

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'-TTCCTGGGCATGGAGTCCTGTGG-3'

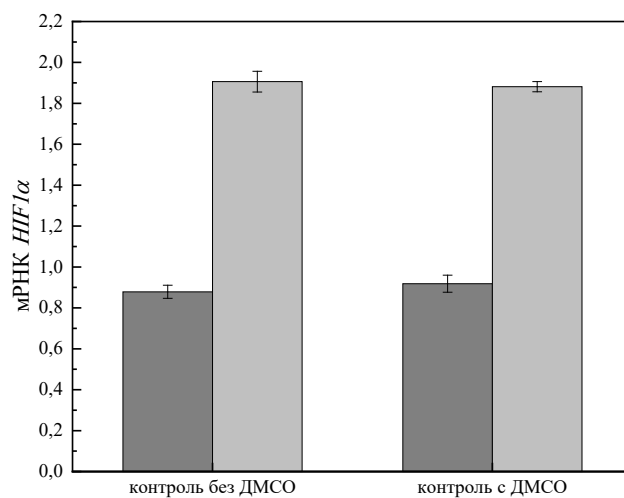
и обратный 3'-CGCCTAGAAGCATTTGCGGTGG-5' [doi: 10.1073/pnas.0804543106].

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 α 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 иммуноблоттинга клеток линии A549 осуществлялся с использованием программного обеспечения для обработки изображений Image Studio Lite («Li Cor», Франция). Уровень экспрессии КАЧ IX и HIF1 α оценивался, как отношение интенсивности полос HIF1 α и КАЧ IX к интенсивности полос ГАФДГ.

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

(a)



(б)

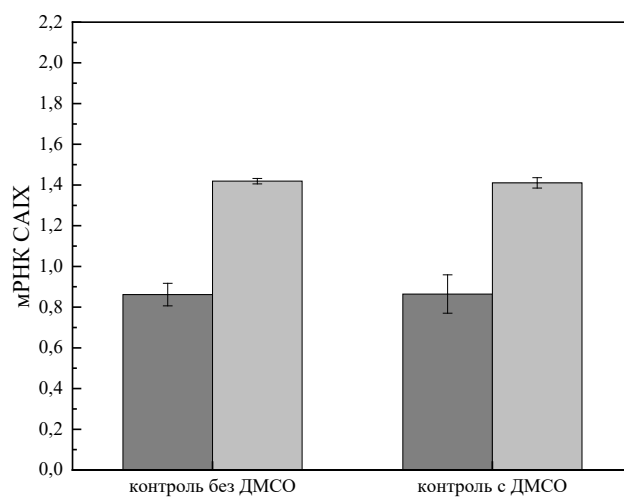






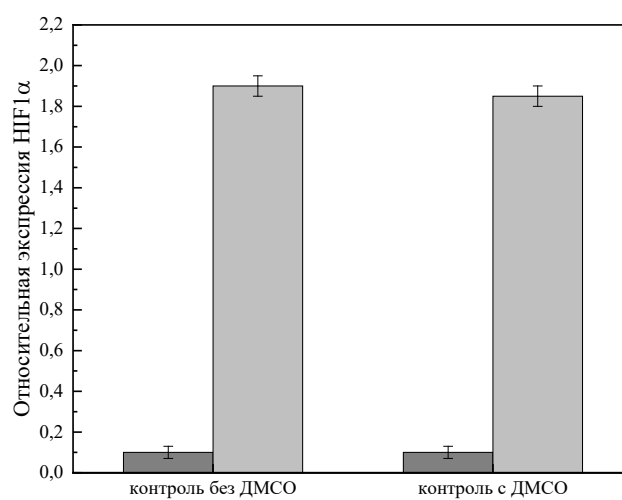


Рис. П1. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии мРНК генов *HIF1A* и *CAIX* в клетках линии A549 в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч; финальное разведение ДМСО – 1 : 1000). Экспрессия *HIF1A* (a) и экспрессия *CAIX* (б)

(a)

Нормоксия		Гипоксия		
1	2	1	2	
				HIF1 α
				КАЧ IX
				ГАФДГ

(б)



(в)

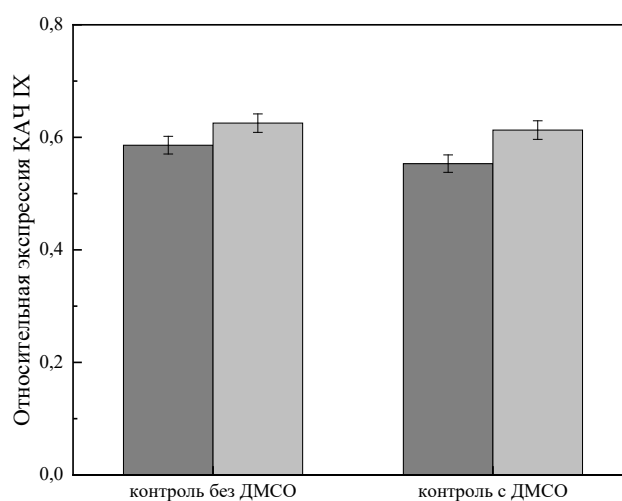


Рис. П2. HIF1 α и КАЧ IX в клетках линии A549 в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч; финальное разведение ДМСО – 1 : 1000). *a* – Иммуноблоттинг белкового лизата клеток линии A549, 1 – контроль без ДМСО, 2 –

контроль с ДМСО; *б* – количественный анализ относительной экспрессии HIF1 α ; *в* – количественный анализ относительной экспрессии КАЧ IX

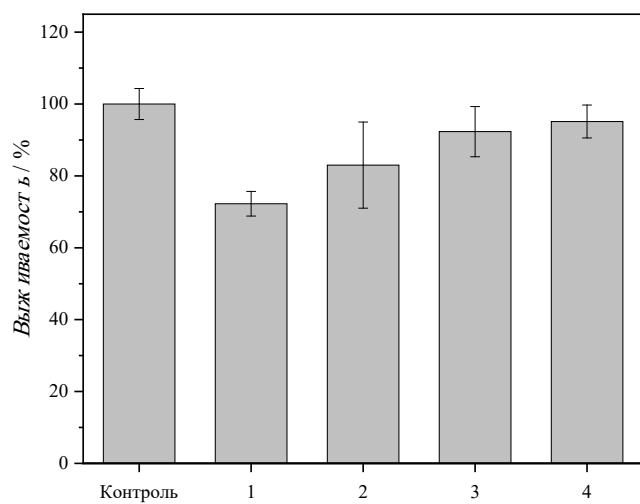


Рис. ПЗ. Выживаемость клеток линии ARPE-19 в присутствии ингибиторов КАЧ IX (С (1–4) = 50 мкМ в условиях физиологической гипоксии (время инкубации – 48 ч)