

И. А. ЕФРЕМОВ, В. В. НОСИКОВ, Е. Ю. СКОБЛИЛОВ, А. Ф. ЗАКОНОВА, П. Л. ИВАНОВ

О ВОЗМОЖНЫХ ЗАТРУДНЕНИЯХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ПРИ НЕДОСТАТОЧНО ВЫСОКОЙ ИНДИВИДУАЛИЗИРУЮЩЕЙ ЗНАЧИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ (НА ПРИМЕРЕ СЛОЖНОГО СЛУЧАЯ ОСПАРИВАЕМОГО МАТЕРИНСТВА)

Государственный научный центр РФ "ГосНИИгенетика" (дир. — член-корр. РАН В. Г. Дебабов), В/ч 34435 (дир. — доктор техн. наук А. В. Фесенко), Российский центр судебно-медицинской экспертизы (дир. — проф. В. В. Томилин) Минздрава РФ, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (дир. — акад. А. Д. Мирзабеков) РАН, Москва

Молекулярно-генетические технологии, используемые при судебно-медицинских экспертных исследованиях, позволяют проводить количественную оценку доказательственного значения совпадения или несовпадения признаков при идентификации личности и в экспертизе установления родства (оспариваемого отцовства или материнства). Принципиальным вопросом здесь является уровень доказательности, который можно считать необходимым и достаточным.

В настоящей работе на примере одного из сложных случаев оспариваемого материнства обсуждаются вопросы, которые иллюстрируют необходимость достижения определенно высокого уровня значимости результатов для формулирования обоснованного экспертного вывода. Показано,

что только высокий стандарт доказательности позволяет избежать осложнений при интерпретации результатов. В противном случае значимость установленного комплекса признаков может оказаться недостаточной, чтобы обеспечить однозначное решение экспертной задачи.

Ключевые слова: спорное происхождение детей, молекулярно-генетическая индивидуализация человека, вероятностный анализ, полимеразная цепная реакция

POSSIBLE DIFFICULTIES IN MOLECULAR GENETIC EXPERT EVALUATION IN CASES WITH INSUFFICIENTLY HIGH INDIVIDUAL SIGNIFICANCE OF THE RESULTS, AS EXEMPLIFIED BY A COMPLEX CASE WITH DISPUTABLE MATERNITY

I. A. Yefremov, V. V. Nosikov, Ye. Yu. Skobilov, A. F. Zakonova, P. L. Ivanov

Molecular genetic technologies used in forensic medical expert evaluations help quantitatively evaluate the significance of coincidence or non-coincidence of signs in personality identification and in expert evaluation of kinship identification (disputable paternity or maternity). The level of validity of evidences, which can be considered necessary and sufficient, is the principal problem in such cases. Analyzing a complex case with disputable maternity, the authors discuss problems illustrating the necessity of attaining a high level of validity of the results for drawing a justified expert conclusion. Only high validity standard can rule out errors in interpretation of the results, otherwise the significance of the detected complex of signs can be insufficient for an unambiguous solution of an expert task.

Key words: disputable origin of children, molecular genetic individual characteristics of man, probability analysis, polymerase chain reaction

Уровень доказательности экспертного вывода представляется ключевым моментом, от которого зависит практическая значимость выполненной экспертизы. В арсенале методов современных судебно-биологических исследований молекулярно-генетический анализ является практически единственным методическим подходом, который позволяет проводить количественную оценку доказательственного значения совпадения или несовпадения признаков при идентификационных исследованиях, а также в экспертизе установления родства, оспариваемого отцовства или материнства.

Принципиальным вопросом являются количество анализируемых генетических локусов и уровень доказательности, который можно считать необходимым и достаточным.

Во многих странах существуют официальные стандарты доказательности для молекулярно-генетических экспертных исследований. Так, например в США при исследовании случаев спорного отцовства требуется минимальное значение избирательности для панели полиморфных локусов (дискриминирующая способность) составляет 95% [3], для некоторых штатов — 99% или более. В Российской Федерации, согласно проекту новых "Правил производства экспертизы в лабораториях судебно-медицинских молекулярно-генетических исследований бюро судебно-медицинской экспертизы" при экспертизе спорного происхождения детей, в случае неисключения родительства вероятность отцовства/материнства, рассчитанная как байесова постериорная вероятность, должна составлять не менее 99,75% [1]. Это значение вероятности по известной классификации К. Hummel соответствует словесной формулировке: "практически доказано" (цит. по [2]).

Предполагается, что такой стандарт доказательности позволяет избежать осложнений, которые могут возникать в тех случаях, когда доказательственное значение результатов экспертизы оказывается недостаточным, чтобы обеспечить однозначное решение экспертной задачи. В настоящей работе на примере одного из сложных случаев оспариваемого материнства обсуждены вопросы, которые иллюстрируют необходимость достижения именно таких высокодоказательных результатов для формулирования обоснованного экспертного вывода.

Материалы и методы исследования

В судебно-медицинской практике достаточно актуальна экспертная задача, связанная с подменой новорожденных детей в родильных домах. Одна из таких экспертиз, выполненная в рамках соответствующего уголовного дела, и послужила экспериментальной основой настоящей работы.

Объектами экспертизы явились фрагменты костей, изъятые от эксгумированного трупa ребенка, а также образцы крови, полученные от двух неродственных женщин, каждая из которых, по версии следствия, могла оказаться матерью погибшего ребенка. Осложняющим моментом для экспертизы, помимо исследования костного материала, явилось то, что образцы крови

мужчин, которые могли бы рассматриваться в качестве бесспорных отцов для рожденного каждой из женщин ребенка, по разным причинам оказались недоступны для анализа.

Экспертиза призвана была решить вопрос спорного происхождения этого ребенка. Иными словами, на разрешение экспертизы был поставлен вопрос: кто из двух женщин может являться истинной биологической матерью ребенка? Мы обозначили этих женщин инициалами: предполагаемая мать Н. и предполагаемая мать Л. и в дальнейшем изложении используем именно эти обозначения.

ДНК из образцов жидкой крови выделяли по стандартной методике фенол-хлороформным методом [7]. ДНК из костной ткани (большая берцовая кость, навеска материала 1 г) также выделяли фенол-хлороформным методом с последующей очисткой на микроколонке Centricon-30 ("Amicon", США) [5]. Параллельно при выделении ДНК подготавливали образцы "отрицательного контроля экстракции" для отслеживания и предотвращения возможных загрязнений исследуемого образца чужеродной ДНК.

В реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР) объемом 25—50 мкл вносили 20—200 нг геномной ДНК или 3—5 мкл очищенного экстракта-фильтрата в случае образца, выделенного из костной ткани. Во всех случаях параллельно осуществляли постановку образцов "отрицательных контролей амплификации". Полимеразную реакцию проводили на термоблокерах "Циклотемп-2" (СТМ, Россия), РНС-2 ("Techne", Великобритания), "GeneAmp PCR System 9600" ("Perkin-Elmer Corporation", США) с использованием наборов реагентов для амплификации ДНК, разработанных ГНЦ РФ "ГосНИИгенетика" (Тапотили) и "Perkin-Elmer Corporation", США (AmpliType® PM + DQAI PCR Amplification and Typing Kit и AmpFISTR™ Profiler PCR Amplification Kit) согласно протоколам разработчиков.

Полиморфные по длине амплифицируемые фрагменты ДНК (индивидуализирующие системы ПДАФ-типа) анализировали электрофоретически в денатурирующих полиакриламидных гелях. После завершения электрофореза результаты документировали путем окрашивания гелей серебром [4] с последующим высушиванием на бумажной подложке и компьютерным сканированием фореграммы.

При использовании набора AmpliType® PM + DQAI (полиморфные по последовательности амплифицируемые фрагменты ДНК, индивидуализирующая система ППАФ-типа) анализ продуктов ПЦР проводили согласно протоколу разработчика.

При использовании наборов AmpFISTR™ Profiler PCR Amplification Kit, включающих в себя флюоресцентно меченные праймеры, анализ продуктов ПЦР проводили с использованием автоматизированной установки ABI Prism™ 377 DNA Sequencer, пакетов компьютерных программ GeneScan® и Genotyper® ("Perkin-Elmer Corporation", США) согласно протоколам разработчика.

Индекс материнства (Maternity Index, MI) и вероятность истинного материнства (Probability of Maternity, PM) рассчитывали на основе байесовых алгоритмов, рекомендованных Минздравом РФ [1]. При рассмотрении альтернативных гипотез F_1 (предполагаемая мать не является истинной матерью) и F (предполагаемая мать является истинной матерью) а priori (до получения результатов ДНК-анализа) отношение вероятностей $P(F)/P(F_1)$ во всех случаях принимали равным 1.

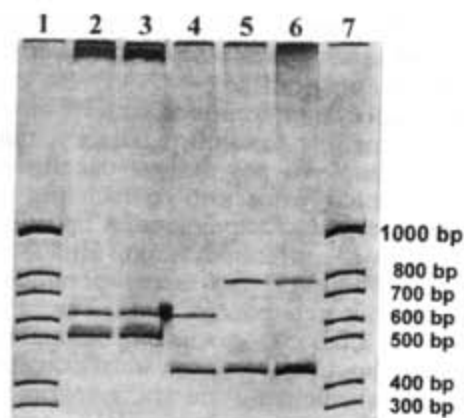


Рис. 1. Электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации локуса IgH-5' VNTR на матрице ДНК, выделенной из костных останков ребенка (дорожка 2 и 3 — повтор) и предполагаемой матери Л. (дорожка 4) и ДНК двух женщин: предполагаемой матери Н. (дорожки 5 и 6 — повтор). Дорожки 1 и 7 — стандарты молекулярных масс (фрагменты ДНК pUC19/MspI). 8% нативный полиакриламидный гель, окрашивание серебром.

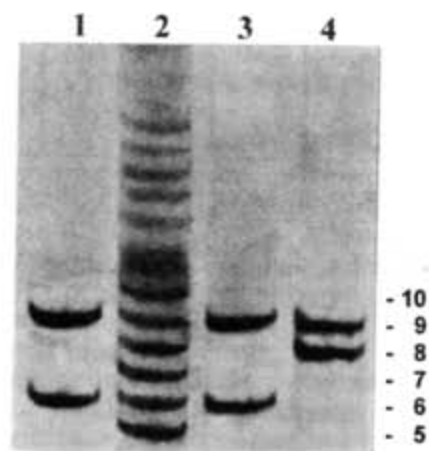


Рис. 2. Фракционирование в 8% полиакриламидном геле продуктов амплификации локуса HUMTH01 в препаратах ДНК из костных останков ребенка и двух женщин: 1 — эксгумированные костные останки ребенка; 3 — предполагаемая мать Н.; 4 — предполагаемая мать Л. Дорожка 2 — контрольный набор аллельных фрагментов локуса HUMTH01.

Обсуждение результатов исследования

На рис. 1—4 в качестве иллюстраций выборочно приведены результаты исследования в образцах ДНК разных типов молекулярно-генетических маркеров. Результаты генотипирования суммированы поэтапно в табл. 2 и 3 (пояснения в тексте). Всего в ходе экспертного исследования в геномах проходящих по делу лиц были протипированы аллельные состояния 21 аутосомного локуса, а также специфические для пола гетероморфы локуса амелогенина, картирующиеся на X- и Y-хромосоме.

Основные генетические параметры исследованных локусов приведены в табл. 1.

На 1-м этапе исследования анализировали панель из 8 несцепленных аутосомных локусов (табл. 2) и локус гена амелогенина, локализован-

ный на X- и Y-хромосоме. Суммарная дискриминирующая способность (discrimination index, или power of discrimination, $PD = 1 - PrM$) [8] для такой панели полиморфных локусов превышает 99,999%.

Как видно из табл. 2, проведенные на этом этапе тесты выявили совпадение 1 или 2 аллелей для каждого из 8 аутосомных локусов в геномах ребенка и женщины — предполагаемой матери Н. Такое совпадение признаков не исключает того, что указанная женщина может являться истинной матерью ребенка. Примечательно однако то, что и у другой женщины (предполагаемой матери Л.), как минимум 1 аллель в каждом из исследованных 8 локусов обнаруживает совпадение с аллелями ребенка. Иными словами, и для этой женщины нельзя исключить возможность материнства в отношении того же ребенка.

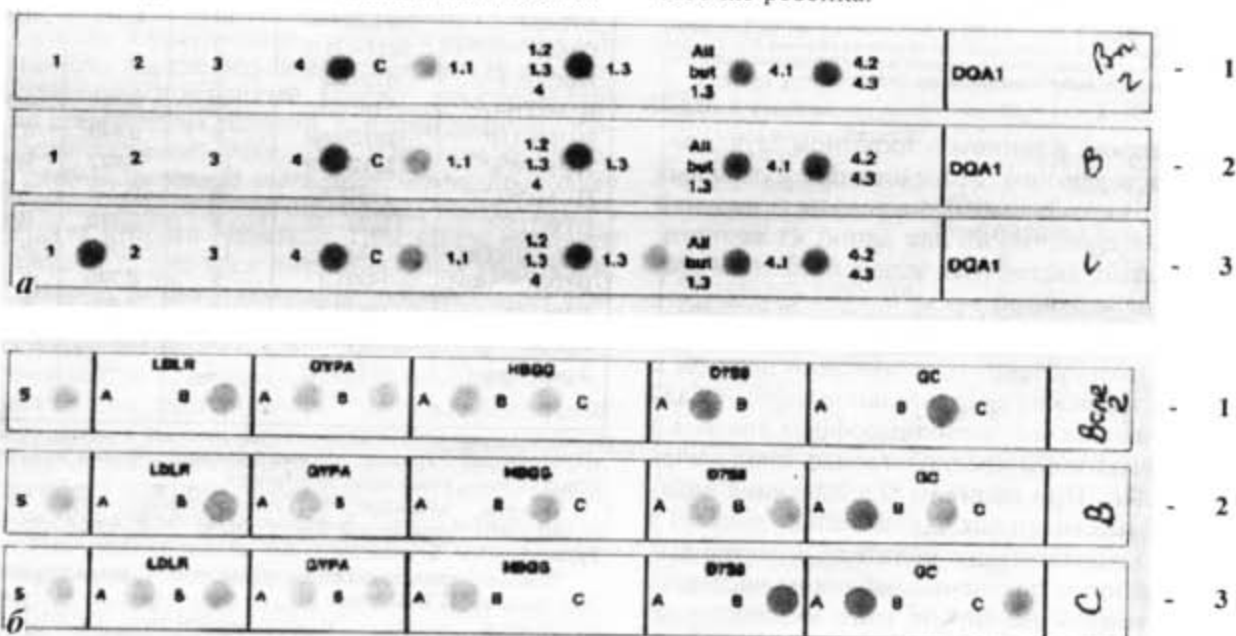
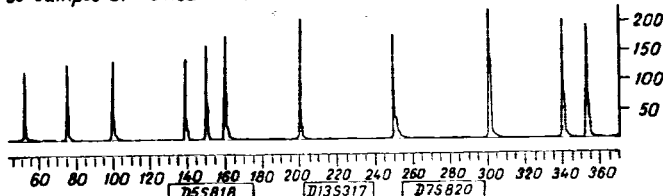
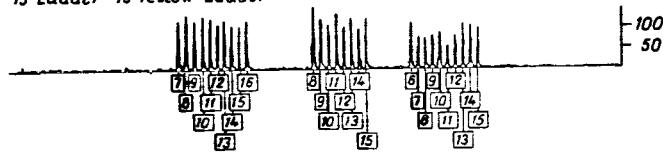


Рис. 3. Дот-гибридизационные профили аллельных вариантов локуса HLA DQA1 (a) и локусов системы Polymarker (b) в препаратах ДНК из костных останков ребенка (1) и двух женщин: предполагаемой матери Н. (2) и предполагаемой матери Л. (3).

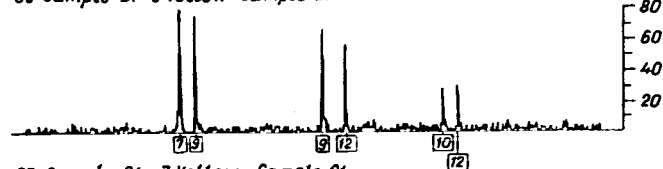
05-Sample B1 5 Red Size standard



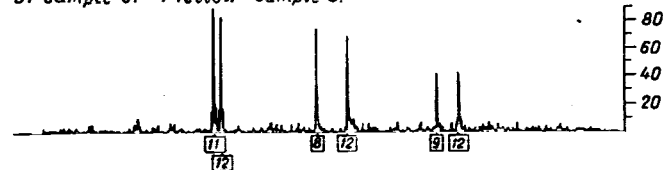
13-Ladder 13 Yellow Ladder



05-Sample B1 5 yellow Sample B1



07-Sample C1 7 Yellow Sample C1



09-Sample D1 9 Yellow Sample D1

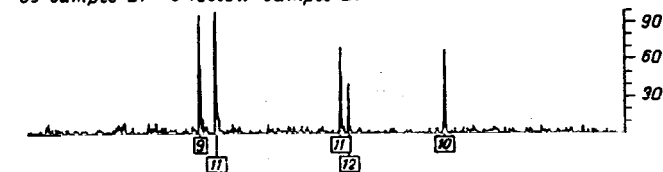


Рис. 4. Вариант компьютерной обработки результата фрагментного анализа амплифицированной ДНК, выполненного на автоматизированной системе ABI 377 Prism. Программное обеспечение: Genotyper[®] 2.0 (Perkin Elmer, США).

Показан элемент анализа 9-локусной мультиплексной системы AmpFISTR[™] Profiler PCR Amplification Kit (Perkin Elmer, США) для 3 локусов: D5S818, D13S317 и D7S820. Приведена графическая интерпретация картины флуоресцентных сигналов на сравниваемых дорожках геля. Диаграммы (сверху вниз): опорная шкала стандарта молекулярных масс; контрольные наборы аллельных фрагментов 3 анализируемых локусов; продукты амплификации 3 анализируемых локусов на матрице ДНК двух женщин: предполагаемой матери Н. (дорожка В1) и предполагаемой матери Л. (дорожка С1), а также ДНК, выделенной из костных останков ребенка (дорожка D1). Следует обратить внимание на отсутствие у ложноуказанной матери Л. варианта гомозиготного аллельного маркера ребенка D7S820-10/10.

Таким образом, в данном конкретном случае результаты проведенного исследования аллельных состояний 8 (!) хромосомных локусов не позволили исключить материнство ни для одной из женщин, и, следовательно, экспертная задача на данном этапе осталась нерешенной.

Поясним смысл происшедшего.

В основе молекулярно-генетического подхода к анализу родства лежит сравнительное изучение аллельных вариантов высокополиморфных локусов в геномах ребенка и его предполагаемых биологических родителей. При наличии совпадающих аллелей во всех исследованных одноименных локусах у ребенка и предполагаемого родителя делается вывод о возможности получения ребенком наследственного материала именно от этого индивидуума. Это означает, что родительство не исключается. Наоборот, вывод о возможном исключении родительства делается, если в исследованных генотипах

ребенка и предполагаемого родителя отсутствуют совпадающие аллели одноименных локусов.

Это качественный вывод. Между тем, если необходима дальнейшая конкретизация формулировок, то это потребует дополнительных усилий. Это объясняется тем, что результаты сравнительного анализа генотипов, а именно совпадения или несовпадения аллельных вариантов, в принципе допускают двоякую интерпретацию. Иначе говоря, ни одна из альтернативных интерпретаций не является логически неопровержимой. Так, в случаях несовпадения аллелей можно предполагать, что оно обусловлено либо разными источниками ДНК (истинная мать ребенка — не эта, а другая женщина), либо, наоборот, источник ДНК один (мать "настоящая"), но произошло мутационное изменение генетического материала в одном из объектов. В случае же совпадения аллелей, поскольку профиль генотипов по исследованным локусам в общем случае не является уникальным, позитивная идентификация независимо от количества исследованных локусов в принципе может быть опровергнута возможностью случайного совпадения аллелей в сравниваемых образцах ДНК. Поэтому в каждом конкретном случае необходимо специальное дополнительное рассмотрение, в котором до-

Таблица 1

Основные генетические параметры исследованных локусов хромосомной ДНК

Индивидуализирующая система	Хромосомная локализация	Число аллелей ¹	Гетерозиготность ¹	pM ^{1,5}
TROX ⁴	2p23-pter	8	0,647	0,211
D3S1358 ^{3,4}	3p	8	0,780	0,078
GC ²	4q11—13	3		
FGA ⁴	4q28	14	0,860	0,036
GYP A ²	4q28—31	2		
D5S818 ⁴	5q21—31	10	0,741	0,140
HLA DQA1 ²	6p21,3	7	0,730	0,098
D6S2414 ³	6p21,31	5	0,810	0,081
HUMF13A01 ³	6p24—p25	9	0,760	0,089
D7S820 ⁴	7q11,21—22	10	0,795	0,061
D7S8 ²	7q22—31,1	2		
HBGG ²	11p15,5	3		
HUMTH01 ^{3,4}	11p15,5	7	0,765	0,094
HUMCD4 ³	12p12-pter	8	0,640	0,165
HUMvWA ⁴	12p12-pter	11	0,822	0,065
HUMvWEI1 ³	12p13,2	8	0,720	0,103
D13S317 ^{3,4}	13q22—31	8	0,710	0,074
IgH-5'VNTR ³	14q32	11	0,700	0,085
HUMCYAR04 ³	15q21,1	8	0,740	0,090
D19S253 ³	19p13,1	9	0,800	0,070
LDLR ²	19p13,1—13,3	2		
Амелогенин ^{3,4}	X: p22,1—22,3 Y: p11,2	2	—	—

¹Приведены средние данные для европеоидных популяций; использованы различные источники.

²Локусы, входящие в индивидуализирующую систему ППАФ-типа AmpliType[®] PM + DQA1 PCR Amplification and Typing Kit.

³Локусы, представляющие различные индивидуализирующие системы ППАФ-типа.

⁴Локусы, входящие в флуоресцентную ППАФ-систему AmpFISTR[™] Profiler PCR Amplification Kit.

⁵pM — вероятность совпадения генотипов двух случайно выбранных неродственных человек (probability of random match) [8].

Таблица 2

Панель из 8 несцепленных полиморфных локусов, типирование которых выполнено на 1-м этапе исследования

Индивидуализирующая система	Ребенок	Предполагаемая мать Н.	Предполагаемая мать Л.
Амелогенин, половая принадлежность	Жен.	Жен.	Жен.
D3S1358-генотип	14—15	15—15	15—18
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,113; 0,283	0,283; 0,283	0,283; 0,145
HUMF13A01-генотип	5—7	5—7	5—8
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,208; 0,329	0,208; 0,329	0,208; 0,017
HUMTH01-генотип	6—9	6—9	8—9
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,237; 0,155	0,237; 0,155	0,117; 0,155
HUMvWFII-генотип	12—15	11—12	11—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,296; 0,015	0,392; 0,296	0,392; 0,296
D13S317-генотип	11—12	9—12	8—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,313; 0,283	0,078; 0,283	0,115; 0,283
IgH-5' VNTR-генотип	8—12	8—15	10—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,170; 0,300	0,170; 0,010	0,380; 0,300
HUMCYAR04-генотип	5—7	5—7	5—9
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,386; 0,074	0,386; 0,074	0,386; 0,035
D19S253-генотип	7—17	7—7	17—17
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,228; 0,250	0,228; 0,228	0,250; 0,250

*Здесь и в табл. 3 приведены средние данные для европеоидных популяций, использованы различные источники.

казательственное значение совпадений или несовпадений признаков оценивают средствами теории вероятностей и математической статистики. Затем полученные оценки соотносят с требуемыми стандартами доказательности.

На этой стадии при анализе однотипных ситуаций (например, как в описанном случае, — неисключения родительства для двух человек в отношении одного и того же ребенка) между этими ситуациями иногда может быть обнаружена существенная разница в значимости, которая в принципе может помочь определиться в выборе между взаимоисключающими версиями. Однако это справедливо для стандартных условий, т. е. при наличии обоих предполагаемых родителей. В данном же случае этот подход не может быть реализован, поскольку для экспертизы недоступен образец генетического материала второго родителя. При таком стечении обстоятельств для всех потенциальных родителей, для которых не были получены исключающие данные, родительство оказывается равновероятным (поскольку эта вероятность определяется частотой встречаемости всех возможных генотипов, содержащих аллели, присущие генотипу ребенка). Иными словами, в нашем случае значения вероятности родительства относительно одного и того же ребенка для обеих женщин будут совпадать между собой, поэтому сделать обоснованный выбор между двумя версиями родительства на основании математического расчета невозможно.

Тем не менее для оценки достигнутого при экспертизе "разрешения" молекулярно-генетического анализа мы конкретизировали неисключающий вывод для обеих предполагаемых матерей одного ребен-

ка на основании математической обработки результатов типирования 8 локусов, в которых были выявлены совпадающие аллели в генотипах ребенка и каждой из женщин. Были рассчитаны значения индекса материнства (Maternity Index, MI) и вероятности материнства (Probability of Maternity, PM) [1, 8].

Подобные вероятностные оценки, применяемые в большинстве судебно-генетических лабораторий за рубежом, базируются на так называемом байесовом (Bayes) алгоритме с использованием произведения характеристик встречаемости соответствующих аллелей или генотипов по всем исследованным независимым локусам ("product rule", или multiplication rule") [8]. Этот принцип расчетов был использован и в описанной экспертизе (с той обязательной оговоркой, что относительная хромосомная локализация исследованных локусов позволяет рассматривать их как независимые, поэтому для вероятностных оценок здесь приемлемо простое перемножение характеристик встречаемости аллелей по всем локусам). Вероятность истинного материнства рассчитывали на основе бай-

Таблица 3

Панель из 13 полиморфных локусов (представляющих 10 групп сцепления), типирование которых выполнено на заключительном этапе исследования

Индивидуализирующая система	Ребенок	Предполагаемая мать Н.	Предполагаемая мать Л.
TPOX-генотип	9—11	7—11	8—8
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,113; 0,225	0,013; 0,225	0,583; 0,583
FGA-генотип	20—24	20—20	22—22
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,163; 0,133	0,163; 0,163	0,165; 0,165
D7S820-генотип	10—10	10—12	9—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,240; 0,240	0,240; 0,160	0,130; 0,160
HUMvWA-генотип	14—17	16—17	16—18
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,085; 0,250	0,198; 0,250	0,198; 0,258
D7S8-генотип	A—A	A—B	B—B
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,610; 0,610	0,610; 0,390	0,390; 0,390
GC-генотип	B—B	A—B	A—C
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,178; 0,178	0,275; 0,178	0,275; 0,547
LDLR-генотип	B—B	B—B	A—B
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,552; 0,552	0,552; 0,552	0,448; 0,552
GYPА-генотип	A—B	A—A	A—B
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,530; 0,470	0,530; 0,530	0,530; 0,470
HBGG-генотип	A—B	B—BB	A—A
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,537; 0,450	0,450; 0,450	0,537; 0,537
HLA DQA1-генотип	4,1—4,1	4,1—4,1	1,3—4,1
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,214; 0,214	0,214; 0,214	0,073; 0,214
D5S818-генотип	9—11	7—9	11—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,023; 0,393	0,003; 0,023	0,393; 0,333
D6S2414-генотип	9—10	9—10	9—11
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,500; 0,156	0,500; 0,156	0,500; 0,063
HUMCD4-генотип	8—12	8—12	7—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,265; 0,196	0,265; 0,196	0,466; 0,196
D7S820-генотип	10—10	10—12	9—12
Частоты встречаемости аллелей p^*	0,240; 0,240	0,240; 0,160	0,130; 0,160

есова алгоритма при 50% априорной вероятности материнства [1]. Для случая, когда для анализа доступен только один из предполагаемых родителей ребенка, частота встречаемости в популяции человека (обозначаемая Q), обладающего "потенциальным родительским набором признаков-аллелей", рассчитывается как произведение локальных статистических частот (q_n "любых генотипов, содержащих аллели, присущие генотипу ребенка" для каждого из n исследованных локусов: $Q_n = \prod q_n$. Локальные статистические частоты q_n для каждого из n исследованных локусов рассчитывают, исходя из их аллельных частот p_n (см. табл. 2 и 3) по формуле $q_n = 2p_n - p_n^2$, причем p_n для гетерозиготного генотипа является суммой соответствующих аллельных частот. В данной работе для расчета использовали консервативные значения аллельных частот указанных локусов для населения Центральной Европы (см. табл. 2 и 3). На основании проведенного исследования аллельных состояний 8 хромосомных локусов

$Q_8 = q(D3S1358/\text{аллель 14 или 15}) \cdot q(\text{HUMF13A01}/\text{аллель 5 или 7}) \cdot q(\text{HUMTH01}/\text{аллель 6 или 9}) \cdot q(\text{HUMvWFII}/\text{аллель 12 или 15}) \cdot q(D13S317/\text{аллель 11 или 12}) \cdot q(\text{IgH-5' VNTR}/\text{аллель 8 или 12}) \cdot q(\text{HUMCYAR04}/\text{аллель 5 или 7}) \cdot q(D19S253/\text{аллель 7 или 17}) = 0,051246$.

Соответственно индекс материнства $MI_8 = 1/Q_8 = 19,51$.

А posteriori (после получения результатов ДНК-анализа) вероятность истинного родительства для обеих женщин составила

$$PM_8 = \frac{MI_8}{1 + MI_8} = \frac{19,5}{20,5} = 0,9512, \text{ или } 95,12\%.$$

Таким образом, мы убедились в том, что величина PM в обоих случаях осталась ниже приемлемого стандарта доказательности. Это важный момент, на который стоит обратить внимание. Как упоминалось выше, согласно проекту новых Правил, в случае неисключения родительства для обоснованного вывода вероятность отцовства/материнства должна составлять не менее 99,75%. В данном случае такое относительно высокое значение вероятности материнства не было достигнуто ни для одной из двух женщин. Поэтому результаты исследования получились неоднозначными, а экспертная задача осталась нерешенной.

В связи с этим исследование было продолжено, и на 2-м этапе работы было протипировано еще 13 локусов из 10 групп сцепления (см. табл. 3). Проведенные на этом этапе тесты снова выявили комплементарное совпадение аллелей всех 13 аутосомных локусов в геномах ребенка и предполагаемой матери Н. Таким образом, с учетом результатов 1-го этапа получилось, что совпадение аллелей для этой пары было выявлено во всех исследованных локусах (всего в 21 локусе). Это подкрепляет версию материнства женщины Н.

В то же время в геноме ребенка и другой предполагаемой матери — Л. в 6 из тех же 13 локусов были выявлены полностью не совпадающие аллели (локусы TPOX, FGA, D7S820, HUMvWA, D7S8 и GC — см. табл. 3). Следовательно, генетический материал ребенка не мог быть получен по наследству от женщины Л., и ее родительство исключается.

Таким образом, проблема выбора одной из двух версий решена. Однако для полного решения экспертной задачи необходимо провести математическую обработку неисключающего результата для предполагаемой матери Н. С этой целью, учитывая результаты генотипирования по всем исследованным локусам, можно рассчитать ожидаемую частоту встречаемости в популяции женщины, обладающей "потенциальной материнской панелью аллелей".

В то же время для корректного расчета необходимо учитывать возможную взаимозависимость наследования аллелей тех локусов, которые расположены в одной группе сцепления (речь идет о так называемом сцепленном наследовании аллелей локусов, расположенных близко друг к другу на одной хромосоме). Для того, чтобы не делать расчеты громоздкими и лишь иллюстрировать порядок цифр, мы упростили задачу, применив условную, минимизирующую схему расчета и завысив вероятностный результат: из каждой группы сцепления для расчета был выбран по сути только один локус, а другие не учитывали.

Принцип расчета следующий. Исходя из хромосомной локализации, аутосомные локусы сгруппировали в 14 независимо наследуемых групп — условных групп сцепления (см. табл. 1, горизонтальная разбивка), к которым применимо правило "product rule", и при вероятностных оценках из каждой группы использовали единственное (минимальное) значение величины q_n (т. е. принимается, что в каждой группе локусы полностью сцеплены). Это допустимо, поскольку при таком подходе расчетная величина Q оказывается заведомо выше реальной, и весь расчет является консервативным, так как дает наименьшую возможную оценку вероятности родительства:

$$Q_{21} = q(\text{TPOX}/\text{аллель 9 или 11}) \cdot q(D3S1358/\text{аллель 14 или 15}) \cdot q(\text{GC}/\text{аллель B}) \cdot \{q(\text{FGA}/\text{аллель 20 или 24}) \text{ или } q(\text{GYPA}/\text{аллель A или B})\} \cdot q(D5S818/\text{аллель 9 или 11}) \cdot \{q(\text{HLA DQA1}/\text{аллель 4.1}) \text{ или } q(D6S2414 (\text{аллель 9 или 10}) \text{ или } q(\text{HUMF13A01}/\text{аллель 5 или 7})\} \cdot q(D7S820/\text{аллель 10}) \cdot q(D7S8/\text{аллель A}) \cdot \{q(\text{HBBG}/\text{аллель A или B}) \text{ или } q(\text{HUMTH01}/\text{аллель 6 или 9})\} \cdot \{q(\text{HUMCD4}/\text{аллель 8 или 12}) \text{ или } q(\text{HUMvWA}/\text{аллель 14 или 17}) \text{ или } q(\text{HUMvWFII}/\text{аллель 12 или 15})\} \cdot q(D13S317/\text{аллель 11 или 12}) \cdot q(\text{IgH-5' VNTR}/\text{аллель 8 или 12}) \cdot q(\text{HUMCYAR04}/\text{аллель 5 или 7}) \cdot \{q(D19S253/\text{аллель 7 или 17}) \text{ или } q(\text{LDRL}/\text{аллель B})\} = Q_8 \cdot q(\text{TPOX}/\text{аллель 9 или 11}) \cdot q(\text{GC}/\text{аллель B}) \cdot q(\text{FGA}/\text{аллель 20 или 24}) \cdot q(D5S818/\text{аллель 9 или 11}) \cdot q(\text{HLA DQA1}/\text{аллель 4.1}) \cdot q(D7S820/\text{аллель 10}) \cdot q(D7S8/\text{аллель A})/q(\text{HUMF13A01}/\text{аллель 5 или 7}) = 0,0005390$$

Тогда для 21 исследованного локуса, которые объединены в 14 независимых групп, значения индекса материнства MI_{21} для предполагаемой матери Н. равно $1/Q_{21} = 1855$, а posteriori вероятность истинного родительства (PM) составляет как минимум

$$PM_{21} = \frac{MI_{21}}{1 + MI_{21}} = \frac{1855}{1856} = 0,99946, \text{ или } 99,95\%.$$

Как видим, это значение удовлетворяет рекомендованному уровню доказательности вывода. Следовательно, на данном этапе экспертную задачу можно считать полностью решенной. Однако хотелось бы обратить внимание на следующее обстоя-

тельство. Из 21 исследованной индивидуализирующей системы 14 не исключили родительство предполагаемой матери Л. Вероятность материнства, рассчитанная для этих 14 локусов (9 независимых групп) по консервативной схеме, составляет

$$Q_{14} = q(D3S1358/\text{аллель 14 или 15}) \cdot q(GYPA/\text{аллель A или B}) \cdot q(D5S818/\text{аллель 9 или 11}) \cdot \{q(HLA DQA1/\text{аллель 4,1}) \text{ или } q(D6S2414(\text{аллель 9 или 10}) \text{ или } q(HUMF13A01/\text{аллель 5 или 7})) \cdot \{q(HBGG/\text{аллель A или B}) \text{ или } q(HUMTH01/\text{аллель 6 или 9})\} \cdot \{q(HUMCD4/\text{аллель 8 или 12}) \text{ или } q(HUMvWFII/\text{аллель 12 или 15})\} \cdot q(D13S317/\text{аллель 11 или 12}) \cdot q(IgH-5' VNTR/\text{аллель 8 или 12}) \cdot q(HUMCYAR04/\text{аллель 5 или 7}) \cdot \{q(D19S253/\text{аллель 7 или 17}) \text{ или } q(LDRL/\text{аллель B})\} = Q_8 \cdot q(HLA DQA1/\text{аллель 4,1}) \cdot q(D5S818/\text{аллель 9 или 11}) / q(HUMF13A01/\text{аллель 5 или 7}) = 0,016413.$$

Соответственно индекс материнства $MI_{14} = 1/Q_{14} = 61$.

Постериорная вероятность истинного родительства в этом случае составляет

$$PM_{14} = \frac{MI_{14}}{1 + MI_{14}} = \frac{61}{62} = 0,9839 = 98,39\%.$$

Это значит, что даже в том случае, если бы при экспертизе были выполнены именно эти 14 тестов и ложноуказанное материнство Л. не было бы исключено, тем не менее была бы достигнута относительно невысокая вероятность истинного материнства. Этот пример наглядно иллюстрирует тот факт, что низкое доказательственное значение результата молекулярно-генетической экспертизы не может дать оснований для однозначного суждения и указывает на необходимость продолжения исследования, расширения панели тест-систем и достижения действительно высокодоказательных результатов.

Заключение

Сложность этой неординарной экспертизы была обусловлена двумя факторами. Во-первых, объектами экспертизы явились фрагменты полуразрушенных костей от эксгумированного трупа ребенка. Подобные объекты обычно оставляют мало надежды на получение хороших препаратов ДНК вследствие неизбежной деградации генетического материала под воздействием бактериальной микрофлоры и неблагоприятных факторов окружающей среды, а также возможного проникновения в костную ткань некоторых трудноудаляемых химических компонентов почвы, которые оказывают ингибирующее действие на термостабильную ДНК-полимеразу. Во-вторых, образцы крови мужчин, которые могли бы рассматриваться в качестве бесспорных отцов для рожденного каждой из женщин ребенка, оказались недоступны для анализа.

Эти осложняющие моменты вызвали трудности как при получении и использовании полученных из костной ткани препаратов ДНК в качестве матрицы для полимеразной реакции, так и при выявлении всего комплекса признаков, достаточного для обоснованного вывода о родстве ребенка и его потенциальной матери.

Тем не менее примененные нами методы экстракции и высокоэффективной очистки ДНК позволили получить препараты из костной ткани, которые не содержали ингибиторов и в количествен-

ном отношении оказались пригодными для типирования по достаточно большому числу молекулярно-генетических индивидуализирующих систем. Всего в ходе экспертного исследования в геномах проходящих по делу лиц были протипированы аллельные состояния 21 аутосомного локуса, а также полспецифические гетероформы локуса амелогенина на X- и Y-хромосоме. Здесь следует отметить, что такое расширение панели тест-систем стало возможным, в частности, благодаря использованию новейшей флуоресцентной технологии "Perkin Elmer". При этом впервые в России был выполнен фрагментный анализ ДНК на автоматизированной системе ABI 377 Prism.

В свою очередь, помимо демонстрации технических возможностей современной молекулярно-генетической экспертизы, полученные в работе результаты наглядно иллюстрируют логическую необходимость достижения максимально высокого уровня доказательности в любом из случаев позитивной идентификации неисключенных родителей при экспертизе спорного происхождения детей.

Расчеты показывают, что для стандартных случаев в среднем 9 полиморфных локусов обеспечивают уровень вероятности $> 99,99\%$ [6]. Однако, как видно из данного исследования, генотипирование даже по 14 локусам в ряде случаев может оказаться малоинформативным. При этом достигаемые значения вероятности иногда являются ложноубедительными, поскольку психологически могут восприниматься как высокодоказательные. Представляя эту точку зрения, некоторые авторы [9] утверждают, что локусов должно быть исследовано как минимум 11 (при значениях гетерозиготности $\sim 80\%$) или даже 18 (при значениях гетерозиготности $\sim 70\%$).

В описываемом случае решение экспертной задачи потребовало того, чтобы было проанализировано более 20 локусов. При этом был выдержан (и оказался вполне оправданным) стандарт доказательности, требующий превышения величины $99,75\%$.

В дальнейшем оправданной видится необходимость достижения вероятности родительства не менее $99,99\%$. Можно ожидать, что в перспективе требуемое значение вероятности родительства будет еще выше [10]. Это позволит избежать неоднозначных результатов и обеспечит обоснованность любого экспертного вывода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов П. Л. // Суд.-мед. эксперт. — 1999. — № 4. — С. 35—41.
2. Туманов А. К. Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. — М., 1975. — С. 232.
3. American Association of Blood Banks (AABB). Standards for Parentage Testing. — 2-nd Ed. — Bethesda, 1994.
4. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M. et al. // Am. J. Hum. Genet. — 1991. — Vol. 48. — P. 137—144.
5. Hochmeister M. N., Budowle B., Borer U. V. et al. // J. Forens. Sci. — 1991. — Vol. 36, N 6. — P. 1649—1661.
6. Maha G. C., Mason J. M., Stuhlmiller G. M., Heine U. // Am. J. Hum. Genet. — 1995. — Vol. 56. — P. 1505—1506.
7. Mathew C. G. P. // Methods in Molecular Biology / Eds J. Walker. — London, 1984. — Vol. 2. — P. 31—34.
8. National Research Council. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. — Washington, 1996.
9. Pena S. D. J., Chakraborty R. // Trends Genet. — 1994. — Vol. 10. — P. 204—209.
10. Pena S. D. J. // Am. J. Hum. Genet. — 1995. — Vol. 56. — P. 1503—1504.