

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Общую РНК из образцов выделяли с использованием реагентов IntactRNA и ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. Синтез кДНК на матрице РНК проводили с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Анализ транскриптов РНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I и с использованием набора реактивов для одноэтапного анализа OneTube RT-PCR SYBR («Евроген»), согласно инструкции производителя. Полимеразная цепная реакция в реальном времени проводилась на амплификаторе Real-time CFX96 («Bio-Rad», США); использовался следующий протокол: 95 °C – 2 мин; 95 °C – 30 с, 62 °C – 30 с, 40 циклов; 95 °C – 3 мин. Нормирование проводилось по уровню экспрессии гена *ACTB*. В исследовании использовались следующие праймеры:

для мРНК *CAIX*: прямой 5'-GTGCCTATGAGCAGTTGCTGTC-3'  
и обратный 3'-AAGTAGCGGCTGAAGTCAGAGG-5' [doi: 10.1111/jcmm.17027];  
для мРНК *HIF1A*: прямой 5'-TGCTCATCAGTTGCCACTTC-3'  
и обратный 3'-CTTCACCGTTGACTACTCGT-5' [doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.042];  
для мРНК *ACTB*: прямой 5'-TTCCTGGCATGGAGTCCTGTGG-3'  
и обратный 3'-CGCCTAGAACATTGCGGTGG-5' [doi: 10.1073/pnas.0804543106].

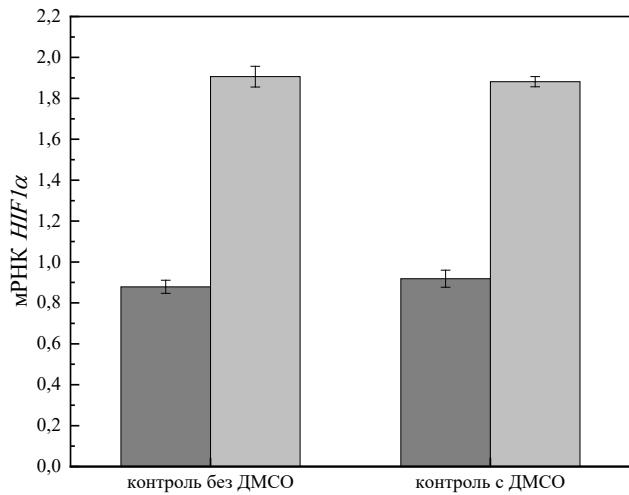
**Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг.** Пробы готовились следующим образом: клетки линии A549 после 48 ч инкубации собирали, промывали холодным фосфатно-солевым буфером, центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. К клеточному осадку добавляли лизирующий буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,5% (w/v) Triton X-100; 2 mM ЭДТА, 1 : 1000 протеазный ингибиторный коктейль («Sigma», США)).

Электрофоретическое разделение белков проводилось по методу Лаэммли [doi: 10.1038/227680a0] в 11%-ном полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение и перенос разделенных белков на PVDF мембрану («GE Healthcare», США) проводился в камере MiniPROTEAN Tetra-System («Bio-Rad», США). После переноса мембрана инкубировалась в 5%-ном растворе обезжиренного молока для блокирования неспецифического взаимодействия с антителами («Valio», Финляндия) в фосфатно-солевом буфере. Зоны целевых белков и белка контроля загрузки в гель, глицеральдегид-

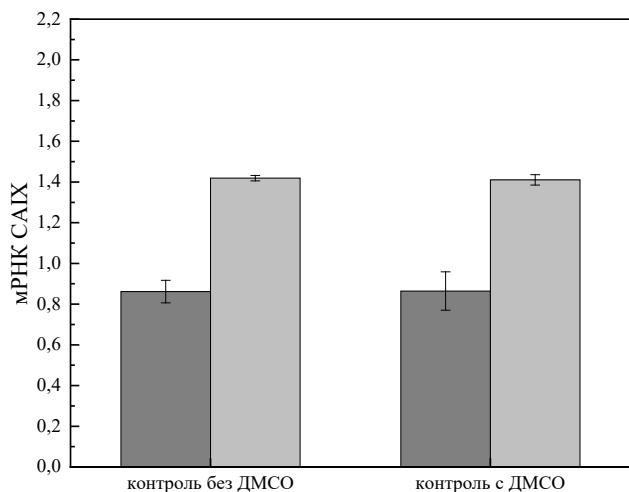
3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), идентифицировались с использованием первичных антител и вторичных антител против иммуноглобулина (IgG) мыши и кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Пероксидазная реакция регистрировалась методом усиленной хемилюминесценции. Для визуализации целевых белков использовались следующие антитела: RT2398540 Alexa Fluor 488 анти-HIF1 $\alpha$  человека («Thermo Fisher Scientific», США); MA540981 анти-КАЧ IX человека (053) («Thermo Fisher Scientific»); ГАФДГ (клон 6C5, «Abcam», Великобритания); антитела против иммуноглобулина (IgG) мыши и иммуноглобулина (IgG) кролика, меченные пероксидазой хрена («Abcam»; разведение 1 : 10000). Количественный анализ результатов имmunоблоттинга клеток линии A549 осуществлялся с использованием программного обеспечения для обработки изображений Image Studio Lite («Li Cor», Франция). Уровень экспрессии КАЧ IX и HIF1 $\alpha$  оценивался, как отношение интенсивности полос HIF1 $\alpha$  и КАЧ IX к интенсивности полос ГАФДГ.

**Цитотоксичность.** Изучение цитотоксичности соединений 1–4 проводилось с использованием MTT-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клетках линии ARPE-19 (линия клеток пигментного эпителия сетчатки человека).

(a)

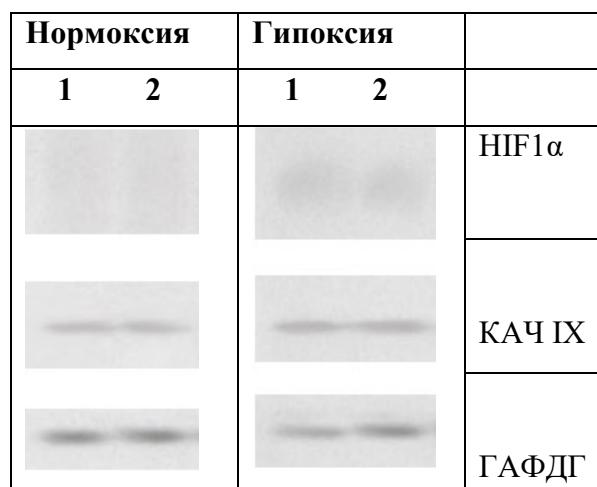


(б)

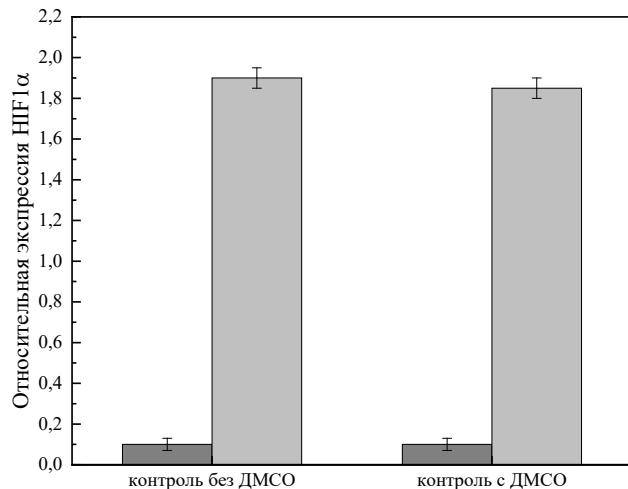


**Рис. П1.** ОТ-ПЦР-анализ экспрессии мРНК генов *HIF1A* и *CAIX* в клетках линии А549 в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч; финальное разведение ДМСО – 1 : 1000). Экспрессия *HIF1A* (а) и экспрессия *CAIX* (б)

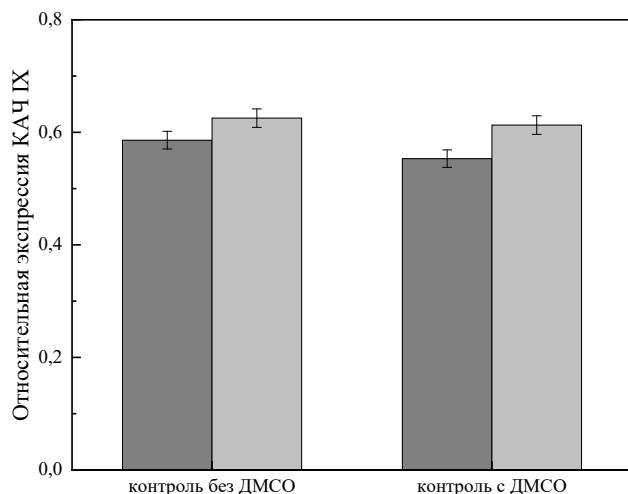
(а)



(б)

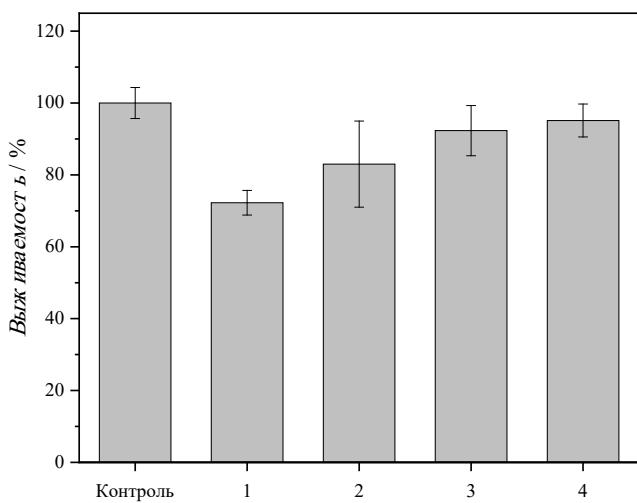


(в)



**Рис. П2.** HIF1 $\alpha$  и КАЧ IX в клетках линии A549 в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч; финальное разведение ДМСО – 1 : 1000). а – Иммунооблоттинг белкового лизата клеток линии A549, 1 – контроль без ДМСО, 2 –

контроль с ДМСО;  $\delta$  – количественный анализ относительной экспрессии HIF1 $\alpha$ ;  $\epsilon$  – количественный анализ относительной экспрессии КАЧ IX



**Рис. П3.** Выживаемость клеток линии ARPE-19 в присутствии ингибиторов КАЧ IX ( $C$  (1–4) = 50 мкМ в условиях физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч)