НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 1, 1990

УДК 577.175.8

МОДИФИКАЦИЯ ЭТАНОЛОМ СБОРКИ МИКРОТРУБОЧЕК МОЗГА

ПРОХНЕВСКИЙ А. И., СОРОЧИНСКИЙ Б. В.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Физиологическая активность этанола хорошо известна. Среди многих патологий, вызываемых хроническим употреблением алкоголя, распространены различные расстройства НС, однако механизмы этих явлений плохо изучены. Высказывается предположение, что большинство нарушений в функциях нервных клеток обусловлены активностью ацетальдегида [1], первичного метаболита этилового спирта. Одной из мишеней действия ацетальдегида на нервные клетки может быть система цитоскелета, так как обработка препаратов микротрубочек растворами ацетальдегида в концентрациях от 1 до 10 мМ ингибировала сборку этих структур [1]. Система микротрубочек участвует во многих процессах, протекающих в клетке—в клеточном морфогенезе, внутриклеточном транспорте и кеппинге рецепторов, регуляции некоторых биохимических процессов [2]. В нервных клетках микротрубочки отвечают за рост клеток, аксоплазматический транспорт и транспорт секреторных везикул. Поэтому понятно, что нарушение структуры клеточного скелета под влиянием продуктов распада этанола может вызвать серьезные нарушения в клеточных функциях.

Однако нельзя полностью исключить и возможность прямого влияния этилового спирта на систему микротрубочек. Проверка этого предположения была целью данного исследования.

Микротрубочки выделяли из мозга крупного рогатого скота двумя циклами полимеризации-деполимеризации в присутствии глицерина [3]. В качестве буфера, стабилизирующего микротрубочки (БСМ), использовали буфер Бершадского [4] : 50 мМ имидазол, 1 мМ ЭГТА, с мМ меркаптоэтанол, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, 4 М глицерин, pH 6,7. Микротрубочки, выделенные двумя циклами, хранили в 8 М глицерине на БСМ при —20° не более 2 суток.

При проведении экспериментов по сборке микротрубочек препараты сначала осаждали при 150000 g в течение 1 ч, затем деполимеризовали 1 ч при 0° в буфере БСМ без глицерина и повторно центрифугировали при тех же условиях. Супернатант, содержащий деполимеризованные микротрубочки, использовали для дальнейших экспериментов. Сборку микротрубочек индуцировали повышением температуры растворов до 37° и добавкой GTP до 1 мМ. Регистрировали процесс сборки по изменению оптической плотности растворов на

спектрофотометре DU-8 («Beckman», США), длина волны 360 нм, интервалы между измерениями 1 мин.

Белок определяли по методу Greensberg, Graddock [5].

В экспериментах по изучению влияния растворов этанола на процесс сборки микротрубочек раствор GTP заменяли растворами этанола.

Электронномикроскопические препараты микротрубочек изучали на электронном микроскопе JEM-100 B (Япония). Образцы для микроскопии готовили следующим образом: на подложки, покрытые формваром, наносили 1 каплю суспензии микротрубочек, через 5—10 с избыток раствора отбирали фильтровальной бумагой и оттеняли препараты 1%-ным уранил-ацетатом в течение 5—10 с.

Процесс сборки микротрубочек можно регистрировать по изменению оптической плотности их растворов (рис. 1). Критическая

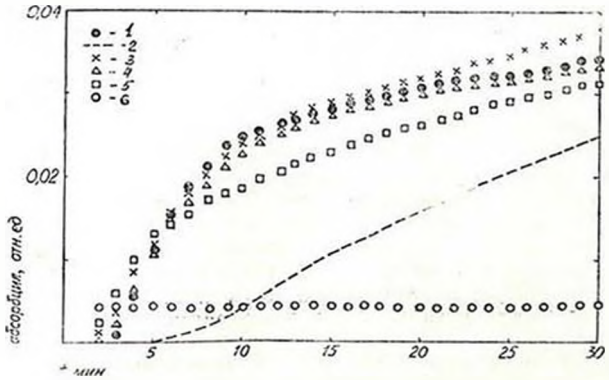

Рис. 1. Изменение оптической плотности растворов микротрубочек: *1*—контроль 1 мМ GTP, *2*-микротрубочки без GTP, *3*—75 мМ этанол, *4*—150 мМ этанол, *5*—1,5 мМ этанол, *6*—раствор альбумина. Концентрация белка 0,8 мг/мл, температура 37°

концентрация белка для инициации процессов полимеризации может отличаться в разных экспериментах и зависит от качества выделяемого материала. В наших экспериментах критическая концентрация равнялась 0,2 мг/мл. Контрольная кривая *(1)* описывает изменение оптической плотности раствора микротрубочек с концентрацией белка 0,8 мг/мл. Процесс полимеризации *in vitro* завершается примерно через 12—15 мин и хорошо описывается законами экспоненциальной кинетики [6]. По-видимому, отдельные части кривой могут соответствовать разным этапам сборки микротрубочек [7]. Лаг-фаза (1—3 мин) может характеризовать образование центров нуклеации, а фаза увеличения оптической плотности (4—10 мин) может соответствовать процессам латерального роста и элонгации микротрубочек. Кривая *2* описывает поведение раствора белков микротрубочек при 37° без GTP. Возрастание оптической плотности раствора начиная с 6—10 мин свидетельствует, по-видимому, о способности белков микротрубочек агрегировать при этих условиях, что подтверждается линейным характером кривой. Кривые *3, 4, 5* описывают повс-

дение препаратов микротрубочек в присутствии этанола (75 мМ—1,5 М). Сравнение этих кривых с контрольной позволяет предположить, что этанол способен индуцировать полимеризацию микротрубочек, поскольку увеличение оптической плотности препаратов носит экспоненциальный характер. Пока нельзя дать объяснение механизмам, лежащим в основе этого процесса. Однако нет оснований полностью исключать предположение о том, что такое взаимодействие является вполне специфичным, поскольку оптическая плотность раствора человечьего сывороточного альбумина в присутствии 150 мМ этанола не изменяется, то есть при такой концентрации спирта не происходит агрегации или полимеризации белков, что привело бы к изменению абсорбции растворов.

По-видимому, этиловый спирт обладает синергичным действием в отношении к глицерину, который способствует сборке микротрубочек [3]. Реализовать свое действие этанол может либо взаимодействуя с белками, ассоциированными с микротрубочками (МАР—белками), либо влияя непосредственно на конформацию тубулина, основного белка микротрубочек.

В работе McKinnon и соавт. [1] прямого влияния этилового спирта на процесс сборки микротрубочек не было зарегистрировано. В этой связи следует сделать несколько уточнений. Во-первых, концентрации этанола и белков микротрубочек в нашей работе и в упомянутом исследовании значительно отличаются. Поэтому можно предположить,что соотношение спирт/белок играет существенную роль для реализации самого явления индукции сборки микротрубочек под воздействием этанола. Во-вторых, в наших экспериментах мы полностью исключили из реакционной смеси GTP, то есть исключили возможность суперпозиции двух процессов—индукции сборки под воздействием этанола и полимеризации микротрубочек в присутствии GTP.

На рис. 2 показаны электронномикроскопические фотографии препаратов микротрубочек, собранных в присутствии GTP и под воздействием этанола. Анализ изображения на фотографиях подтверждает возможность образования трубчатых структур в присутствии этанола, хотя контрольные и собранные в присутствии спирта микротрубочки несколько отличаются. В этой связи можно предположить, что этанол способен индуцировать аномальную сборку микротрубочек (аномальную с точки зрения получения конечного продукта реакции).

Описанное нами явление индукции этанолом сборки микротрубочек *in vitro* может служить для объяснения явлений, зарегистрированных *in vivo*, поскольку описано как увеличение, так и уменьшение количества микротрубочек в различных клетках одного и того же организма после длительного употребления алкоголя [8]. Вероятно, наличие у тубулина многих изоформ может служить одной из причин того, что этанол и его продукты в разных клетках по-разному взаимодействуют с белками цитоскелета. Однако любое нарушение баланса цитоскелетных структур в клетке может существенно модифицировать клеточный метаболизм. Поэтому не только продукты деградации этилового спирта, но и сам этанол, оказывая прямое влияние на систему микротрубочек, может непосредственно служить причиной нарушения многих функций нервной клетки.

Цитоскелет нервных клеток может, вероятно, быть мишенью в действии некоторых психотропных веществ. В частности, было обна-

Рис. 2. Электронномикроскопические фотографии микротрубочек, собранных в присутствии 1 мМ *(а)* и 150 мМ этанола *(б)*

ружено, что аминазин в концентрациях от 100 до 500 мкМ ингибирует полимеризацию тубулина [9]. В цитированной ранее работе [1] показано ингибирование сборки микротрубочек в присутствии этилацетата. Обнаруженное нами явление прямого влияния этанола на полимеризацию цитоскелетных структур также может служить косвенным подтверждением в пользу представлений о клеточном скелете как о мишени в действии некоторых психотропных соединений.

TEHYLALCOHOL MODIFIES THE ASSEMBLY OF NERVE CELLS MICROTUBULES

PROKHNEVSKY A. I., SOROCHINSKY B. V.

Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The effect of ethyl alcohol on the polymerization of microtubules was investigated. Using electron microscopy and turbidimetry we showed that ethyl alcohol can induce microtubules assembly without GTP.

It is proposed, that nerve cells cytoskeleton may be the target of some psychotropic compounds.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McKinnon C., Davidson M., De Jersey J.* Brain Res., v. 416, № 1, p. 90—99, 1987.
2. *Фултон А.* Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки, М., Мир, 1987.
3. *Shelanski M., Gaskin F., Cantor Ch. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 70, № 3, p. 765—768, 1973.
4. *Bershadsky A. D., Gelfand V. I., Svitkina T. M., Tint I. S.* Cell Biol. Int. Rep. v. 2, p. 426—432, 1978.
5. *Greensberg Ch. S., Graddok Ph. B.* Clin. Chem., v. 28, № 7, p. 1725—1726, 1982.
6. *Gal V., Traicovic D., Ristanovic D.* Int. J. Biochem., v. 18, № 1, p. 85—88, 1986.
7. *Hesketh J.* Int. J. Biochem., v. 17, № 7, p. 761—766, 1985.
8. *Manuelm P. B., Tevares M. A* Brain Res., v. 339, № 2, 195—199, 1985.
9. *Андросова Л. В., Бурбаева Г. Ш.* Биохимия, т. 52, № 7, с. 1162—1168, 1987.

Поступила 9.XI.1989