймеров. Амплификация проводилась с использованием нескольких подходов – стандартной ПЦР, а также мультиплексной ПЦР. Для мультиплексной амплификации праймеры объединялись в три набора по 25, 30 и 33 пары для трех мультиплексных ПЦР-реакций (Рис. 1, 3). Реакции проводились в объеме реакционной смеси 50 мкл при 37 циклах ПЦР. После мультиплексной амплификации 1 мкл очищенного продукта ПЦР использовался в качестве матрицы для второго раунда ПЦР с каждой из индивидуальных пар праймеров. Продукты ПЦР подвергались секвенированию. Все реакции ПЦР проводились в присутствии негативных контролей (экстракция в образцах с H₂O и H₂O).

Последовательности полного митохондриального генома для современных образцов были определены с использованием другого набора праймеров для более длинных ПЦР-продуктов (Rieder et al. 1998. Nucleic Acids Res. 26:967-973).

Для очистки в агарозном геле 30 мкл продуктов ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом

свете и одноразовым скальпелем вырезали узкие блоки агарозы со светящимися специфическими полосами. Блоки помещали в чистые пробирки объемом 1.5 мл и очищали ДНК от агарозы набором MinElute Gel Extraction Kit для очистки ПЦР продуктов фирмы Qiagen по протоколу производителя.

Очищенные фрагменты ПЦР после первичной ПЦР, а в некоторых случаях, после дополнительных раундов ПЦР использовали для определения нуклеотидных последовательностей набором BigDye 3.1 на капиллярных секвенаторах (например, 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)).

В качестве секвенирующего праймера добавляли один из олигонуклеотидов, использованных для ПЦР данного фрагмента. Чтобы определить последовательность с обеих комплиментарных цепей ДНК, один и тот же образец ПЦР секвенировали при помощи прямого и обратного ПЦР праймера в двух отдельных реакциях.

Качество хроматограмм оценивали в программе Chromas, Technelysium Pty Ltd, контиги из перекрывающихся последовательностей собирали в программе SeqMan, DNAStar.

Точность эксперимента достигалась множественными воспроизведениями. Прямое секвенирование ПЦР-продуктов мтДНК, полученных из разных экстрактов в разных лабораториях (ИОГен, Москва и UMASS MS, Ворчестер), позволило получить однозначно читаемые в большинстве случаев хроматограммы. Последовательности, полученные в повторяющихся экспериментах от одних и тех же образцов, были идентичны. Для реконструкции полных митохондриальных геномов были получены множественные перекрывающиеся ПЦР-продукты. Анализ перекрывающихся регионов из независимых ПЦР-продуктов во множественных воспроизведениях показал их полную идентичность.

Полные последовательности митохондриальных геномов исследованных образцов приведены в Приложении 3.

Анализ половой принадлежности

Половая принадлежность определялась с помощью двух независимых систем. Во-первых, использовались праймеры к гену амелогенина, входящие в состав коммерческих наборов для мультиплексных STR (AmpF ℓ STR $\circledR$ MiniFiler TM (Applied Biosystems) и PowerPlex S5 (Promega)). Анализ проводился согласно протоколам производителя. Во-вторых, нами была разработана пара праймеров, способных эффективно выявлять альтернативные геномные регионы на X- и Y-хромосомах. Лocus FEM4 локализуется на расстоянии ~8 Mb от гена AMELX на X-хромосоме и на расстоянии ~6 Mb от гена AMELY на Y-хромосоме. Праймеры, разработанные нами, были предназначены для амплификации коротких фрагментов ДНК на Y-хромосоме (117 п.н.) и на X-хромосоме (119 п.н.) для этого локуса. Все результаты определения пола на костных образцах были независимо подтверждены с использованием различных наборов и различных систем для определения пола.

Анализ полиморфизма STR-профилей Y-хромосомы

Y-STR профили были получены с использованием набора AmpF ℓ STR $\circledR$ Yfiler TM (Applied Biosystems) согласно протоколу производителя с минимальными модификациями для деградированной ДНК. Реакция ПЦР проводилась в общем объеме 12.5 или 25 мкл, при 33-37 циклах, с ~60-500 пкг матричной ДНК. Во всех STR-амплификациях применялся негативный контроль. При первичном исследовании ДНК экстракты, содержавшие смесь индивидуальных STR-профилей, были исключены из дальнейшего анализа. Электрофоретический анализ проводился с использованием капиллярных секвенаторов (в частности, 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)). Электрофоретические данные анализировались в пакете программ GeneMapper $\circledR$ ID software v3.2 (Applied Biosystems).

Условием анализа STR-профиля в каждом повторяющемся эксперименте являлось отсутствие амплификационного сигнала в отрицательном контроле (экстракция без ДНК). Потенциальной проблемой при анализе низкокопийной и деградированной ДНК являются выпадающие и «лишние» аллели. Поэтому для включения аллелей в профиль требовалось как минимум двукратное воспроизведение. В данном случае для каждого образца из различных экстрактов были выполнены серийные воспроизведения. По меньшей мере 3-4 независимых наблюдения после повторных ПЦР-амплификаций требовалось для каждого STR-аллеля для подтверждения его аутентичности. Генотипы для маркеров, обнаруженных во всех образцах, которые отвечали этим критериям, использовались для статистических расчетов.

Анализ полиморфизма аутосомных STR-профилей

Для получения профилей аутосомных STR использовались наборы AmpF ℓ STR $^{\circ}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), PowerPlex S5 System (Promega) разработанные для анализа деградированной ДНК. Для определения профилей аутосомных STR образца № 4 и образца архивных пятен крови дополнительно использовали набор AmpF ℓ STR $^{\circ}$ Identifiler $^{\circ}$ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Анализ проводился в соответствии с протоколами производителя с минимальными модификациями для деградированной ДНК. Реакция ПЦР для анализа аутосомных STR проводилась в общем объеме 12.5 или 25 мкл, при 33-37 циклах, с ~60-500 пкг матричной ДНК. Во всех STR-амплификациях применялся негативный контроль. При первичном исследовании ДНК образцы, содержащие смесь индивидуальных STR-профилей, были исключены из дальнейшего анализа.

Электрофоретический анализ проводился с использованием капиллярных секвенаторов (в частности, 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)). Электрофоретические данные анализировались в пакете программ GeneMapper $^{\circ}$ ID software v3.2 (Applied Biosystems).

Условием анализа STR-профиля в каждом эксперименте являлось отсутствие амплификационного сигнала в отрицательном контроле (экстракция без ДНК). Для каждого образца из различных экстрактов были выполнены серийные воспроизведения. Гомозиготные локусы считались аутентичными, если множественные воспроизведения аллеля для аутосомного STR-маркера наблюдались при независимых амплификациях. Генотипы для маркеров, обнаруженных во всех образцах, которые отвечали этим критериям, использовались для статистических расчетов.

Биоинформационный и статистический анализ

Были проанализированы популяционные базы данных последовательностей мтДНК, аутосомных и Y-хромосомных STR. Все базы данных включали популяции, относящиеся к данному случаю (русские, славянские, другие западно- и восточноевропейские). Статистический анализ основывался на стандартных математических расчетах отношений правдоподобия (LR), с учетом гаплоидной природы мтДНК и Y-хромосомы. Значения правдоподобия основывались на частотах гаплотипов, отношение правдоподобия рассчитывалось по формуле:

$$LR = \frac{P(E | H_1)}{P(E | H_0)}$$

где $P(E|H1) = 1$, $P(E|H0)$ – частота галотипа в популяции. Для коррекции на размер базы данных и частоту гаплотипа были также рассчитаны верхние пределы 95% доверительного интервала (ДИ) оценок частот.

Для определения средних популяционных частот аутосомных STR-аллелей были объединены неперекрывающиеся данные для европейских популяций из двух больших баз данных ALFRED (<http://alfred.med.yale.edu/alfred/>) и "The Distribution of the Human DNA-PCR Polymorphisms database" (<http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/database.html>) и недавно опубликованные данные по русским популяциям (Малярчук. 2007. Мол. Биол. 41:1-4). Все популяционные базы данных аутосомных STR включали популяции, относящиеся к данному случаю (русские, славянские, другие западно- и восточноевропейские). Частоты генотипов для аутосомных STR локусов рассчитывались с использованием формул Харди-Вайнберга.

Отношение правдоподобия наблюдаемого совпадения аутосомных STR-профилей образца из скелета № 4 из первого захоронения и ДНК, изолированной из пятен крови Николая II, было рассчитано с применением правила умножения вероятностей отношений правдоподобия для индивидуальных STR локусов, определенных как $1/f$, где f – частота генотипа. Конечная величина перемножалась с отношениями правдоподобия, полученными для мтДНК и Y-STR гаплотипов.

Для проверки гипотезы, что образцы № 146, № 147, образцы из скелетов № 3, № 5 и № 6 принадлежат детям индивидуумов, чьими останками являются скелеты № 4 и № 7, были рассчитаны отношения правдоподобия для аутосомных STR локусов с использованием формул для случая идентификации пропавших личностей, когда известны генотипы обоих родителей. Для каждого предполагаемого ребенка отношение правдоподобия для аутосомного STR профиля перемножалось с отношениями правдоподобия для мтДНК или мтДНК и Y-STR гаплотипов в случае образца № 146.

В рамках экспертизы было успешно проведено выделение пригодной для генетического анализа ДНК из костных образцов всех предоставленных на экспертизу останков (№ 146, № 147 (второе захоронение), скелеты № 3, № 4, № 5, № 6, № 7 (первое захоронение)).

Были определены SNP-профили мтДНК и проведен сравнительный анализ этих профилей в указанных костных образцах, а также в образцах ныне живущих родственников по материнской линии императорской семьи Романовых.

Было проведено определение половой принадлежности образцов костной ткани № 146, № 147, а также образцов из скелетов № 3, № 4, № 5, № 6, № 7.

Определены аутосомные STR-профили в костных образцах № 146, № 147 (второе захоронение), скелетах № 3, № 4, № 5, № 6, № 7 (первое захоронение) (6 STR маркеров для образца № 146 и 10 STR маркеров для остальных образцов). Для статистических расчетов использовали данные аутосомных профилей по 6-ти STR маркерам. Для образцов № 146 и № 4 (мужчины) были определены STR-профили нерекомбинирующего региона Y-хромосомы. Было проведено сравнительное исследование определенных Y-STR профилей указанных костных образцов, а также образцов ныне живущих родственников по мужской линии императора Николая II Романова.

Была успешно выделена ДНК и определен SNP-профиль мтДНК, аутосомные и Y-хромосомные STR-профили из архивных пятен крови с рубашки Николая II, хранящейся в архивах Государственного музея Эрмитаж в Санкт-Петербурге. Было проведено

сравнительное исследование полученных SNP-профилей мтДНК, аутосомных и Y-хромосомных STR-профилей из архивных пятен крови и образца костной ткани скелета №4 (предположительно Николай II).

В экспертной работе принимали участие сотрудники лаб. Рогаева Е.И. в Научном Центре Психического Здоровья РАМН, Институте Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН и Университета Медицинской Школы Массачусетса.

Заключение экспертизы

- 1) Выделена пригодная для генетического анализа ДНК в костных образцах № 146, № 147 (второе захоронение), скелетах № 3, № 4, № 5, № 6, № 7 (первое захоронение). Список образцов, использованных для проведения экспертизы приведен в Приложении 2.
- 2) Определены полные нуклеотидные последовательности мтДНК в образцах № 146, № 147, скелетах № 4 и № 7 (Рис. 1, Таблицы 1, 2; полные последовательности митохондриальных геномов приведены в Приложении 3). Показано, что полные последовательности мтДНК в образцах № 146 и № 147 (второе захоронение) полностью идентичны друг другу и мтДНК из скелета № 7 (16571 п.н.) из первого захоронения и не совпадают с полной мтДНК скелета № 4 (16569 п.н.) (Таблицы 1, 2). Определены нуклеотидные последовательности ГВР мтДНК в образцах из скелетов № 3, № 5, № 6. Показано, что последовательности ГВР мтДНК в образцах из скелетов № 3, № 5, № 6 полностью идентичны друг другу и мтДНК в образце из скелета № 7.
- 3) Полные последовательности мтДНК костных образцов № 146, № 147 и в образце из скелета № 7 полностью идентичны полному мтДНК ныне живущих потомков двух ветвей женской линии королевы Виктории, бабушки императрицы Александры Федоровны Романовой (Рис.2, Табл. 1).
- 4) Полная последовательность мтДНК костного образца из скелета № 4 соответствует последовательности мтДНК референтных образцов, полученных от потомка по материнской линии императрицы Марии Федоровны (принцессы Дагмар), матери Николая II. Было обнаружено единственное исключение – гетероплазмия в позиции 16169 С/Т у индивида № 4 (Рис.2, Табл. 2).
- 5) Биоинформационный анализ показал уникальность полной последовательности мтДНК, выделенной из образцов №146, № 147 и из скелета № 7, в доступных популяционных базах данных. Для полной последовательности мтДНК из костного образца № 4 (с вариантом 16169Т или 16169С) соответствия в доступных популяционных базах данных полных последовательностей мтДНК также не были найдены (Табл.3).
- 6) Определена половая принадлежность костных образцов № 146, № 147, образцов из скелетов № 3, № 4, № 5, № 6, № 7. Показано, что образец № 147 и скелеты № 7, № 3, № 5, № 6 принадлежат женщинам, а образец № 146 и скелет № 4 принадлежат мужчинам (Рис.6, 10).
- 7) Определены STR-профили Y-хромосомы (16 маркеров) в костных образцах № 146 и № 4-46. Показано полное совпадение определенных STR-профилей Y-хромосомы из указанных костных образцов, а также из образцов, полученных от прямых родственников по отцовской линии Николая II Романова (потомков императора Николая I) (Рис.5, 7, Табл. 4).

- 8) Биоинформационный анализ показал, что полученный для образца № 146 и образца из скелета № 4-46 STR-профиль Y-хромосомы не встречается в доступных популяционных базах данных для мультилокусных Y-STR. (Табл. 5)
- 9) Определены аутосомные STR-профили в костных образцах № 146, № 147 (второе захоронение), скелетах № 3, № 4, № 5, № 6, № 7 (первое захоронение) (Рис. 10, Табл. 6). Показано, что все указанные индивиды различаются по профилям аутосомных STR. При этом проанализированные STR-профили соответствуют параметрам биологического родства между указанными индивидами. Индивиды № 4 и № 7 не являются родственниками (родитель-ребенок). STR-профили индивидов № 4 (мужчина) и № 7 (женщина) соответствуют родительским для каждого из индивидов №146, №147 и № 3, № 5 и № 6 (Рис. 10, Табл. 6).

Примечание. В ходе экспертизы выяснилось, что образец № 7-49 первоначально, на основе антропологических исследований, был ошибочно отнесен к скелету № 7. Сравнение по 10 аутосомным STR маркерам (генотипы по всем 10 маркерам были получены для останков всех пяти предполагаемых Романовых из первого захоронения): TH01, CSF1PO, D2S1338, D13S317, D18S51, FGA, D7S820, D21S11, D16S539, D8S1179 показало идентичность аутосомного STR профиля образца № 7-49 образцу № 3-46 из скелета № 3 и отличие по 7 из 10 аутосомных STR маркеров от образцов № 7-32 и 7-40 скелета № 7. Анализ ещё одного экстракта образца № 7-49 подтвердил сделанный вывод. Таким образом, образец № 7-49 в действительности относится к скелету № 3.

- 10) Отношения правдоподобия для идентификации детей, основанные на тестах для пропавших личностей, при условии, что оба родителя известны, при объединении результатов по всем двум или трем изученным генетическим системам составили для № 146: 1.39×10^9 ($6,97 \times 10^8$ с учетом верхнего предела 95% ДИ) для комбинации аутосомных STR и маркеров мтДНК, 1.62×10^8 ($4,00 \times 10^7$ с учетом верхнего предела 95% ДИ) для комбинации аутосомных и Y-STR маркеров и 5.81×10^{12} ($9,69 \times 10^{11}$ с учетом верхнего предела 95% ДИ) для комбинации маркеров мтДНК, аутосомных и Y-STR. Значения правдоподобия для комбинации аутосомных STR и маркеров мтДНК для образцов № 147, № 3, № 5 и № 6 составили: для № 147: 1.55×10^9 ($7,91 \times 10^8$ с учетом верхнего предела 95% ДИ); №3: 1.36×10^9 ($7,02 \times 10^8$ с учетом верхнего предела 95% ДИ); №5: 1.28×10^{10} ($6,13 \times 10^9$ с учетом верхнего предела 95% ДИ); №6: 8.61×10^8 ($4,42 \times 10^8$ с учетом верхнего предела 95% ДИ).
- 11) Успешно выделена пригодная для генетического анализа ДНК из архивных пятен крови с рубашки Николая II (возраст ~ 117 лет). Для указанных образцов из пятен крови определен SNP-профиль мтДНК, профили для 17 Y-хромосомных и 15 аутосомных STR-маркеров (Рис. 8, 9; Табл. 2, 7, 8). Проведено сравнение трех генетических систем (мтДНК, аутосомных и Y-хромосомных STR) в образцах из архивных пятен крови и костном образце № 4-46. Показана полная идентичность всех трех генетических систем между указанными образцами (Рис. 8, 9; Табл. 2, 7, 8). В том числе показана идентичность гетероплазмичного варианта 16169C/T мтДНК, с преобладающей фракцией 16169C (Рис.8 В). Полученная вероятность того, что скелет № 4 принадлежит императору Николаю II Романову, не менее чем в 2.03×10^{22} раз выше вероятности, что изученные останки принадлежат случайному неродственному индивиду (Табл. 9).

Совокупность данных генетического анализа аутосомных и Y-хромосомных STR профилей и профилей мтДНК подтверждает гипотезу о том, что останки двух человек (№146 и 147), обнаруженных 29 июля 2007 г. в захоронении в районе Старой Коптяковской дороги близ Екатеринбурга, принадлежат брату и сестре. Генотипы индивидов в двух захоронениях, обнаруженных в районе Старой Коптяковской дороги (№ 3, № 4, № 5, № 6, № 7, первое захоронение и № 146, № 147, второе захоронение) соответствуют семейной группе: мать № 7, отец № 4, четыре дочери № 3, № 5, № 6 и № 147 и сын № 146. Результаты сопоставления генетических профилей указанных костных останков и образцов, полученных от ныне живущих родственников семьи Романовых, как по отцовской, так и по материнской линии, подтверждают, что указанные останки принадлежат Николаю II Романову и членам его семьи.

В целом, проведенный анализ предоставляет 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 (№ 146).

Соответствие номеров скелетных останков и имен предполагаемых детей приводится в соответствии с результатами антропологического заключения (вне рассмотрения данного экспертного заключения).

Рогов Е.И.

8 Сентября 2015 г