

ГЕНЕТИКА — СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ БЕЛАРУСИ

Александр Кильчевский,
главный научный сотрудник
лаборатории экологической гене-
тики и биотехнологии Института
генетики и цитологии НАН Беларуси,
заместитель Председателя Прези-
диума НАН Беларуси, академик

Ирма Моссэ,
главный научный сотрудник лабо-
ратории генетики человека Института
генетики и цитологии НАН Беларуси,
доктор биологических наук, про-
фессор

Марина Шаптуренко,
главный научный сотрудник лабо-
ратории экологической генетики
и биотехнологии Института генетики
и цитологии НАН Беларуси, доктор
биологических наук, доцент

Арина Буракова,
младший научный сотрудник лабо-
ратории генетической и клеточной
инженерии Института генетики
и цитологии НАН Беларуси

Аннотация. ДНК-технологии получили широкое распространение в различных сферах деятельности человека и не ограничиваются решением научных вопросов. Разработка современных подходов, расширяющих доказательную базу за счет установления особенностей внешности, возраста и психоэмоционального статуса неизвестного индивида по характеристикам его ДНК, раскрывают дополнительные перспективы для судебной экспертизы в Беларуси.

Ключевые слова: криминалистическая генетика, генетическое фенотипирование, установление возраста, психоэмоциональный статус.

Генетическое фенотипирование начиналось с изучения таких простых, на первый взгляд, внешних признаков человека, как цвет глаз и волос. Среди европейцев наблюдается значимая внутрипопуляционная изменчивость в характере варьирования этих особенностей. Различия пигментации в основном обусловлены количеством, типом и распределением меланина, который



не является уникальным соединением, а представляет собой смесь биополимеров, синтезируемых в специализированных клетках – меланоцитах. Цвет глаз определяется типом и количеством двух форм пигмента – эумеланина и феомеланина. Компактно упакованные в пигментсодержащих органеллах молекулы эумеланина поглощают почти весь спектр света, и при их высоком содержании цвет радужки воспринимается как темно-коричневый или черный. Феомеланин, являясь желто-красным пигментом, отражает более широкий спектр света. Его наличие в радужках предопределяет варианты различной насыщенности: от светло-зеленого до темно-орехового. При полном отсутствии обоих пигментов свет отражается от стромы радужной оболочки, в связи с чем цвет глаз воспринимается как серый или голубой. Аналогично содержание меланина предопределяет цветовую вариацию волос. В темных количествах преобладает эумеланин, в рыжих – феомеланин, а в светлых оба пигмента практически отсутствуют.

Выяснение генетических детерминант пигментации представляет интерес для различных областей научных исследований. Некоторые из таких особенностей связаны с заболеваниями, включая меланому и другие виды рака кожи, поэтому могут быть предметом изучения медицинской генетики. Предсказание внешнего облика человека важно для археологических изысканий, когда речь идет об исторических останках и требуются факты для подтверждения гипотез. И наконец, генетическое фенотипирование раскрывает новые возможности для криминалистики в случаях,

когда личность не может быть идентифицирована через стандартный STR-анализ, поскольку отсутствуют сведения о родственных связях и совпадения в криминалистической базе данных либо степень деградации ДНК очень высока. Таким образом, метод помогает сузить круг подозреваемых лиц или идентифицировать жертв катастроф.

Долгое время считалось, что окраску радужки глаз мы наследуем согласно менделевскому принципу, однако позже было установлено более сложное предопределение этого признака. Стремительное развитие молекулярной биологии обеспечило ученых современными инструментами анализа и раскрыло дополнительные перспективы в исследовании фундаментальных и прикладных вопросов генетики. В 2011 г. в Голландии была разработана первая модель генетического фенотипирования IrisPlex, которая позволила с высокой точностью (>90%) предсказывать голубой и карий цвета глаз для ряда европейских популяций на основе анализа всего шести точечных полиморфизмов (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) нашего генома. Несколько позже усилия ученых сосредоточились на генетических факторах пигментации кожи и волос. В результате появилась дополненная версия ДНК-фенотипирования – HIrisPlex, в математическую основу которой заложена логистическая регрессия, а расширенная панель из 24 SNP позволила с высокой точностью предсказывать не только цвет глаз, но и цвет волос человека. Интенсивные исследования с использованием инструментов полногеномного анализа привели к созданию модели HIrisPlex-S и объединению всех трех систем в единый общедоступный интер-

активный ресурс <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>. Генетическое фенотипирование с применением данной системы базируется на оценке полиморфизма 41 SNP и позволяет определять особенности пигментации глаз, кожи и волос человека. На базе HIrisPlex-S были успешно идентифицированы останки жертв Второй мировой войны в массовых захоронениях Словении, реконструирована внешность короля Англии Ричарда III (1452–1485 гг.), проведены палеоантропологические исследования, а также раскрыты отдельные криминальные преступления.

При валидации системы HIrisPlex-S выяснилось, что, несмотря на ее универсальность, в различных популяциях она проявляет разную эффективность. Это связано с тем, что каждой этнической группе свойственны специфические генетические особенности. В Беларуси подходы генетического фенотипирования ранее не применялись, и программа «ДНК-идентификация» Союзного государства стала стартом для разработки и развития этого направления. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси при сотрудничестве с Главным управлением судебных экспертиз и кафедрой глазных болезней БГМУ начал работу по обоснованию отечественной модели генетического фенотипирования. В течение первых 3 лет исследования собран обширный научный материал, в изысканиях приняли участие более 1200 добровольцев, обработана информация по широкому спектру их внешних признаков (цвет глаз, волос, бровей, бороды, особенностям пигментации кожи, структуре волос и др.), созданы эталоны пигментации (рис. 1). Помимо субъективной оценки для каждого участника были получены цифровые



Рис. 1. Референсные варианты пигментации радужки глаз и волос

макроизображения радужки глаз и волос, которые проанализированы в современном многофункциональном статистическом пакете MatLab и охарактеризованы по содержанию пигментов фео- и эумеланина в автоматизированном режиме. Генетическая часть исследования была направлена на 24 SNP генома, связанных с особенностями пигментации глаз и волос, по которым все участники были генотипированы. Далее эта информация сопоставлялась с результатами оценки фенотипов. Исследование подтвердило антропологические данные, ранее описанные для белорусского этноса, согласно которым популяция нашей страны представлена светлыми фенотипами. Результаты работы показали, что в белорусской популяции наиболее распространены шатены (варианты от средне-русого до темно-русого) с голубыми/серыми глазами – 43,2%, несколько реже представлены шатены с темной радужкой глаз – 20,5%. Частота иных фенотипических классов колеблется в пределах 0,5–9,9%.

Сопоставление результатов, полученных в Институте гене-

тики и цитологии с данными других исследователей показало, что в целом эффективность системы HIrisPlex для белорусской популяции близка по ряду показателей к таковой разработчика (Walsh et al., 2017), валидированной на западноевропейской популяции. Чувствительность (доля истинно-положительных результатов) модели к голубому, карему и промежуточному вариантам цвета глаз составила 94,9%, 91,8% и 36,8% соответственно при значениях специфичности 89–98,4%. Очевидно, уровень предсказания промежуточных вариантов радужки низкий, что может быть обусловлено неучтенными моделью эффектами взаимодействия генов и дополнительными генетическими вариантами, влияющими на формирование признака, которые должны быть установлены; модифицирующим действием эпигенетических факторов, а также ошибками классификации фенотипов.

Прогностическая способность модели предсказания типа пигментации волос ниже, чем в определении цвета радужки глаз. Итоговая классификация имеет четыре категории: блондины,

шатены, рыжие и брюнеты. При генетическом фенотипировании с использованием системы HIrisPlex наиболее результативным оказывается прогноз в отношении светло-русого (блондины) и рыжего цвета волос – верно диагностированы системой более 68% респондентов. Однако среди блондинов наблюдается высокая доля ($\approx 32\%$) ошибочных предсказаний. Очевидно, это связано с такой физиологической особенностью многих европейских популяций, как изменение цвета волос в процессе взросления. По данным польских коллег, примерно в 2/3 случаев система HIrisPlex предсказывает более светлый цвет волос для индивидов, которые имели его в раннем детстве. Физиология объясняет этот феномен влиянием половых гормонов на интенсивность меланогенеза либо изменением формы, размера и пигментного состава меланоцитов с возрастом. Однако высокая наследуемость потемнения волос (61–99%) позволяет предполагать участие в этом процессе неуставленных генетических факторов, идентификация которых могла бы существенно увеличить точность прогноза для популяций с высокой встречаемостью светловолосых индивидов.

Сбалансированная точность предсказания рыжего цвета волос в белорусской популяции оказалась самой высокой и составила 89,62%. Из 15 участвующих в исследовании рыжеволосых только двое были ошибочно классифицированы как шатены. Уровень эффективности предсказания брюнетов был самым низким, что, вероятно, связано со слабой представленностью данного фенотипического класса в нашей популяции, а также сложностями классификации из-за непрерывности цветовой вариации признаков

пигментации. В последнем случае сложно определить границу между темно-русскими вариантами и истинными брюнетами.

Полученные результаты продемонстрировали достаточно высокую эффективность системы HIrisPlex для генетического фенотипирования белорусской популяции: 92% – точность предсказания голубого и карего цвета глаз, 68% – промежуточных вариантов радужки. Для волос этот показатель колеблется от 74% до 98% в зависимости от типа пигментации.

В настоящий момент ученые Института генетики и цитологии могут определять фенотипические характеристики человека в пределах определенной вероятности, и этот уровень уже может быть полезен для системы правосудия. Учитывая существование популяционных особенностей, продолжается работа по поиску специфичных для белорусов полиморфизмов ДНК, которые позволят разработать отечественную высокоточную систему генетического фенотипирования для судебной экспертизы.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА НЕИЗВЕСТНОГО ИНДИВИДА

Один из главных этапов идентификации человека в криминалистике – определение его возраста по образцам биологического материала. Это дает возможность ограничить поиск при идентификации останков, сузить круг подозреваемых и тем самым экономить время, которое зачастую является лимитирующим фактором в процессе расследования.

В судебно-медицинской экспертизе для оценки возраста чело-

века применяются морфологический (характеристика внешних особенностей зубов или частей скелета) и биохимический (возрастание рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине при старении) методы. Однако вероятность ошибок при их использовании довольно высока (3–10 лет). Кроме того, при минимальном количестве биологического материала или высокой степени его деградации применение данных подходов затруднительно или невозможно. В таких случаях незаменимы методы, в которых матрицей для исследования выступает наследственный материал клетки.

ДНК является стабильной и долгоживущей молекулой. Даже при термической или химической обработке (сухие пятна, пищевые продукты, мумифицированные ткани и т.д.) она сохраняется в достаточном количестве для проведения молекулярно-генетического анализа. К криминалистическим объектам, по которым можно оценить возраст человека, относятся образцы крови, спермы, слюны и других биологических выделений; мягкие ткани; волосы с волосяными фолликулами; следы биологического происхождения, оставшиеся на сигаретных окурках, личных вещах и др.

Следует отметить, что существуют два понятия возраста: хронологический и биологический. Последний отражает степень морфологического и физиологического развития организма и определяется совокупностью его обменных, структурных, функциональных, регуляторных особенностей и приспособительных возможностей. Хронологический (календарный, паспортный) возраст – это разница между днем рождения и текущим моментом. Среди

сверстников обычно существуют различия по темпам возрастных изменений, то есть биологическому возрасту. Эти расхождения позволяют оценить интенсивность старения и функциональные возможности индивида. Наибольшие возрастные сдвиги в экспрессии генов, обусловленные гиперметилированием ДНК, отмечаются у долгожителей (90 и более лет), тогда как для лиц с редким генетическим заболеванием – прогерией (ускоренное старение организма) характерно гипометилирование ДНК. Таким образом, для людей до 80–90 лет расхождения между хронологическим и биологическим возрастом незначительны.

Старение – это постепенный, как правило, линейный во времени процесс накопления мутаций или изменения уровня метилирования в генетическом материале человека – ДНК. Молекулярно-генетический анализ данных изменений позволяет определять хронологический возраст живых людей или останков уже умерших, что может быть использовано при поиске пропавших без вести, жертв массовых беспорядков или стихийных бедствий, при археологических исследованиях.

Эпигенетическая составляющая генома – метилирование ДНК – это химический процесс присоединения метильной группы к азотистому основанию в составе цитозин-гуанинового динуклеотида (CpG) без изменения самой нуклеотидной последовательности ДНК. Около 1% ее метилировано в человеческом геноме. В соматических клетках взрослого организма такой процесс происходит в CpG-динуклеотидах, а вне их встречается в эмбриональных стволовых клетках.

Известно, что в зависимости от возраста уровень метилирования геномной ДНК изменяется. На этом основаны эпигенетические маркеры репликативного клеточного старения. В результате исследований было введено понятие «эпигенетические часы», представляющие собой совокупность эпигенетических меток ДНК, по которым можно определить возраст ткани, клетки или органа.

В последние годы появилось большое количество исследований, посвященных поиску универсальных маркеров старения. Наиболее воспроизводим, линейно-зависим, чувствителен и специфичен, а также экономически оправдан подход к определению хронологического возраста, основанный на выявлении уровня метилирования ДНК в конкретных CpG-маркерах.

Предложено несколько методик определения хронологического возраста индивида по уровню прижизненной химической модификации CpG-маркеров с заявляемой точностью 3–7 лет в зависимости от количества используемых в анализе маркеров и применяемых технологий.

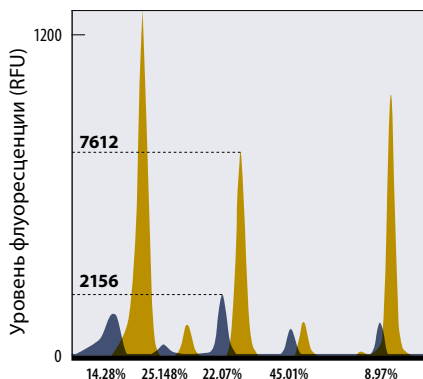


Рис. 2. Определение уровня метилирования 5 CpG-маркеров с использованием технологии SNaPshot (показаны расчетные значения в % метилирования)

В рамках мероприятия «Разработка методики определения вероятного возраста индивида по характеристике его ДНК» проводятся исследования по изучению эпигенетических процессов в геноме человека: распределение CpG-сайтов по геному, степень их метилирования в связи с хронологическим возрастом для различных типов биологических жидкостей и тканей (кровь, буккальный эпителий, сперма).

В исследовании приняли участие более 1 тыс. добровольцев из Беларуси. Молекулярно-генетический анализ по 40 CpG-маркерам проводится с использованием технологии микросеквенирования SNaPshot, для которой характерны высокая точность и воспроизводимость при относительно невысокой цене, а возможность мультиплексирования, то есть одновременного изучения 5–7 CpG-динуклеотидов (рис. 2) делает стоимость анализа одного образца невысокой, что немало важно при рутинной практике в криминалистических лабораториях. Информация о связи некоторых CpG-сайтов с хронологическим возрастом индивида известна, прогностический потенциал других был оценен нами с помощью биоинформатического анализа с использованием баз данных функциональной геномики человека (GEO, National Center for Biotechnology Information, США) на выборке более 10 тыс. человек, для каждого из которых имелась информация о более чем 400 тыс. CpG-маркеров.

Промежуточный результат позволяет сделать вывод об успешности используемого подхода к определению хронологического возраста индивида. При анализе уровня метилирования 6 наиболее информативных CpG-динуклеотидов – cg19283806 (CCDC102B),

cg16054275 (F5), cg18473521 (HOXC4), cg25410668 (RPA2), cg24079702 (FHL2) и Chr3_51741152 (GRM2) точность для образцов крови составила 3,8 года (рис. 3); для буккального эпителия на базе 4 CpG-динуклеотидов – cg07547549 (SLC12A5), cg14361627 (KLF14), cg08928145 (TSSK6), cg00481951 (SST) – 4,6 года; при исследовании спермы – 2,7 года по уровню только 2 CpG-динуклеотидов – cg12837463 и cg23488376 (LINC01595). Таким образом, установленный нами предсказательный потенциал малого количества CpG-маркеров (от 2 до 6) свидетельствует об экономичности разрабатываемой методики с соблюдением ее высокой точности.

Дальнейшие исследования, направленные на биоинформатический поиск CpG-динуклеотидов с высоким прогностическим потенциалом в контексте определения хронологического возраста человека в белорусской популяции, будут способствовать возрастанию точности не только для предсказательных моделей в целом, но и конкретных значений для каждого индивида. В результате выполнения проекта для криминалистической практики будет разработан метод, при применении которого эксперты смогут определить возраст неизвестного человека по биологическим следам и оценить его принадлежность к конкретной возрастной группе, что будет способствовать сокращению сроков раскрытия преступлений.

ГЕНЕТИКА ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА

В последние десятилетия наблюдается значительный интерес к выяснению генетических

механизмов становления психоэмоционального статуса человека, то есть особенностей его нервной системы и высшей нервной деятельности, темперамента и т.д. Установлено, что гены нейромедиаторных систем играют значительную роль в формировании психологических свойств личности, при этом их наследуемость от родителей к детям составляет примерно 50%. Такой же процент приходится на вклад средовых факторов – воспитание, обучение, образ жизни и т.д.

Публикации по генетике психоэмоциональных характеристик личности и психических расстройств многочисленны, однако большинство полученных результатов противоречивы, так как генетические механизмы психической деятельности человека сложны, неопределенны и остаются до сих пор не раскрытыми, что требует их дальнейшего исследования.

Психоэмоциональный статус личности оказывает большое влияние на жизнь человека – его профессиональную деятельность, успешность самореализации во всех сферах жизни, психологическое благополучие или склонность к рисковому поведению. Определенные психоэмоциональные особенности индивида могут являться факторами риска развития различного рода соматических заболеваний и психических нарушений (депрессия, неврозы, алкогольная зависимость, личностные расстройства, асоциальное поведение и т.д.). Психическое здоровье – это не только отсутствие психических и поведенческих расстройств, его главный критерий – психосоциальное равновесие. В то же время с каждым годом в структуре общественного здоровья доля психических нарушений неуклонно увеличива-

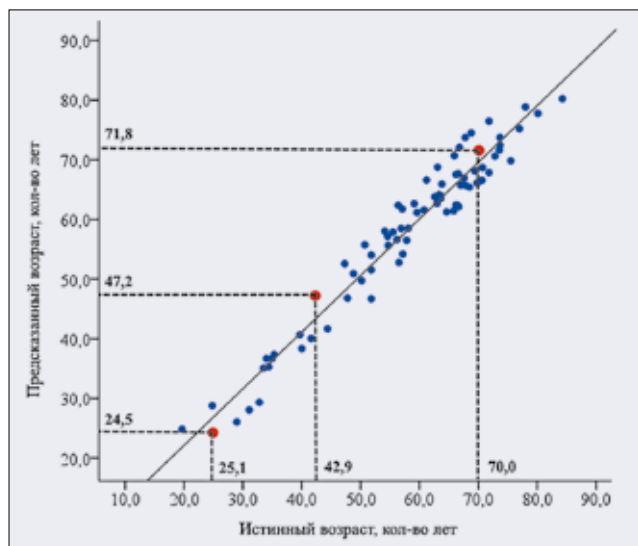


Рис. 3. Точность предсказания хронологического возраста человека по образцам крови (пример расчета возраста на основании многомерной линейной регрессии)

ется. По данным ВОЗ, такие расстройства ответственны за 13% болезней, при этом 10% взрослых в любой момент времени имеют то или иное психическое нарушение. В этой связи учет индивидуальных личностных особенностей (тип темперамента, особенности протекания нервных процессов, характер, уровень психоэмоциональной устойчивости) весьма важен для формирования групп риска развития личностных расстройств и разработки программ коррекции девиантного (асоциального) поведения и психических заболеваний.

Сведения о психоэмоциональном статусе личности важны также для профессионального отбора и оптимизации профессиональной деятельности. Ряд специальностей предполагает способность быстро и адекватно реагировать на ситуацию и эффективно оценивать риски, связанные с тем или иным решением. И лучше на этапе профориентации с помощью ДНК-анализа выяснить, не «сломается» ли потенциальный кандидат на данную должность в чрезвычайных условиях, выдержит ли его нервная система сверхнагрузки. Ведь

оказавшись в стрессовой ситуации, эти люди должны сохранять выдержку и самообладание.

В фокусе нашего внимания – гены стрессоустойчивости, особенно важные для представителей экстремальных профессий: пилотов, авиадиспетчеров, космонавтов, военных, сотрудников МЧС, спецназа, водолазов, пожарных и др.

Информация о психоэмоциональном статусе человека представляет несомненный интерес и для криминалистики. Всегда важно знать психологический портрет лица, совершившего преступление: есть ли у него склонность к агрессии, флегматик он или холерик. Иногда эти сведения помогают также в идентификации останков неизвестных лиц, таких как жертвы военных действий, авиакатастроф и др. Подобные сведения можно получить, анализируя ДНК, выделенную из оставшихся на месте преступления биологических следов. Более того, современные эпигенетические технологии позволяют ответить и на вопрос, совершено ли преступление в состоянии аффекта или было заранее продуманным и подготовленным.

В рамках программы «ДНК-идентификация» проведено молекулярно-генетическое и психологическое тестирование 1454 представителей белорусской популяции, в том числе из спецподразделений МВД (предположительно наиболее стрессоустойчивая группа), высококвалифицированных спортсменов, а также пациентов с личностными расстройствами. Все респонденты прошли процедуру информированного согласия. В качестве биологического материала была использована ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови или из буккального эпителия. Психологическое тестирование прошло по валидированной версии опросников PSS «The Perceived Stress Scale – 14» («Шкала воспринимаемого стресса – 14») и «Госпитальная шкала тревоги и депрессии» (HADS-тест). При этом использовался аппаратно-программный комплекс «НС-ПсихоТест» (разработка российской компании «Нейрософт»), включающий в себя множество разнообразных психофизических методик, большая часть которых связана с изучением сенсомоторных реакций (простая зрительно-моторная реакция, методики «Реакция различения», «Реакция на движущийся объект», «Помехоустойчивость», «Оценка внимания» и др.). Изучалось также содержание нейромедиаторов в сыворотке крови (норадреналин, серотонин, дофамин).

Молекулярно-генетический анализ проводили по 33 полиморфным вариантам генов различных нейромедиаторных систем мозга – серотонинэргической, дофаминэргической, норадренэргической, окситоцинэргической, иммунной и др. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

в реальном времени или с разделением продуктов в полиакриламидном геле. Полученные генетические данные были сопоставлены с результатами психологических тестов, в ходе которых респондентам предлагалось ответить на вопросы, определяющие уровень фенотипической стрессоустойчивости, а также наличие симптомов тревоги и депрессии.

Исследования показали, что большая часть белорусской популяции отличается высоким уровнем стрессоустойчивости, и лишь незначительная доля склонна к проявлению депрессивных симптомов. Обнаружены гендерные различия: мужчины более стрессоустойчивы, чем женщины, и реже испытывают чувство тревоги; у обоих полов уровень стрессоустойчивости коррелирует с уровнем образования – чем более образован человек, тем выше его эмоциональная стабильность.

На основе молекулярно-генетического анализа определены варианты генов, носители которых отличаются проявлениями чувства тревоги, более низкой стрессоустойчивостью, имеют более высокий уровень депрессии, а также склонны к психическим расстройствам и девиантному поведению. К ним относятся гомозиготный генотип S/S и аллель S. Показана также статистически достоверная ассоциация уровней эмоциональной нестабильности и тревожности с полиморфными вариантами гена 5-HTTLPR. Выявлена также статистически достоверная разница между людьми с низким и высоким уровнями тревожности по полиморфному варианту C/T гена DRD2.

В целом, сравнение результатов генотипирования контрольной группы, группы спецподраз-

делений МВД и группы пациентов с личностными расстройствами позволило выявить достоверные различия между ними по 11 полиморфным вариантам генов, ассоциированных с показателями психоэмоционального статуса человека. Их можно использовать в качестве информативных молекулярно-генетических маркеров для оценки индивидуальных особенностей психоэмоционального статуса человека.

На основе проведенной работы создан реестр, состоящий из 25 эпигенов, наиболее информативных для оценки психоэмоциональной деятельности человека, оптимизирован протокол определения статуса метилирования целевых локусов и разработана уникальная панель специфических олигонуклеотидных праймеров для создания соответствующих NGS-библиотек. Последняя используется для сравнения индивидуальных эпигенетических особенностей различных групп населения с помощью метода секвенирования нового поколения.

Разработка технологии определения молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров психоэмоционального статуса личности позволит определять психологический портрет человека по его ДНК как в целях криминалистики, так и оценки перспективности кандидатов для экстремальных видов деятельности, а также для разработки индивидуальных программ психологической и фармакологической поддержки и реабилитации. ■

