

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ИОНОФОРА A23187, НА МИТОЗ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК СПЭВ

© *И. Б. Алиева, И. А. Воробьев*

Институт физико-химической биологии, Московский университет

Добавление 20 мкМ кальциевого ионофора A23187 в среду культивирования клеток СПЭВ приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме в 7—10 раз. Максимальное повышение концентрации Ca^{2+} наблюдается через 1—2 мин после введения ионофора, а через 30 мин концентрация Ca^{2+} превышает нормальный уровень не более чем в 3—5 раз. Через 1 мин после внесения в культуру кальциевого ионофора митотическое веретено укорачивается на 1/3 и увеличивается телесный угол, под которым микротрубочки веретена расходятся от centrosомы; укороченные веретена сохраняются до 5 мин воздействия. При воздействии нокодазола (17 мкМ) размеры веретена также быстро уменьшаются (2 мин), а затем и веретено, и метафазная пластинка разрушаются. Скорость укорочения веретена при действии ионофора и нокодазола практически одинакова, но при действии ионофора метафазная пластинка сохраняется дольше 5 мин. Результаты работы позволяют предполагать, что в интактных делящихся клетках расстояние между полюсами веретена максимально, а при нарушении клеточного гомеостаза оно быстро уменьшается. По-видимому, укороченное веретено становится более стабильным, и его размеры определяются кинетохорными пучками микротрубочек. Оно разбирается, если полимеризация микротрубочек полностью подавлена, но самоподдерживается, если их полимеризация возможна.

В настоящее время общепризнано, что ионы кальция играют важнейшую роль в регуляции клеточного деления. Были описаны естественные колебания уровня свободного кальция в ходе клеточного деления яиц морского ежа, в культивируемых клетках HeLa и PtK₂ (Keith et al., 1985; Poenie et al., 1985, 1986). Имеются также данные о том, что повышение концентрации Ca^{2+} дезорганизует митотические веретена *in vivo* (Kiehart, 1981; Sissen et al., 1985; Ratan et al., 1988; Tombes, Borisy, 1989) и в выделенном состоянии (Salmon, Segall, 1980; Schliwa et al., 1981). Считается, что кратковременное изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме митотических клеток необходимо для нормального течения митоза и что скачок концентрации Ca^{2+} является сигналом для начала анафазы (Isant, 1983; Kao et al., 1990).

Попытка исследовать динамику изменения веретена деления при повышении концентрации Ca^{2+} предпринималась и ранее (Isant, 1983), однако методические особенности данной работы — в ней использовали микроинъекции забуференного раствора Ca^{2+} непосредственно в делящиеся клетки — не позволили измерить повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме.

В настоящей работе мы исследовали изменение веретена при быстром и значительном повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток, вызываемом кальциевым ионоформом A23187 (Jensen, Rasmussen, 1977; Silver et al., 1980; Wolniak, Bart, 1985; Ziegler et al., 1985). Мы попытались связать скачок концентрации Ca^{2+} в цитоплазме с морфологическими изменениями в метафазных клетках, а также сравнить эти изменения с теми, которые мы наблюдали ранее при повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме интерфазных клеток (Алиева, Воробьев, 1995) и после деполимеризующего микротрубочки воздействия на клетки нокодазола (Алиева, Vorobjev, 1991).

Материал и методика

Клетки культуры эпителия почки эмбриона свиньи (СПЭВ) выращивали на среде 199 с добавлением 10 % бычьей сыворотки и антибиотиков (стрептомицина с пенициллином или гентамицина).

Нокадазол в конечной концентрации 5 мкг/мл вводили в среду культивирования и фиксировали клетки через 1, 1.5, 2, 3 и 5 мин.

A23187 в конечной концентрации 20 мкМ вводили в среду культивирования и фиксировали клетки через 1, 1.5, 2, 3.5 и 10 мин.

Соотношение числа клеток, находящихся в разных фазах митоза, определяли для 100 делящихся клеток.

Внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} измеряли, как описано ранее (Lewis, Cahalan, 1989). Клетки, растущие на покровных стеклах, инкубировали с Fura-2-AM (Calbiochem) в концентрации 10 мкМ 30 мин при комнатной температуре, затем стекла помещали клетками вверх на столик инвертированного микроскопа ICM-405 с флуоресцентным эпиконденсором, оснащенным проницаемым для УФ-света иммерсионным объективом 40x (Plan-Neofluar, N. A. 0.9). Флуоресценцию Fura-2-AM возбуждали светом ксеноновой лампы (100 Вт). Для микрофлуориметрии использовали приставку, позволяющую автоматически последовательно включать в ход лучей интерференционные светофильтры с максимумами пропускания 340 и 385 нм. Конденсатор эпиевещения имел дихроическое зеркало 405 нм и запирающий светофильтр 420 нм. Испускаемый клетками свет дополнительно пропускали через узкополосный светофильтр 510 нм. Изображение клеток получали с помощью видеокамеры с микроканальным усилителем (Hamamtsu Corp., Япония). Камера была сочленена с системой обработки изображения, соединенной с персональным компьютером (ETM Systems, США). Усредненные по 16 кадрам изображения для каждой длины волны снимали с интервалами 10 или 15с. Оцифрованные изображения с вычтенным фоном пиксел за пикселем делили друг на друга и частное записывали на диск компьютера. В каждом эксперименте анализировали не менее 20 клеток. Концентрацию Ca^{2+} рассчитывали, как описано ранее (Lewis, Cahalan, 1989). Исходную концентрацию Ca^{2+} полагали равной 225 нМ (Lewis, Cahalan, 1989).

Для иммунофлуоресцентного анализа системы микротрубочек клетки перед фиксацией лизировали в смеси, содержащей Тритон X-100, в условиях, стабилизирующих микротрубочки (Алиева и др., 1989); дальнейшую подготовку препарата и окрашивание клеток с помощью антител к тубулину проводили по стандартной методике. Препараты просматривали, используя флуоресцентный фотомикроскоп Opton (ФРГ).

Длины митотических веретен измеряли на препаратах клеток, фиксированных 2.5 %-ным раствором глутарового альдегида (Merck) на фосфатном буфере Зеренсена (pH 7.2—7.4) и дополнительно контрастированных 1 %-ным раствором OsCu, приготовленным на том же буфере. Измеряли длину веретена в 20 клетках в каждом варианте опыта.

Для электронно-микроскопического исследования клетки фиксировали 2.5 %-ным раствором глутарового альдегида (Merck) на фосфатном буфере Зеренсена (pH 7.2—7.4). Дофиксацию и дальнейшую обработку фиксированных клеток производили по стандартной методике (Алиева, Воробьев, 1989). Весь материал исследовали на серийных срезах, срезы просматривали и фотографировали на электронных микроскопах HU-11В и HU-12 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты

Динамика внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при действии на клетки A23187. После добавления кальциевого ионофора A23187 в среду культивирования клеток СПЭВ в течение 1-й мин после введения ионофора происходит резкое повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (рис. 1). Максимально концентрация Ca^{2+} повышается через 1—2 мин воздействия ионофора и приближается к 1—2 мкМ. Далее происходит постепенное снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, и через 5 мин она превышает нормальный уровень не более чем в 3—5 раз, составляя примерно 1—2 мкМ. В дальнейшем (15—20 мин) после добавления ионофора концентрация Ca^{2+} снижалась еще больше.

Митотические клетки в условиях повышенной концентрации ионов Ca^{2+} . Введение A23187 в культуральную среду вызывает постепенное затухание митотической активности клеток. Через 30 мин митотический индекс культуры в целом снижен. Среди митотических клеток преобладают метафазные. Доля клеток в анафазе почти втрое ниже нормы (7 % клеток в ана- и телофазе через 30 мин воздействия вместо 19 % в норме). Доля клеток, вступающих в митоз, также снижена (17 % клеток в профазе в опыте по сравнению с 24 % в контроле). Среди метафазных клеток преобладают сферические клетки, в которых метафазные пластинки располагаются в плоскости, параллельной плоскости субстрата, что делает невозможным измерение межполюсных расстояний.

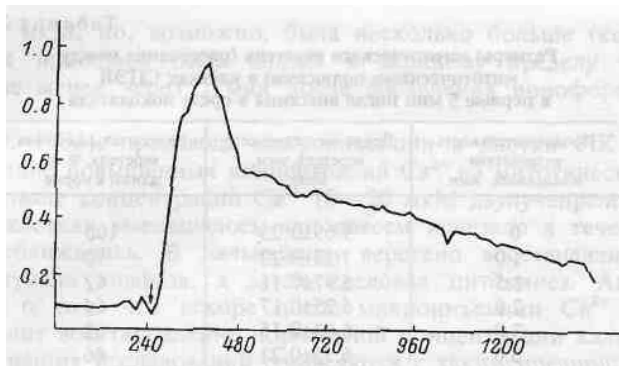


Рис. 1. Изменение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток СПЭВ после внесения в среду культивирования ионофора A23187 в концентрации 20 мкМ.

По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — концентрация ионов кальция, мкМ. Момент внесения в культуру ионофора отмечен стрелкой.

Полный митотический блок (отсутствие каналов в ана- и телофазе среди 100 делящихся клеток) достигается только через 2 ч после введения ионофора. В это время обнаруживаются лишь единичные клетки в профазе и метафазе, и все метафазные клетки находятся в состоянии К-митоза (т. е. в них разрушены метафазные пластинки).

Иммунофлуоресцентное исследование показало, что после добавления в культуры ионофора A23187 система микротрубочек в митотических клетках в отличие от таковой в интерфазных нарушается: уже через 1 мин после внесения в среду ионофора веретено деления заметно укорачивается (рис. 2).

Мы измерили длину митотического веретена (расстояние между митотическими полюсами) в метафазных клетках в первые 5 мин после внесения в среду ионофора A23187. Оказалось, что через 1 мин после внесения ионофора веретено укорачивается почти на 1/3, а в дальнейшем практически не изменяется (табл. 1).

Укорочение митотического веретена в клетках происходило без разрушения метафазной пластинки. Соответственно при сближении полюсов веретена увеличивался телесный угол, под которым микротрубочки веретена расходятся от centrosомы в направлении хромосом (рис. 2).

Кроме описанных выше изменений через 1.5—5.0 мин после начала воздействия на клетки ионофора в препаратах появлялись мультиполярные (трех- и четырехполюсные) митотические фигуры. Вероятно, это происходило благодаря продольному расщеплению полуверетен.

Электронно-микроскопический анализ состояния системы микротрубочек в митотических клетках при действии ионофо-

Таблица !

Расстояние между митотическими полюсами в клетках СПЭВ в первые 5 мин после внесения в среду ионофора A23187

Продолжительность воздействия ионофора, мин	Длина митотического веретена, мкм, $x \pm s_x$	Относительная длина веретена, % от длины в норме
0	12.32±0.20	100
1.0	8.47±0.28	69
1.5	8.73±0.20	71
2.0	7.71±0.29	63
3.0	7.76±0.25	63
5.0	8.17±0.18	66

Таблица 2

Размеры митотического веретена (расстояние между митотическими полюсами) в клетках СПЭВ в первые 5 мин после внесения в среду нокодазола

Продолжительность воздействия нокодазола, мин	Длина митотического веретена, мкм, $\bar{X} \pm \Delta x$	Относительная длина веретена, % от длины в норме
0	9.69±0.25	100
1.0	7.35±0.22	79
1.5	5.97±0.11	62
2.0	6.25±0.17	64
3.0	6.03±0.15	62
5.0	6.35±0.21	66

ра. Через 5 мин после внесения в культуру ионофора в укороченном митотическом веретене присутствуют все типы микротрубочек, характерные для нормальных митотических клеток: астральные (расходящиеся от полюсов), межполюсные (идущие от полюса к полюсу) и кинетохорные или хромосомные (идущие от кинетохоров к полюсам веретена). Кинетохорные микротрубочки собраны в параллельные пучки, контактирующие с кинетохорами под углом в 90°. Общее число микротрубочек всех перечисленных типов, составляющих митотические веретена, в клетках, обработанных ионофором, достаточно значительно и на ультратонких срезах строение веретена не отличается от такового в норме (данные не приведены).

Влияние нокодазола на митотические клетки. После добавления нокодазола в среду культивирования клеток СПЭВ система микротрубочек в митотических клетках претерпевает ряд изменений, аналогичных тем, которые наблюдались после воздействия кальциевого ионофора. Размер веретена после воздействия нокодазола также уменьшался. Однако если после введения ионофора размер веретена резко уменьшался только в течение 1-й мин воздействия и оставался практически неизменным в течение последующих 4 мин, то после введения в среду нокодазола уменьшение веретена происходило в течение 1.5 мин после начала воздействия (табл. 2). Интересно отметить, что при укорочении митотического веретена после действия на клетки нокодазола также увеличивался телесный угол, под которым микротрубочки веретена расходятся от centrosомы в направлении хромосом.

Характерной особенностью клеток СПЭВ является правильная ориентация метафазных фигур: в большинстве клеток метафазная пластинка ориентирована перпендикулярно плоскости субстрата, а полюса веретена находятся на оси, почти параллельной плоскости субстрата. После введения нокодазола правильная ориентация метафазных фигур наблюдалась только в первые 2 мин воздействия. После 2—3 мин воздействия нокодазола в большинстве метафазных клеток хромосомы и веретено не имели такой ориентации и в них была нарушена метафазная пластинка. Через 3—5 мин после введения нокодазола значительное число митотических фигур было дезорганизовано: полюса веретена перемещались к области экватора и хромосомы беспорядочно располагались вокруг них. После 5 мин воздействия такие митотические клетки составляли большинство.

Обсуждение

Результаты проведенных нами исследований подтвердили, что при воздействии ионофора А23187 на клетки СПЭВ резкий подъем концентрации Ca^{2+} происходит в течение 1.0—1.5 мин после введения ионофора в среду культивирования, а затем концентрация Ca^{2+} постепенно снижается. Максимальная концентрация Ca^{2+} при-

ближалась к 2 мкМ, но, возможно, была несколько больше (концентрация Ca^{2+} после введения ионофора была близка к верхнему пределу чувствительности метода). Тем не менее через 5 мин после добавления ионофора она составляла около 1 мкМ.

Изант (Isant, 1983), производя микроинъекции в клетки PtK раствора CaCl_2 , исследовал влияние повышенных концентраций Ca^{2+} на митотический аппарат этих клеток. В интервале концентраций Ca^{2+} 10—20 мкМ двулучепреломление веретена в метафазных клетках уменьшалось или совсем исчезало в течение 1 мин. При этом полюса сближались. В дальнейшем веретено восстанавливалось, и через 4—9 мин наступала анафаза, а затем следовал цитокинез. Автор высказывал предположение о том, что вскоре после микроинъекции Ca^{2+} в митотической клетке происходит восстановление нормальной концентрации кальция в цитоплазме. Результаты наших исследований согласуются с таким предположением. Однако при воздействии кальциевого ионофора максимальная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме оказывается несколько ниже — порядка 2 мкМ — и не возвращается к нормальному уровню (0.2 мкМ). Мы наблюдали более медленное, чем в опытах Изанта, укорочение веретена и не наблюдали его восстановления. Таким образом, можно предполагать, что после микроинъекций Ca^{2+} в делящиеся клетки уровень Ca^{2+} в цитоплазме понижается до нормального значения чрезвычайно быстро.

В нашей предыдущей работе было показано, что повышение концентраций Ca^{2+} в цитозоле интерфазных клеток, обработанных кальциевым ионофором A23187, не вызывает заметной реакции со стороны цитоплазматических микротрубочек: их сеть не отличалась от таковой интактных клеток в течение 30 мин инкубации с ионофором (Алиева, Воробьев, 1995). Это позволяет заключить, что в интерфазных клетках СПЭВ микротрубочки характеризуются низкой чувствительностью к действию Ca^{2+} в микромолярных концентрациях, что согласуется с данными литературы (Hoffstein, Weissman, 1978).

Известно, что чувствительность к Ca^{2+} выделенных микротрубочек сравнительно невелика, но значительно возрастает под влиянием кальмодулина (Marcum et al., 1978), который концентрируется в полюсах митотического веретена (Welsh et al., 1979; Means, Dedman, 1980). Этим можно объяснить, почему сравнительно небольшое повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме избирательно влияет на микротрубочки веретена, не влияя на микротрубочки интерфазных клеток.

Мы предполагаем, что при повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме до 2 мкМ происходит сдвиг равновесия между микротрубочками и пулом цитоплазматического тубулина, но не полная разборка веретена. При повышении концентрации Ca^{2+} до 10—20 мкМ происходит полная, не обратимая разборка веретена деления (Isant, 1983). Таким образом, при сравнительно небольшом повышении концентрации Ca^{2+} в цитоплазме веретено укорачивается, подобно тому что наблюдается при действии на клетки таксола (Jordan et al., 1993) и винбластина (Wendell et al., 1993) в низких концентрациях, а также при действии колцемида или нокодазола (Klienfield, Siskin, 1984; Алиева, Воробьев, 1991).

Микротрубочки в веретене имеют различную стабильность (Gunderson, Bulinski, 1988; Wadsworth, Salmon, 1988; Rieder, 1990). Наиболее стабильны микротрубочки кинетохорных пучков (De Bradander et al., 1980; Rieder, 1990). Мы предполагаем, что межполюсное расстояние в метафазе определяется сравнительно немногочисленными и высоколабильными межполюсными микротрубочками, которые очень быстро разбираются при действии на клетки любых факторов, ингибирующих полимеризацию микротрубочек. Вероятно, в этом случае меньше страдают кинетохорные пучки микротрубочек, определяющие общую архитектуру метафазной пластинки за счет сил, генерируемых на кинетохоре (Human, Mitchison, 1991). Известно, что даже при полном разрушении межполюсных микротрубочек кинетохорные пучки микротрубочек страдают мало (Witt et al., 1981) или вообще не изменяются относительно продолжительное время (Rieder, 1981). В дальнейшем,

если полимеризация микротрубочек полностью подавлена (например, при действии нокодазола в высокой концентрации), то кинетохорные пучки микротрубочек быстро теряют связь с полюсом веретена, вследствие чего метафазная пластинка дезорганизуется. Если полимеризация микротрубочек затруднена, но возможна, то укороченное веретено сохраняется значительно дольше (при действии митостатиков или A23187 в низких концентрациях).

Динамика состояния веретена при действии на клетки кальциевого ионофора в течение первых 2 мин сходна с таковой при действии нокодазола в высокой концентрации. Однако в последнем случае не только укорачивается веретено, но и очень быстро разрушается метафазная пластинка. Этот факт свидетельствует о том, что деполимеризуются как межполюсные микротрубочки, так и микротрубочки кинетохорных пучков и астральные микротрубочки. Последние, как известно, обладают максимальной устойчивостью к митостатикам колхицинового типа (De Brabander et al., 1980; Rieder, 1990). Таким образом, эффекты воздействия на митотические клетки нокодазола и A23187 сходны в первые 2 мин, но различны в дальнейшем.

Мак-Дональд и соавторы (McDonald et al., 1992) показали, что в кинетохорных пучках только единичные микротрубочки тянутся непрерывно от кинетохора до centrosомы, а большинство микротрубочек значительно короче и не доходит до полюса веретена. Вероятно, при ухудшении условий полимеризации микротрубочек укорочение их кинетохорных пучков происходит за счет работы немногочисленных длинных микротрубочек.

Если суммировать полученные нами данные и данные литературы, можно предположить следующее. В метафазе расстояние между полюсами веретена максимально в интактной клетке. При нарушении клеточного гомеостаза веретено быстро укорачивается за счет частичной разборки межполюсных микротрубочек. Размеры укороченного веретена определяются кинетохорными пучками микротрубочек, и оно становится более стабильным. Веретено деления разбирается, если полимеризация микротрубочек полностью подавлена, но самоподдерживается, если полимеризация возможна.

Авторы благодарят д-ра М. Кэлана (M. Cahalan, Университет Калифорнии, Ирвайн, США) за предоставленную возможность поработать в его лаборатории и д-ра Ю. Осипчука (Университет Калифорнии, Ирвайн, США) за практическую помощь в проведении измерений концентрации Ca^{2+} .

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 93-04-6523 и 95-04-12703) и Международного научного фонда (фант MRJ000).

Список литературы

- Алиева И. Б., Воробьев И. А. Поведение centrosомы при воздействии ингибиторов энергетического обмена на клетки культуры ткани // Биологические науки. 1989. № 6. С. 45—50.
- Алиева И. Б., Воробьев И. А. Анализ ориентации центриолей в клетках культуры СПЭВ при действии кальциевого ионофора A23187 // Цитология. 1995. Т. 37, № 5/6. С. 491—499.
- Алиева И. Б., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. Стереоскопический анализ расположения микротрубочек вокруг centrosомы в клетках культуры ткани // ДАН СССР. 1989. Т. 305, № 5. С. 1232—1234.
- Alieva I. B., Vorobiev I. A. Induction of multipolar mitoses in cultured cells: decay and restructuring of the mitotic apparatus, distribution of centrioles // Chromosoma. 1997. Vol. 100. P. 532—542.
- De Brabander M., Ceuens G., Nuydens R., Willebrords R., De Mey J. The microtubule nucleating and organizing activity of kinetochores and centrosomes in living PTK-cells // Microtubules and microtubule inhibitors. Amsterdam: Elsevier, 1980. P. 255—268.
- Gunderson G. G., Bulinski J. C. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 5946—5950.
- Hoffstein S., Weissmann G. Microfilamentous and microtubules in calcium ionophore induced secretion of lysosomal enzymes from human polymorphonuclear leukocytes // J. Cell Biol. 1978. Vol. 78. P. 769—781.

- Hyman A. A., Mitchison T. J. Two different microtubule based motor activities with opposite polarities in kinetochores // *Nature*. 1997. Vol. 351. P. 206—211.
- Isant J. G. The role of calcium ions during mitosis // *Chromosoma*. 1983. Vol. 88. P. 1—10.
- Jenses P., Rasmussen H. The effect of A23187 upon calcium metabolism in the human lymphocyte // *Biochim. biophys. acta*. 1977. Vol. 468. P. 146—156.
- Jordan M. A., Toso R. J., Thrower D., Wilson L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 9552—9556.
- Kao J. P. Y., Alderton J. M., Tsien R. Y., Steinhardt R. A. Active involvement of Ca^{2+} in mitotic progression of Swiss 3T3 fibroblasts // *J. Cell Biol.* 1990. Vol. 111. P. 183—196.
- Keith C. H., Maxfield F. R., Shelanski M. J. Intracellular free calcium levels are reduced in mitotic PtK epithelial cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1955. Vol. 82. P. 802—804.
- Kiehart D. P. Studies on the in vivo sensitivity of spindle microtubules to calcium ions and evidence for a vesicular calcium-sequestering system // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 88. P. 604.
- Kleinfield R. G., Siskin J. E. Morphological and kinetic aspects of mitotic arrest by and recovery from colce-mid // *J. Cell Biol.* 1984. Vol. 91. P. 369—379.
- Lewis R. S., Cahalan M. D. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca and transmembrane Ca current in human leukemic T-cells // *Cell Regulation*. 1979. Vol. 1. P. 99—112.
- Marcum J. M., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R. Control of microtubule assembly-disassembly by calcium dependent regulator protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1975. Vol. 75. P. 3771—3775.
- McDonald K., O'Toole E. T., Mastronarde D. N., McIntosh J. R. Kinetochores microtubules in PtK cells // *J. Cell Biol.* 1992. Vol. 118. P. 369—383.
- Means A. R., Dedman J. R. Calmodulin — an intracellular calcium receptor // *Nature*. 1975. Vol. 285. P. 73—77.
- Poenie M. J., Alderton J. M., Steinhardt R. A., Tsien R. Y. Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase // *Science*. 1976. Vol. 233. P. 886—889.
- Poenie M. J., Alderton J. M., Tsien R. Y., Steinhardt R. A. Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle // *Nature*. 1975. Vol. 315. P. 147—149.
- Ratan R. R., Maxfield F. R., Shelanski M. J. Long lasting and rapid calcium changes during mitoses // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 107. P. 993—999.
- Rieder C. L. The structure of the cold-stable kinetochore fiber in metaphase PtK cells // *Cromosoma*. 1975. Vol. 84. P. 145—148.
- Rieder C. L. Formation of the astral mitotic spindle: ultrastructural basis for the centrosome-kinetochore interaction. // *Electron. Microsc. Rev.* 1990. Vol. 3. P. 269—300.
- Salmon E. D., Segall R. R. Calcium labile mitotic spindles isolated from sea urchin eggs (*Lytechinus variegatus*) // *J. Cell Biol.* 1975. Vol. 86. P. 355—360.
- Schliwa M., Euteneuer U., Bulinski J. C., Isant J. G. Calcium-lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1975. Vol. 78. P. 1037—1041.
- Silver R. B., Cole R. D., Cande W. Z. Isolation of mitotic apparatus containing vesicles with calcium sequestration activity // *Cell*. 1975. Vol. 19. P. 505—516.
- Siskin J. E., Silver R. B., Barrows G. H., Grash S. D. Studies on the role of Ca in cell division with the use of fluorescent probes and quantitative video intensification microscopy // *Advances in Microscopy*. 1975. P. 73—87.
- Tombes R. M., Borisy G. G. Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: anaphase onset is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient // *J. Cell Biol.* 1979. Vol. 109. P. 627—636.
- Wadsworth P., Salmon E. D. Spindle microtubule dynamics: modulation by metabolic inhibitors // *Cell Motil. Cytoskeleton*. 1975. Vol. 11. P. 97—105.
- Welsh M. J., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R. *J. Cell Biol.* 1979. Vol. 81. P. 624—634.
- Wendell K. L., Wilson L., Jordan M. A. Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosome // *J. Cell Sci.* 1993. Vol. 104. P. 261—274.
- Win P. L., Ris H., Borisy G. G. Structure of kinetochore fibers: microtubule continuity and inter-microtubule bridges // *Chromosoma*. 1975. Vol. 83. P. 523—540.
- Wolniak S. M., Bart K. M. The buffering of calcium with quin2 reversibly forestalls anaphase onset in stamen hair cells of *Tradescantia* // *Eur. J. Cell Biol.* 1975. Vol. 39. P. 33—40.
- Ziegler M. L., Siskin J. E., Vedbrat S. The alteration of mitotic events by ionophore A23187 and carbonyl cyanide n-chlorophenylhydrazone // *J. Cell Sci.* 1975. Vol. 75. P. 347—355.

Поступила 15 X 1995

THE EFFECT OF $[Ca^{++}]$ RISE ON MITOTIC PK CELLS TREATED WITH CALCIUM IONOPHORE A23187

7. B. Alieva, I. A. Vorobjev

Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow University

After addition of 20 mM calcium ionophore A23187 to cultured PK (pig kidney embryo) cells, $[Ca^{++}]$ in cytosol increased by more than 10 times. The maximum $[Ca^{++}]$ concentration was observed 1—2 min after drug introduction. Later on $[Ca^{++}]$ gradually decreased, and after 30 min of incubation with A23187 $[Ca^{++}]$ its concentration was

3—5 times higher than in the norm. 1 min after introduction of the calcium ionophore, mitotic spindles shortened for 1/3 and the angle of divergence of spindle microtubules from the centrosome extended. These changes remained for 5 min of treatment. After nocodazole treatment the length of the mitotic spindle reduced (2 min), then mitotic spindle and the metaphase plate were disrupted. The rate of mitotic spindle shortening after addition of the ionophore is about the same as after addition of nocodazole, but after ionophore treatment the metaphase plate remained for more than 5 min. Based on the results obtained we suggest that the maximum distance between spindle poles at metaphase is in the intact cell, and after any perturbation of normal microtubule dynamics the spindle may rapidly collapse. The collapsed mitotic spindle becomes more stable and its size is determined predominantly by kinetochore fibers. The metaphase spindle is completely and rapidly destroyed when the microtubule growth is prohibited, but it is preserved when this growth is restricted.

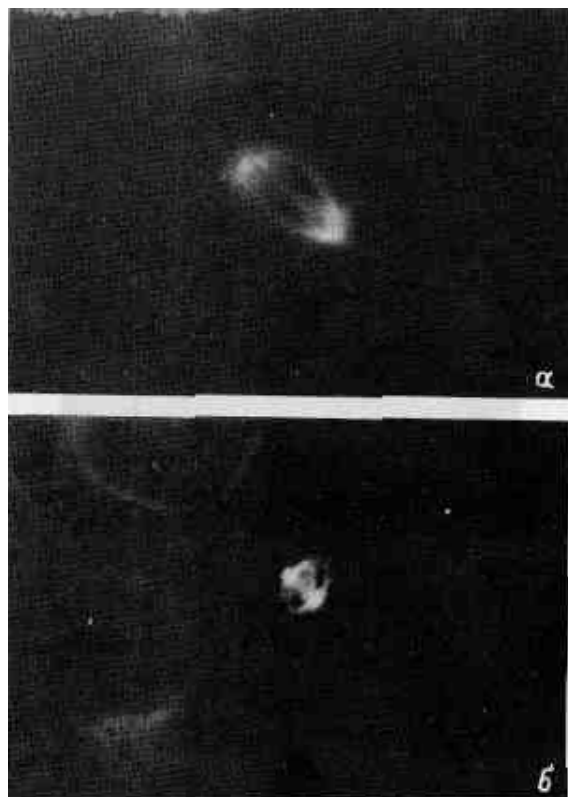


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание нормального митотического веретена (а) и митотического веретена после добавления в среду культивирования клеток СПЭВ кальциевого ионофора А23187 в концентрации 20 мкМ (б).