

Ảnh hưởng của 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến tổng hợp cyclic adenosine monophosphate trong tế bào Leydig chuột dưới tác động của equine Chorionic Gonadotropin (eCG)

Effects of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol on eCG-stimulated cyclic adenosine monophosphate synthesis in mouse leydig cells

Nguyễn Thị Chí Hiếu^a, Nguyễn Bá Nghị^a, Đỗ Thu Hà^{b,c}, Nguyễn Thị Mộng Điệp^{d*}
Nguyen Thi Chi Hieu^a, Nguyen Ba Nghi^a, Do Thu Ha^{b,c}, Nguyen Thi Mong Diep^{d*}

^aKhoa Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Quang Trung, Việt Nam

^aFaculty of Applied Biology, Quang Trung University, Vietnam

^bTrung tâm Sinh học phân tử, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^bCenter for Molecular Biology, College of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

^cKhoa Dược, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

^cDepartment of Medicine, College of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, 550000, Da Nang, Vietnam

^dKhoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Quy Nhơn, Việt Nam

^dFaculty of Natural Sciences, Quy Nhon University, Vietnam

(Ngày nhận bài: 27/5/2021, ngày phản biện xong: 08/6/2021, ngày chấp nhận đăng: 13/10/2021)

Tóm tắt

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP, AMP vòng) là một chất truyền tin thứ hai quan trọng trong nhiều quá trình sinh học, là dẫn xuất của adenosine triphosphate (ATP) và được sử dụng để truyền tín hiệu nội bào ở nhiều sinh vật khác nhau, truyền tin theo con đường phụ thuộc vào cAMP. Trong nghiên cứu này, sự ảnh hưởng của hai chất ức chế adenylyl cyclase 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến biểu hiện của cAMP trong tế bào Leydig chuột mLTC-1 được kích hoạt bởi equine Chorionic Gonadotropin (eCG) được kiểm tra. Kết quả cho thấy, chất ức chế trực tiếp hoạt động của enzyme adenylyl cyclase, 2-hydroxyestradiol; 4-hydroxyestradiol, đã làm giảm tín hiệu cAMP nội bào và năng lượng ATP trong tế bào mLTC-1 nhưng không làm ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào.

Từ khóa: mLTC-1, cAMP, Adenylyl cyclase, 2-hydroxyestradiol; 4-hydroxyestradiol

Abstract

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP, cyclic AMP) is an important second messenger in many biological processes. It is a derivative of adenosine triphosphate (ATP) and is used to transmit intracellular signals in many different organisms, which depends on cAMP signaling pathway. In this study, the effect of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol on eCG-stimulated cyclic adenosine monophosphate synthesis in mouse leydig cells is tested. Results showed that the direct inhibitor of the adenylyl cyclase enzyme, 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol, reduced intracellular cAMP signal and ATP level in mLTC-1 cells but not cell viability

Keywords: mLTC-1, cAMP, Adenylyl cyclase, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol.

* Corresponding Author: Nguyen Thi Mong Diep; Faculty of Natural Sciences, Quy Nhon University, Vietnam.

Email: nguyenthimongdiep@qnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Adenylate cyclase (EC 4.6.1.1) hay còn gọi là enzyme adenylyl cyclase (hoặc adenylyl cyclase, AC) là enzyme đóng vai trò quan trọng trong chuỗi truyền tín hiệu từ bên ngoài tế bào vào trong tế bào chất. Khi nhận được tín hiệu truyền từ protein G (protein G nhận tín hiệu từ thụ thể), adenylyl cyclase sẽ thực hiện chức năng xúc tác quá trình chuyển hóa adenosine triphosphate (ATP) thành adenosine monophosphate mạch vòng (AMP vòng, cAMP) và pyrophosphate (PPi). Sản phẩm của adenylyl cyclase, AMP vòng, là một mắt xích quan trọng trong quá trình truyền tín hiệu nội bào, được xem như là chất truyền tín hiệu thứ hai trong tế bào [1].

Ở động vật có vú, hoạt động AC liên quan đến màng và được mã hóa bởi một họ adenylyl cyclase xuyên màng (tmACs), làm trung gian cho các phản ứng của tế bào với các kích thích ngoại bào. Chín gen tmAC riêng biệt khác nhau về kiểu biểu hiện và đặc tính điều hòa của chúng cho đến nay đã được xác định. Các tmACs này được nghiên cứu rộng rãi trong nhiều phòng thí nghiệm. Một dạng AC thứ hai ở động vật có vú được mô tả vào năm 1975 [2] và được dự đoán là khác biệt về mặt phân tử với tmACs [3,4]. Hoạt động này được cho là phụ thuộc vào Calcium và không nhạy với G-protein [5] và forskolin [6]. Hoạt động giống adenylyl cyclase hòa tan (sAC) liên kết với màng bị kích thích bởi natri bicarbonat [7-10]. Tuy nhiên, bản chất phân tử, quy định sinh hóa và chức năng sinh lý của sAC vẫn còn không rõ ràng cho đến khi enzyme sAC được tinh chế và nhân bản vào năm 1999 [11]. Các lĩnh vực xúc tác của sAC có liên quan đến AC cảm nhận bicarbonat từ vi khuẩn lam [11,12] cho thấy sự bảo tồn chức năng của các cyclase này như cảm biến bicarbonat trong suốt quá trình tiến hóa.

Dòng tế bào mLTC-1 từ chuột đã được thiết lập từ nhiều năm trước [13] và đã được rất

nhiều nhà nghiên cứu quan tâm nghiên cứu về sự liên kết giữa hCG với các thụ thể LHR [14,15] và sự sản sinh steroids hormone dưới sự kiểm soát của những hormone điều hòa tuyến sinh dục do thụ thể trước tuyến yên tiết ra [16]. Chúng ta biết rằng tế bào tinh hoàn Leydig có một lượng thụ thể khá thấp [17,18], và một con số cao hơn nhiều chắc chắn sẽ ảnh hưởng đến phương thức kích hoạt con đường cAMP bởi các hormone có hoạt động LH khác nhau và phương thức có thể được điều khiển bởi các con đường khác. Do vậy, chúng tôi đã chọn sử dụng những tế bào này cho nghiên cứu của mình.

2-hydroxy Estradiol (2-CE) và 4-Hydroxyestradiol (4-CE) là chất catechol estrogen và là dạng chuyển hóa của estrogen. 2-CE và 4-CE được hình thành từ estrogen bởi đồng dạng cytochrome P450. 2-CE và 4-CE đã được xác định là những chất ức chế hoạt động của enzyme adenylate cyclase [19].

Nghiên cứu gần đây nhất, chúng tôi đã thiết lập thành công một mô hình tế bào bằng cách chuyển nạp vector pGlosensor-TM-22F cyclic AMP plasmid đáp ứng luciferase vào dòng tế bào Leydig mLTC-1. Các tế bào mLTC-1 chuyển nạp 24 giờ trước khi sử dụng đã có biểu hiện cAMP đáp ứng luciferase với hệ số biến thiên dưới 10% [20]. Sau đó, sử dụng phát quang oxiluciferin như điểm kết thúc cho phép đo thời gian thực của việc sản xuất cAMP nội bào. Như vậy, với phương pháp thí nghiệm này có thể thực hiện nghiên cứu về sự tích lũy cAMP nội bào. Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ xác định sự ảnh hưởng của hai chất ức chế 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến hoạt động của adenylate cyclase thông qua biểu hiện về nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của eCG trong tế bào leydig mLTC-1.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Vật liệu: Dòng tế bào mLTC-1 từ chuột do Viện nghiên cứu nông nghiệp quốc gia

(INRAe) Pháp cung cấp được bảo quản và nuôi cấy tại Học viện Quân Y, Hà Nội.

Hóa chất: Tất cả các hóa chất được mua từ Sigma-Aldrich (Trung Quốc) trừ khi có ghi chú khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy tế bào: Tế bào mLTC-1 nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) có bổ sung huyết thanh bò 48 tiếng trước khi tra vào các giếng trên một đĩa nuôi cấy 96 giếng, khoảng 100.000 tế bào/giếng, sau đó mang ủ ở 37°C với 5% CO₂ trong vòng 24 tiếng.

Phương pháp xác định cAMP nội bào: cAMP nội bào tích lũy dưới tác động của hormone trong các tế bào mLTC-1 được đo bằng sự phát quang của oxiluciferin được sản xuất dưới tác dụng của luciferase phụ thuộc cAMP.

Tế bào mLTC-1 sau 24 tiếng nuôi cấy được transfected với Glosensor-TM-22F cyclic AMP plasmid, sử dụng chất vận chuyển XtremeGENETM-HP-DNA. Plasmid này bao gồm trình tự gen mã hóa luciferase của đom đóm dung hợp với vùng liên kết cAMP của gen mã hóa protein kinase A cho phép kiểm soát hoạt động enzyme bằng cAMP.

Sau đó dịch môi trường transfection được loại bỏ và thay thế bằng môi trường RPMI 1640 không có huyết thanh và chứa cơ chất của luciferase là luciferin có bổ sung IBMX. Tế bào sau đó được ủ ở 28°C trước khi kích thích bằng eCG bằng cách bổ sung vào trong giếng trước khi quan sát nồng độ cAMP bằng máy đo quang phổ huỳnh quang. Sau đó, các hormone ở các nồng độ khác nhau được thêm vào giếng (n = 3 mỗi liều) và đĩa ngay lập tức được đặt vào đầu đọc Polarstar OPTIMA (BMG labtech) phát hiện sự phát quang do các tế bào phát ra theo thời gian.

Xác định mức năng lượng ATP trong tế bào

Các tế bào mLTC-1 được tra vào đĩa nuôi cấy gồm 96 giếng với số lượng khoảng 100.000 tế bào/giếng. Sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, môi trường được thay thế bằng môi trường không có huyết thanh và có bổ sung 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol. Đĩa tế bào được ủ thêm 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trước khi thêm 50µl Cell-Titer-Glo 2.0 Assay Promega vào mỗi giếng. Sau đó đĩa tế bào được lắc đều với vận tốc nhẹ trong 10 phút trong tối và ủ thêm 2 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ghi lại sự phát quang của thuốc thử Cell-Titer-Glo 2.0. Giá trị cường độ phát quang thu được tương đương với giá trị nồng độ ATP trong tế bào sống.

Phương pháp đánh giá khả năng sống của tế bào mLTC-1: Các tế bào mLTC-1 được gieo vào đĩa 96 giếng với 100.000 tế bào/giếng. Hai ngày sau, môi trường được thay thế bằng môi trường không có huyết thanh và bổ sung 20µl CellTiter-Blue Reagent (Promega, Madison, WI, USA) đến từng giếng. Sau khi ủ trong 2 giờ ở 37°C, những thay đổi trong huỳnh quang đã được ghi lại bằng máy đo quang phổ Spectra Gemini (Sunnyvale, CA) ở bước sóng kích thích 560nm và bước sóng phát xạ là 640nm. Tín hiệu huỳnh quang từ thuốc thử CellTiter-Blue tỷ lệ thuận với số lượng tế bào sống.

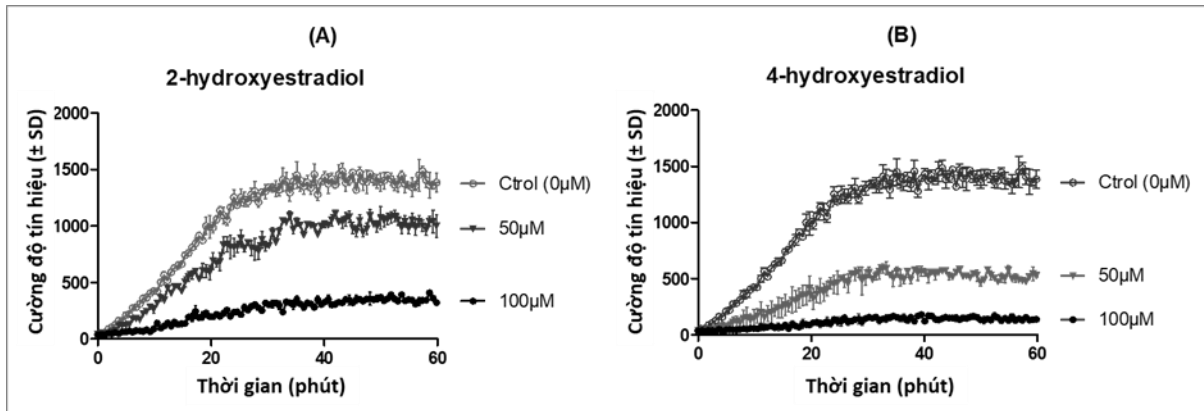
Phương pháp xử lý số liệu: Trong mỗi thí nghiệm, 3 lần lặp lại được thực hiện và giá trị trung bình cũng như sai số chuẩn của giá trị trung bình (SD) được xác định. Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm Graphpad Prism.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của eCG

Trong thí nghiệm này chúng tôi thử nghiệm 2-hydroxyestradiol (2-CE) và 4-hydroxyestradiol (4-CE) ở hai nồng độ khác nhau 50 và 100 μ M và ủ với tế bào mLTC-1 60 phút trước khi bổ sung cơ chất luciferase để đo

tín hiệu huỳnh quang phát ra từ cAMP; thời gian đo tín hiệu cAMP nội bào kéo dài 60 phút (đây cũng là thời gian kích thích tế bào của eCG). Kết quả được trình bày ở hình 3.1.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của eCG. Lượng hormone eCG được tra vào mỗi giếng trên đĩa 96 giếng là giống nhau 10 μ l, mỗi nồng độ đều lặp lại 3 lần. Số liệu trình bày ở biểu đồ là giá trị trung bình về cường độ tín hiệu biểu hiện của cAMP ở cả 3 lần.

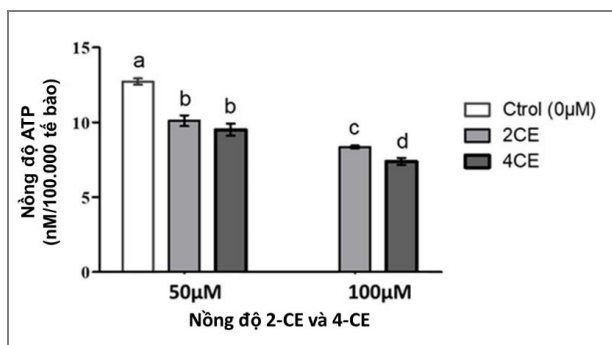
Các estrogens catechol là chất chuyển hóa steroid tạo ra các phản ứng sinh lý thông qua việc liên kết với nhiều loại mục tiêu tế bào. Estrogen catechol được biết đến như là chất ức chế trực tiếp các adenylyl cyclase hòa tan và các adenylyl cyclase xuyên màng dôi dào [21]. 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol là hai chất ức chế trực tiếp các adenylyl cyclase hòa tan nằm trong nhóm estrogens catechol [21].

Kết quả của chúng tôi ở hình 3.1 cho thấy có sự khác biệt về biểu hiện của cAMP khi ủ tế bào mLTC-1 với 2-CE và 4-CE. Cường độ tín hiệu cAMP nội bào dưới kích thích của eCG bị giảm dưới tác động ức chế của 2-CE và 4-CE và phụ thuộc vào nồng độ. Tại nồng độ 100 μ M 4CE, tín hiệu cAMP bị ức chế hoàn toàn. Kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả Regigborn và *cs.* (2005) đã cho kết luận rằng 2-CE và 4-CE ức chế trực tiếp hoạt động của enzyme adenylyl cyclase hòa tan và các adenylyl cyclase xuyên màng [21]. 2-CE và 4-CE đều ngăn chặn sự tích tụ cAMP trong tế bào 4-4 được chuyển nạp ổn định sAC. Đây là

những tế bào thận phôi người (HEK293) được truyền plasmid có chứa sAC tcDNA [22] và được đặt dưới áp lực chọn lọc với gentamicin [19]. Như vậy kết quả của chúng tôi đã cho thấy sự suy giảm nồng độ cAMP trong tế bào leydig mLTC-1 được gây ra bởi 2-CE và 4-CE là có liên quan đến sự ức chế hoạt động của enzyme adenylyl cyclase.

3.2. Ảnh hưởng của 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến nồng độ ATP trong tế bào mLTC-1.

Vì adenylyl cyclase có hằng số liên kết đối với cơ chất của nó là ATP, do vậy việc giảm năng lượng ATP trong tế bào có thể là một phần của cơ chế hoạt động của các chất ức chế adenylyl cyclase và tiềm năng của các hợp chất này để nghiên cứu các kết quả sinh lý của việc ức chế adenylyl cyclase có thể bị cản trở nghiêm trọng bởi điều này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục đánh giá tác động của hai chất ức chế 2-CE và 4-CE đối với năng lượng ATP trong tế bào. Kết quả được thể hiện ở hình 3.2.



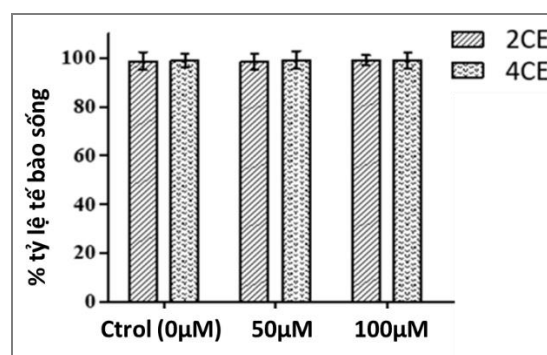
Hình 3.2. Ảnh hưởng của 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol đến nồng độ ATP trong tế bào mLTC-1. Số liệu trình bày ở biểu đồ là giá trị trung bình về cường độ tín hiệu ATP ở cả 3 lần thí nghiệm độc lập. Những chữ số khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa đối chứng (Ctrl, không bổ sung 2CE, 4CE) và chất thí nghiệm 2-CE, 4-CE.

Kết quả thí nghiệm của chúng tôi cho thấy 2-CE và 4-CE đã làm suy giảm nồng độ năng lượng ATP trong tế bào so với đối chứng không bổ sung 2-CE hoặc 4-CE. Sự suy giảm này có ý nghĩa thống kê với $P < 0.05$. 4-CE cho hiệu quả ức chế mạnh hơn 2-CE tại nồng độ 100µM ($P < 0.05$). Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả trình bày ở trên, tại nồng độ 100µM 4CE, tín hiệu cAMP bị ức chế hoàn toàn (Hình 3.1). Một nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng estrogens catechol chủ yếu hoạt động bằng cách giảm hô hấp của ty thể dẫn đến hạn chế sản xuất ATP của ty thể và ảnh hưởng đến chuyển hóa năng lượng. Những phát hiện này đã được chứng thực bằng cách điều tra sự chuyển hóa năng lượng trong các lát não cấp tính của chuột [23]. Như vậy chúng tôi nghi ngờ rằng sự suy giảm nồng độ cAMP nội bào dưới tác động của 2-CE và 4-CE một phần là do sự suy giảm nồng độ ATP do tác dụng phụ của chúng trong tế bào. Do vậy chúng ta nên cẩn thận trọng khi sử dụng hai hợp chất này để nghiên cứu vai trò sinh lý của adenylyl cyclase hoặc để xác nhận adenylyl cyclase như một mục tiêu thuốc.

3.3. Đánh giá tỷ lệ sống của tế bào mLTC-1 trong mỗi giếng sau khi ủ với 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol.

Để đảm bảo độ tin cậy cho kết quả của những thí nghiệm, chúng tôi cũng đã tiến hành kiểm tra tỷ lệ sống của tế bào mLTC-1 trong các giếng trên đĩa 96 giếng, vì cường độ tín hiệu cAMP nội bào đo được sau 60 phút ức chế bởi 2-CE và 4-CE là phụ thuộc rất nhiều vào tỷ lệ sống của tế bào.

Trong tất cả các thí nghiệm của chúng tôi, tại mỗi giếng đều được tra một tỷ lệ tế bào là như nhau, 100.000 tế bào/giếng. Kết quả kiểm tra tỷ lệ sống của tế bào mLTC-1 được thể hiện tại hình 3.3.



Hình 3.3. Tỷ lệ sống của tế bào trong mỗi giếng sau khi kích hoạt với hormone eCG.

Kết quả thí nghiệm cho thấy việc ủ tế bào với 2-CE và 4-CE không làm ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào. Như vậy kết quả đo cường độ tín hiệu cAMP nội bào trong các thí nghiệm trên là có độ chính xác cao.

4. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cường độ tín hiệu cAMP nội bào dưới kích thích của eCG trong tế bào mLTC-1 bị suy giảm bởi chất ức chế hoạt động của enzyme adenylyl cyclase là 2-hydroxyestradiol và 4-hydroxyestradiol nhưng không làm thay đổi tỷ lệ sống của tế bào. Tuy nhiên sự suy giảm này một phần là do giảm năng lượng ATP trong tế bào.

Tài liệu tham khảo

- [1] McKnight GS (1991), *Cyclic AMP second messenger systems*, Current Opinion in Cell Biology, 3, 213–217.
- [2] Braun T, Dods RF (1975), *Development of a Mn²⁺-sensitive, 'soluble' adenylate cyclase in rat testis*, Proc Natl Acad Sci USA, 72, 1097–1101.
- [3] Braun T (1991), *Purification of soluble form of adenylyl cyclase from testes*, Methods Enzymol, 195, 130–136.
- [4] Neer EJ (1978), *Physical and functional properties of adenylate cyclase from mature rat testis*, J Biol Chem, 253, 5808–5812.
- [5] Braun T, Frank H, Dods R *et al.* (1977), *Mn²⁺-sensitive, soluble adenylate cyclase in rat testis. Differentiation from other testicular nucleotide cyclases*, Biochim Biophys Acta, 481, 227–235.
- [6] Forte LR, Bylund DB, Zahler WL (1983), *Forskolin does not activate sperm adenylate cyclase*, Mol Pharmacol, 24, 42–47.
- [7] Garbers DL, Tubb DJ, Hyne RV (1982), *A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa*, J Biol Chem, 257, 8980–8984.
- [8] Garty NB, Salomon Y (1987), *Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate*, FEBS Lett, 218, 148–152.
- [9] Okamura N, Tajima Y, Soejima A *et al.* (1985), *Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase*, J Biol Chem, 260, 9699–9705.
- [10] Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM *et al.* (1990), *Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa*, Biochim Biophys Acta, 1054, 231–236.
- [11] Buck J, Sinclair ML, Schapal L *et al.* (1999), *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 79–84.
- [12] Chen Y, Cann MJ, Litvin TN *et al.* (2000), *Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor*, Science, 289, 625–628.
- [13] Rebois RV (1982), *Establishment of gonadotropin-responsive murine leydig tumor cell line*, The Journal of Cell Biology, 94, 70-76.
- [14] Rebois RV, Fishman PH (1983), *Deglycosylated human chorionic gonadotropin. An antagonist to desensitization and down-regulation of the gonadotropin receptor-adenylate cyclase system*, Journal of Biological Chemistry, 258, 12775-12778.
- [15] Rebois RV (1984) Fishman PH. *Down-regulation of gonadotropin receptors in a murine Leydig tumor cell line*, Journal of Biological Chemistry, 259, 3096-3101.
- [16] Abdou HS, Bergeron F, Tremblay JJ (2014), *A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis*, Molecular and Cellular Biology, 34, 4257-4271.
- [17] Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T (1972), *Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 34, 123-132.
- [18] Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T (1971), *Studies on a radioligand-receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin*, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 32, 860-863.
- [19] Bitterman JL, Ramos-Espiritu L, Diaz A, *et al.* (2013), *Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases*, J. Pharmacol. Exp. Ther., , 347, 589-598.
- [20] Klett D, Meslin P, Relav L, *et al.* (2016) *Low reversibility of intracellular cAMP accumulation in mouse Leydig tumor cells (mLTC-1) stimulated by human Luteinizing Hormone (hLH) and Chorionic Gonadotropin (hCG)*, Molecular and Cellular Endocrinology, 434, 144-153.
- [21] Steegborn C, Litvin TN, Hess KC, *et al.* (2005), *A novel mechanism for adenylyl cyclase inhibition from the crystal structure of its complex with catechol estrogen*, J. Biol. Chem, 280, 31754-31759.
- [22] Buck J, Sinclair ML, Schapal L, *et al.* (1999), *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 79-84.
- [23] Jakobsen E, Lange SC, Andersen JV, *et al.* (2018), *The inhibitors of soluble adenylate cyclase 2-OHE, KH7, and bithionol compromise mitochondrial ATP production by distinct mechanisms*, Biochem. Pharmacol, 155, 92-101.