

ПРИЛОЖЕНИЕ

Исследование цитотоксичности производных гуанина. Культуры

дифференцированных клеток H9c2 выращивали в 8-луночных μ -слайдах («Ibidi», Германия). В среду культивирования, содержащую 1% (v/v) эмбриональной сыворотки телёнка, вносили тестируемые вещества, и по истечении 120 ч инкубации клетки прижизненно окрашивали Кальцеином АМ («Biotium», США) и Хёхстом 33258 («Sigma-Aldrich», США), после чего производили микрофлуоресцентный анализ на конфокальном микроскопе LSM 900 («Carl Zeiss», Германия). Для оценки трансмембранного потенциала митохондрий использовали метод окрашивания клеток флуоресцентным потенциал-зависимым красителем JC-1 («Molecular Probes», США) с последующим анализом на микропланшетном анализаторе CLARIOstar Plus («BMG Labtech», Германия). В качестве референтного соединения использовали ингибитор PJ34 («Tocris», Великобритания), который в концентрации 3 мкМ полностью подавляет активность PARP в клетке. Было установлено, что в концентрации 300 мкМ 7mGua и 8h7mGua не изменяют синцитий-подобную морфологию клеток и не влияют на плотность культуры (рис. S1, таблица S1). Кроме того, не было обнаружено существенного влияния этих веществ на значение митохондриального трансмембранного потенциала, который является индикатором жизнеспособности клеток (рис. S2).

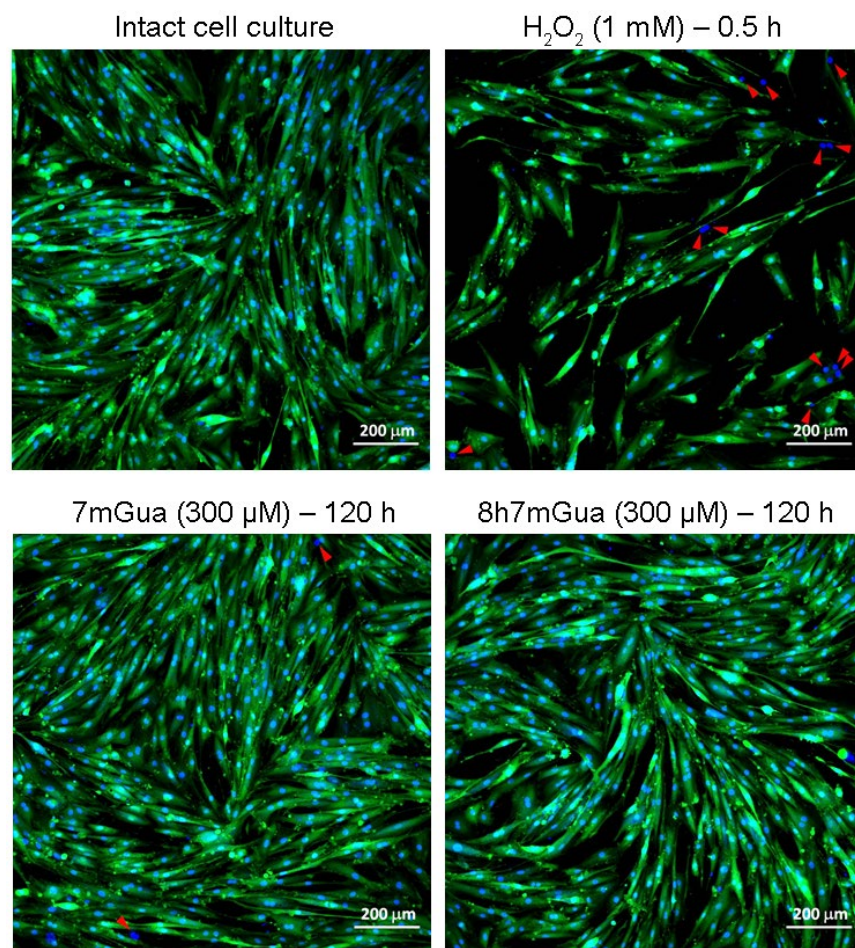


Рис. S1. Влияние длительной инкубации дифференцированных клеток H9c2 с 7mGua и 8h7mGua на морфологию клеток. Инкубацию с H_2O_2 в течение 0,5 ч (положительный контроль) проводили за сутки до анализа. В живых клетках окрашена цитоплазма (зелёный цвет, Кальцеин АМ) и ядра (синий цвет, Хёхст 33258), в мёртвых клетках окрашены только ядра (отмечены стрелками)

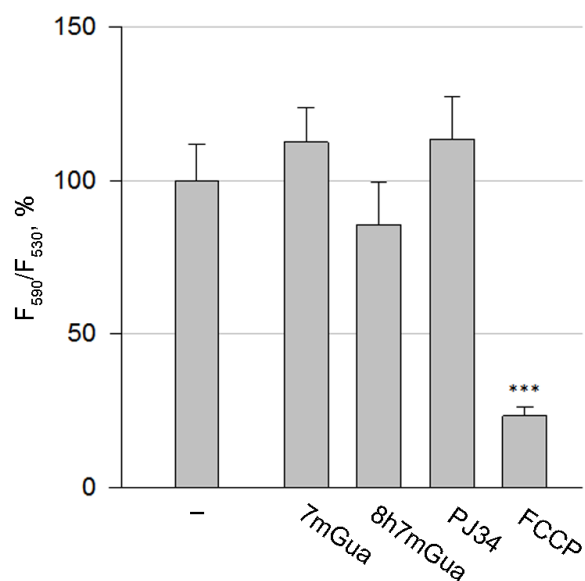


Рис. S2. Влияние длительной инкубации дифференцированных клеток H9c2 с 7mGua и 8h7mGua на показатель трансмембранного потенциала митохондрий. На оси ординат отложено соотношение интенсивностей флуоресценции при длинах волн 590 и 530 нм. Время инкубации клеток с производными гуанина и PJ34 – 120 ч. Протонофор FCCP (положительный контроль) вносили после окрашивания клеток, за 10 мин до проведения анализа. Концентрации веществ: 7mGua и 8h7mGua – 300 мкМ, PJ34 – 3 мкМ, FCCP – 20 мкМ. *** $p < 0,001$ относительно контроля (инкубация без веществ)

Таблица S1. Влияние длительной инкубации дифференцированных клеток H9c2 с 7mGua и 8h7mGua на степень покрытия поверхности роста живыми клетками (конфлюентность)

| Тестируемое вещество | Длительность обработки, ч | Конфлюентность, % |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| – | – | $80,8 \pm 3,2$ |
| 7mGua (300 мкМ) | 120 | $83,9 \pm 1,6$ |
| 8h7mGua (300 мкМ) | 120 | $79,4 \pm 2,0$ |
| PJ34 (3мкМ) | 120 | $79,8 \pm 2,6$ |
| H ₂ O ₂ (1 мМ) | 0,5* | $47,7 \pm 7,9^{**}$ |

* Клетки подвергали 0,5-часовой инкубации в среде с H₂O₂ (положительный контроль) за сутки до анализа. ** $p < 0,001$ относительно отрицательного контроля (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA/апостериорный анализ Бонферрони).

Прижизненный морфометрический анализ клеток. После промывки недифференцированные клетки H9c2 последовательно окрашивали Гомодимером этидия III и смесью Хёхста 33258 и Кальцеина АМ. Микрофлуоресцентный анализ проводили с использованием имиджера LionHeart FX («Biotek», США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Показано, что через 24 ч после повреждающего воздействия (30-минутная инкубация в среде с 1 мМ H₂O₂) плотность клеток в культуре сильно снижается (рис. S3).

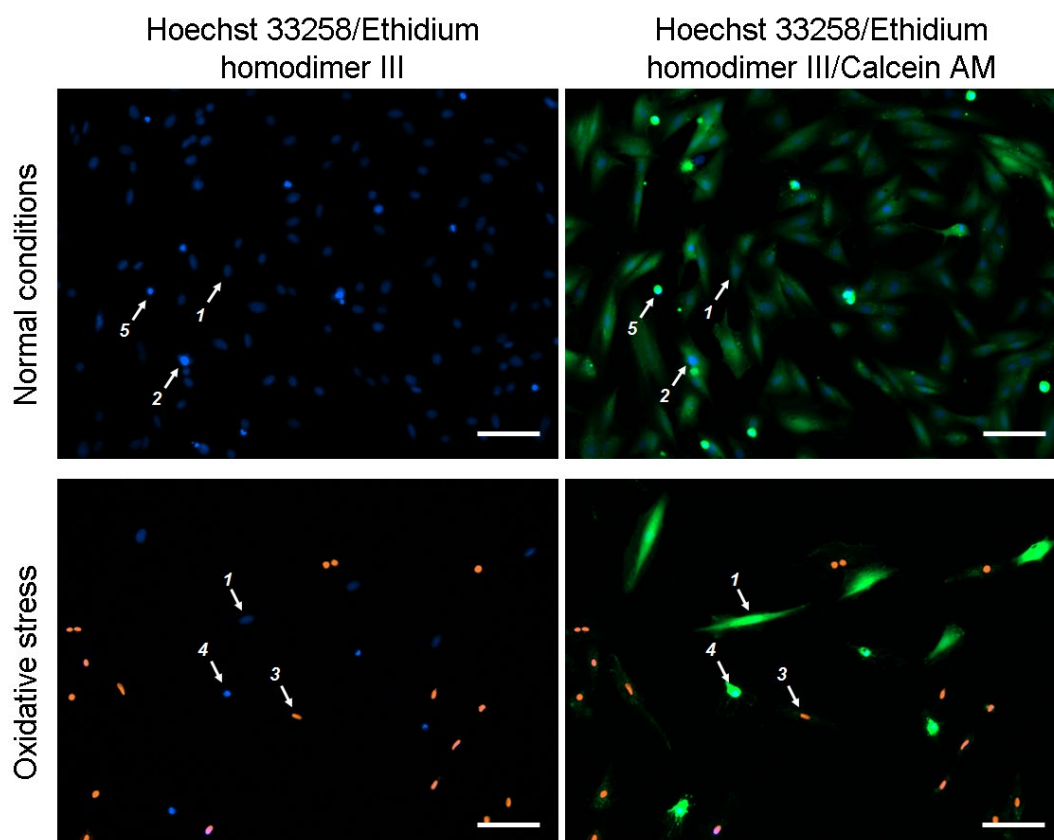


Рис. S3. Морфометрический анализ клеток в культуре недифференцированных клеток Н9с2. Клетки прижизненно окрашивали Хёхстом 33258 (синий цвет), Гомодимером этидия III (красный цвет) и Кальцеином АМ (зелёный цвет). Типичные варианты окрашивания клеток: 1 – живая клетка с нормальной морфологией, 2 – клетка с признаками апоптоза, 3 – клетка с признаками некроза, 4 – повреждённая клетка с измененной морфологией, 5 – открепляющаяся от подложки клетка. Длина масштабной планки соответствует 100 мкм

Сохранение ингибиторной активности производных гуанина при длительной инкубации. Дифференцированные клетки Н9с2 инкубировали с 7mGua, 8h7mGua и 3-AB в концентрации 300 мкМ в течение 1 ч или 24 ч, после чего анализировали остаточную активность PARP. Обнаружено, что ингибиторный эффект производных гуанина сохраняется при длительной инкубации (таблица S2).

Таблица S2. Влияние длительности инкубации дифференцированных клеток Н9с2 с 7mGua и 8h7mGua на PARP-ингибиторный эффект.

| Тестируемое вещество | Остаточная активность PARP, % | | p^* |
|----------------------|-------------------------------|----------------|-------|
| | Инкубация 1 ч | Инкубация 24 ч | |
| – | 100,0 ± 10,3 | 100,0 ± 15,4 | – |
| 7mGua (300 мкМ) | 17,9 ± 3,0 | 10,3 ± 0,4 | 0,008 |
| 8h7mGua (300 мкМ) | 7,1 ± 0,4 | 4,0 ± 1,7 | 0,013 |

| | | | |
|----------------|---------------|---------------|---|
| 3-AB (300 мкМ) | $3,8 \pm 0,5$ | $4,1 \pm 2,1$ | – |
|----------------|---------------|---------------|---|

* Значения p , полученные при сравнении остаточной активности PARP через 1 и 24 ч инкубации (t -тест Стьюдента).