

Ảnh hưởng của Fluoxetine đến hoạt động của enzyme adenylate cyclase và mối quan hệ với con đường tín hiệu AMPK trong tế bào Leydig mLTC-1

Effect of Fluoxetine on the LH-stimulated adenylate cyclase activity in MLTC Leydig cells linked with the AMP activated protein kinase pathway

Nguyễn Thị Tho^a, Đỗ Thu Hà^{b,c}, Nguyễn Thị Mộng Điệp^{d*}
Nguyen Thi Tho^a, Do Thu Ha^{b,c}, Nguyen Thi Mong Diep^{d*}

^aKhoa Giáo dục Tiểu học và Mầm non, Trường Đại học Quy Nhơn, Việt Nam

^aDepartment of Primary and Preschool Education, Quy Nhon 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: 20/9/2021, ngày phản biện xong: 8/11/2021, ngày chấp nhận đăng: 06/12/2021)

Tóm tắt

Protein AMPK (5'-AMP activated protein kinase) được biết đến là protein chính tham gia điều chỉnh quá trình chuyển hóa năng lượng nội bào và cân bằng năng lượng. Những khám phá gần đây đã chỉ ra rằng AMPK cũng đóng một vai trò trong sinh sản nam và sản xuất hormone steroid. Fluoxetine (FLX), một loại thuốc chống trầm cảm được sử dụng rộng rãi chủ yếu hoạt động như một chất ức chế tái hấp thu serotonin có chọn lọc (SSRI) trong hệ thần kinh trung ương, đã được chứng minh là thể hiện các cơ chế hoạt động khác ở nhiều loại tế bào khác. Do đó, nó có thể có những tác dụng phụ không mong muốn, không liên quan đến mục đích sử dụng của nó, có thể trong việc điều hòa nội tiết sinh sản. Chúng tôi cho thấy trong bài báo này sau 1 giờ nuôi cấy tế bào Leydig mLTC-1 với FLX, phản ứng của adenosine monophosphate vòng (cAMP) đối với Luteinizing Hormone (LH) bị giảm xuống. Nồng độ ATP giảm đi kèm theo hiệu ứng này, cho thấy sự kích thích hoạt động của protein AMPK. Một kết quả tương tự cũng đã được tìm thấy khi sử dụng metformin (MET) chất kích hoạt gián tiếp AMPK. Kết luận, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy FLX làm giảm sự tích tụ cAMP thông qua hoạt hóa AMPK trong các tế bào mLTC-1 và do đó ức chế sự hình thành steroid do LH trong các tế bào này.

Từ khóa: mLTC-1; cAMP; Adenylyl cyclase; AMPK; Fluoxetine; Metformin.

Abstract

5'-AMP activated protein kinase (AMPK) is a known key sensor and regulator of intracellular energy metabolism and energy balance. Recent discoveries have shown that AMPK also plays a role in male reproduction and steroid hormone production. Fluoxetine (FLX), a widely used antidepressant primarily acting as a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) in central nervous system, has been shown to exhibit other mechanisms of action in various other cell types. Consequently, it might have unexpected adverse effects not related to its intended use, possibly in the endocrine regulation of reproduction. In this context, we show in the present report that after a 1-hour preincubation of mLTC-1 Leydig cells with FLX, the intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responses to Luteinizing Hormone (LH) is reduced. A drop in ATP concentration accompanies this effect, suggesting the stimulation of 5'-AMP activated

protein kinase activity. A similar result has also been found with the indirect AMPK activator, metformin (MET). In conclusion, our study shows that FLX diminished cAMP accumulation through AMPK activation in mLTC-1 cells and consequently inhibited LH-induced steroidogenesis in these cells.

Keywords: mLTC-1; cAMP; Adenylyl cyclase; AMPK; Fluoxetine; Metformin

1. Đặt vấn đề

Protein AMPK (5'-AMP activated protein kinase) là protein kinase hoạt động như một cảm biến về năng lượng trong tế bào. Sự hoạt hóa AMPK kích thích các con đường dị hóa sản xuất năng lượng ATP (Adenosine triphosphate) và đồng thời ức chế các con đường đồng hóa tiêu thụ năng lượng ATP, do đó điều chỉnh sự cân bằng năng lượng tế bào [1-2]. AMPK là một protein dị phân tử bao gồm một tiểu đơn vị xúc tác α và hai tiểu đơn vị điều hòa, β và γ , với sự khác nhau về loài và đồng dạng đặc trưng cho mô. Vì sự hoạt hóa AMPK kích thích các con đường dị hóa sản xuất ATP và đồng thời ức chế các con đường đồng hóa tiêu thụ ATP [1-2], nên nghiên cứu tác động có thể có của Fluoxetine (FLX) đối với các phản ứng của tế bào thông qua hoạt hóa AMPK là rất cần thiết. Thật vậy, nồng độ testosterone tăng cao ở chuột KO α 1AMPK-/- là do tế bào Leydig hoạt động yếu [3] cho thấy tác dụng ức chế của AMPK đối với quá trình sản sinh hormone steroid trong cơ thể. Hơn nữa, hoạt động của AMPK ức chế sự tạo thành steroid theo chu kỳ do cAMP trong các dòng tế bào Leydig (tế bào MA-10 và mLTC-1) bằng cách cản trở sự biểu hiện của các chất điều hòa quá trình sản sinh steroid như chất mang cholesterol, StAR và thụ thể hạt nhân Nr4a1 đã được báo cáo [4].

Là một chất chống trầm cảm ức chế tái hấp thu serotonin có chọn lọc (SSRI), FLX có thể được sử dụng để giảm trầm cảm [5], nhưng nó cũng ức chế các kênh ion khác nhau [6-10] cũng như chuỗi hô hấp trong ti thể [7]. FLX có thể cải thiện trí nhớ và chức năng nhận thức [5]. FLX đã được chứng minh là có thể ức chế sản xuất β -amyloid và ngăn chặn sự thoái hóa tế bào thần kinh trên mô hình chuột APP/PS1

[11]. Hơn nữa, Li et al. (2004) đã chỉ ra rằng FLX có thể tăng cường đáng kể quá trình phosphoryl hóa GSK3 β [12]. Pilar-Cuellar et al. (2012) đã tiết lộ rằng FLX có thể làm tăng mức β -catenin [13]. Do đó, dự kiến sẽ làm giảm sản xuất ATP và kích thích hoạt động của protein AMPK.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát ảnh hưởng của FLX đến hoạt động của enzyme adenylate cyclase dưới tác động kích thích của hLH trong tế bào Leydig mLTC-1 và tìm hiểu mối liên kết với protein AMPK, để có được cái nhìn chính xác hơn về cơ chế hoạt động của FLX trong tế bào Leydig.

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 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 [14].

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 với FLX và MET ở 28°C 1 giờ trước khi kích thích bằng hLH. Nồng độ cAMP được xác định bằng máy đo quang phổ huỳnh quang đầu đọc Polarstar OPTIMA (BMG labtech) [14].

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 FLX và MET. 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 [14].

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 có bổ sung FLX và MET. Sau đó ủ 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trước khi 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 [14].

Phương pháp Western-Blotting

Protein tổng số được chiết xuất từ các tế bào mLTC-1 trong dung dịch đệm ly giải. Protein sau đó được điện di với gel SDS-PAGE 10% và lai qua màng nitrocellulose. Sau đó, màng được ủ với kháng thể sơ cấp AMPK α (62kDa) và phospho-Thr172-AMPK α (62kDa), kháng thể được pha loãng trong BSA 5% (độ pha loãng cuối cùng 1: 1000), ủ qua đêm ở 4°C. Sau đó, các màng này được tiếp tục ủ 1 giờ trong kháng thể thứ cấp IgG thỏ (H + L) (CF™ 770 Conjugate) (độ pha loãng cuối cùng 1: 2000). Cường độ tín hiệu bằng protein được phân tích bằng máy Odyssey, phiên bản 1.2 (LICOR Biosciences, Lincoln, Hoa Kỳ) [14].

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 Fluoxetine và Metformin đến nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của hLH

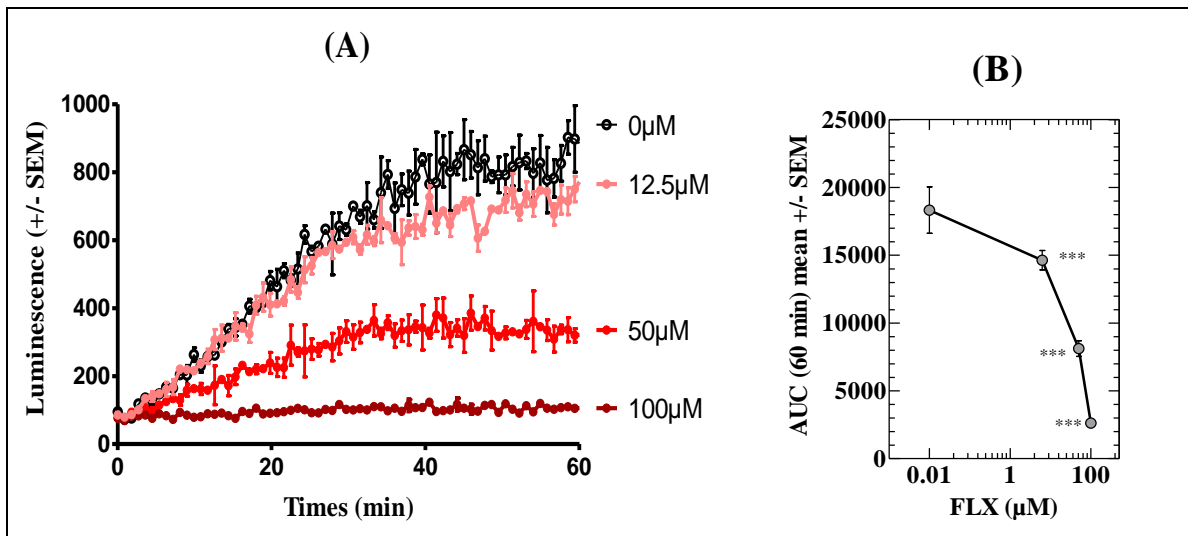
AMPK là protein tham gia chính trong con đường điều hòa cân bằng năng lượng tế bào, có liên quan đến việc điều hòa axit béo, tổng hợp cholesterol [15], và nhiều con đường đồng hóa khác [16-17]. Biểu hiện AMPK trong tuyến sinh dục đã được chứng minh rõ ràng [18-20]. AMPK có trong nhiều tế bào sinh dục như tế bào hạt, tế bào theca, tế bào trứng và tế bào hoàng thể, tế bào Sertoli, Leydig và tế bào mầm của nhiều loài [21].

Protein AMPK đã tham gia vào quá trình hình thành steroid tuyến sinh dục, trưởng thành tế bào mầm, tăng sinh và tồn tại tế bào, phân cực, hình thành và duy trì các phức hợp nối tế bào và động lực học của tế bào. Sự hoạt hóa AMPK được kích hoạt bởi sự thay đổi cấu trúc do AMP gây ra, cho phép phosphoryl hóa threonine 172 của tiểu đơn vị xúc tác α bởi những protein kinase như Liver kinase B1 (LKB1) hoặc Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMKK) [16].

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng FLX và MET (chất kích hoạt gián tiếp protein AMPK) đã làm tăng quá trình phosphoryl hóa

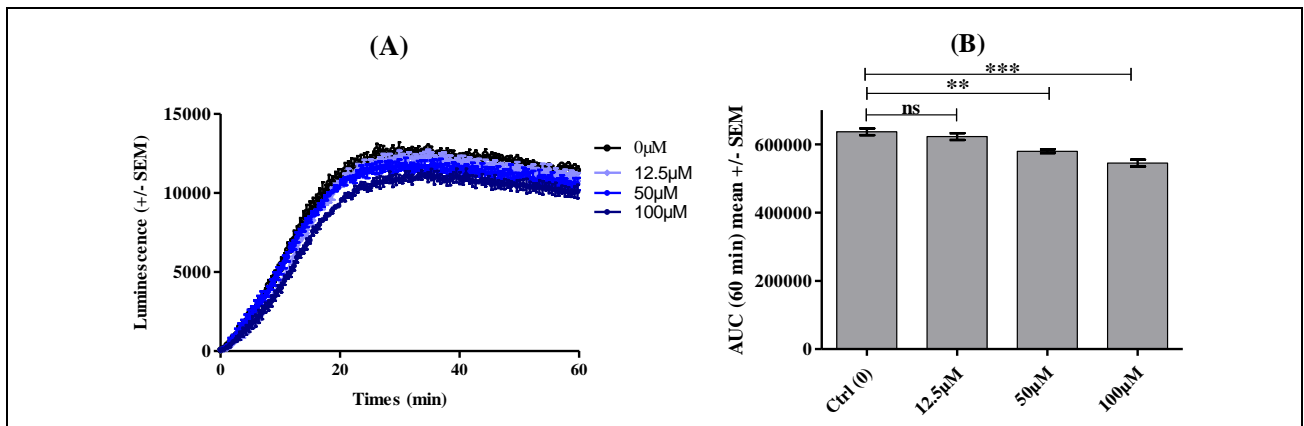
AMPK và giảm sự tích tụ cAMP dưới sự kích thích của hormone human Luteinizing Hormone (hLH), cũng như phản ứng tổng hợp progesterone dưới kích thích bởi hLH trong dòng tế bào mLTC-1.

Thật vậy, Hình 3.1 cho thấy động học huỳnh quang oxiluciferin phụ thuộc cAMP được kích thích bởi hLH giảm đáng kể bởi FLX phụ thuộc vào liều lượng. Sự ức chế gần như hoàn toàn được quan sát thấy sau 1 giờ ủ với nồng độ 100 μ M FLX (Hình 1a). Hơn nữa, chúng tôi cũng nhận được một kết quả tương tự đối với MET, một chất kích hoạt gián tiếp của AMPK (Hình 3.2).



Hình 3.1. Ảnh hưởng của Fluoxetine và Metformin đến nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của hLH. Lượng hormone hLH 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.

*** ($P < 0.001$): Có ý nghĩa thống kê khi so sánh mẫu đối chứng (0 μ M) và mẫu thí nghiệm có FLX.



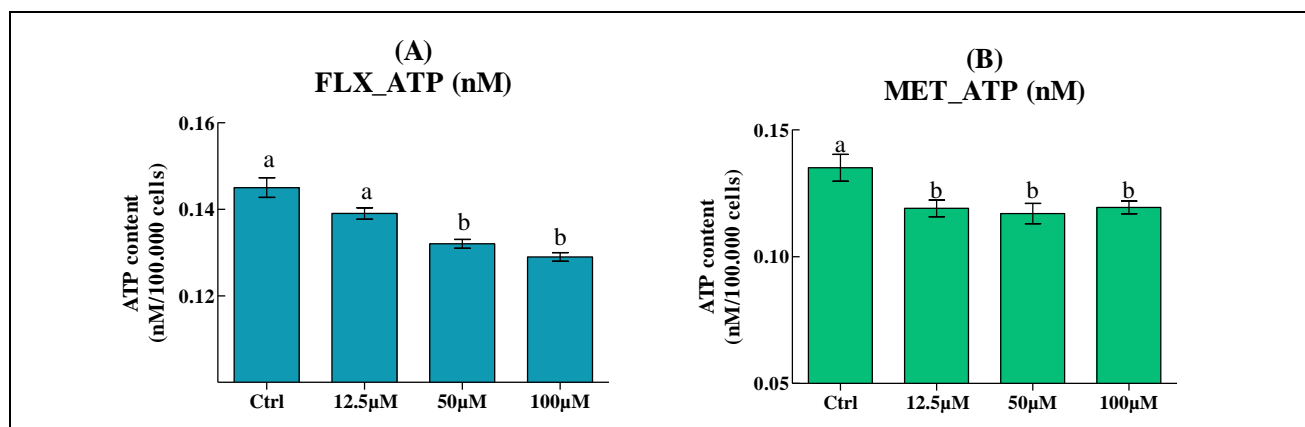
Hình 3.2. Ảnh hưởng của Metformin đến nồng độ cAMP nội bào dưới tác động kích thích của hLH. Lượng hormone hLH được tra vào mỗi giếng trên đĩa 96 giếng là giống nhau 10 μ l, mỗi nồng độ đều lặp lại 3 lần. Số liệu trình bày ở biểu đồ là giá trị trung bình về cường độ tín hiệu biểu hiện của cAMP ở cả 3 lần. *** ($P < 0.001$); ** ($P < 0.01$): Có ý nghĩa thống kê khi so sánh mẫu đối chứng (0 μ M) và mẫu thí nghiệm có FLX. ns: Không có ý nghĩa thống kê ($P > 0.05$).

3.2. Ảnh hưởng của Fluoxetine và Metformin đến nồng độ ATP trong tế bào mLTC-1

Để hiểu chính xác hơn cơ chế hoạt động của FLX và MET trong tế bào mLTC-1, chúng tôi quyết định nghiên cứu ảnh hưởng của nó đến nồng độ ATP nội bào cũng như sự tồn tại của tế bào. Kết quả của chúng tôi cho thấy trong các tế bào mLTC-1, FLX gây ra sự giảm nồng độ ATP trong tế bào phụ thuộc vào liều lượng sau 60 phút ủ (Hình 3.3a). Một kết quả tương tự cũng được tìm thấy đối với MET (Hình 3.3b). Điều thú vị là không có tác dụng nào của FLX hoặc MET đối với sự sống sót của tế bào mLTC-1 sau 1 giờ (dữ liệu không hiển thị). Do đó, dữ liệu trên cho thấy rằng sự suy giảm nồng độ cAMP nội bào dưới tác động của FLX và MET có thể phần lớn liên quan đến việc giảm

năng lượng ATP nhưng không ảnh hưởng đến khả năng sống của tế bào. Điều này không nằm ngoài dự đoán vì ATP là cơ chất để enzyme adenylate cyclase tổng hợp cAMP.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng FLX ảnh hưởng gián tiếp đến vận chuyển điện tử và hoạt động (F1F0)-ATPase, do đó ức chế quá trình phosphoryl hóa oxy hóa trong ty thể, dẫn đến giảm ATP [22]. Bên cạnh đó, MET là biguanide, dẫn xuất tổng hợp của guanidine, hiện nay là thuốc được lựa chọn đầu tiên để điều trị bệnh tiểu đường loại 2. Là một cation, MET tích tụ trong ty thể làm thay đổi điện thế của màng trong ty thể và ức chế hoạt động của phức hợp I trong chuỗi vận chuyển điện tử trong ty thể, dẫn đến giảm năng lượng ATP [23].

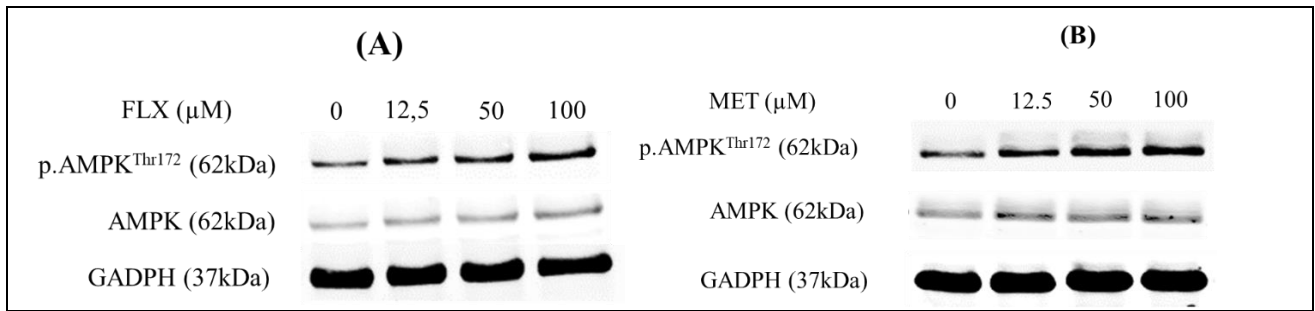


Hình 3.3. Ảnh hưởng của Fluoxetine và Metformin đến nồng độ ATP trong tế bào mLTC-1. Số liệu trình bày ở biểu đồ là giá trị trung bình về cường độ tín hiệu ATP ở cả 3 lần thí nghiệm độc lập. Những chữ số khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa đối chứng (Ctrl, không bổ sung FLX, MET) và chất thí nghiệm FLX, MET.

3.3. Ảnh hưởng của Fluoxetine và Metformin đến mức độ phosphoryl hóa protein AMPK, nồng độ progesterone trong tế bào mLTC-1

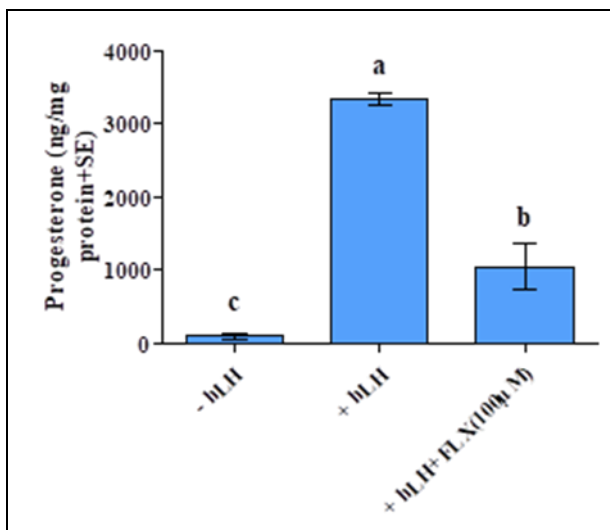
Protein AMPK được biết là được kích hoạt bằng cách tăng tỷ lệ AMP/ATP nội bào, do vậy chúng tôi đã theo dõi mức độ phosphoryl hóa AMPK trong các tế bào mLTC-1 với sự

hiện diện của FLX hoặc MET. Hình 3.4 cho thấy FLX hoặc MET thực sự kích thích quá trình phosphoryl hóa protein AMPK. Đây là bằng chứng ủng hộ tác động của FLX đối với phản ứng của cAMP dưới tác động kích thích của LH trong mLTC-1 thông qua cơ chế phụ thuộc AMPK.



Hình 3.4. FLX hoặc MET tăng cường quá trình phosphoryl hóa AMPK trong tế bào Leydig MLTC-1

Ngoài ra, chúng tôi cũng quan sát thấy rằng sự gia tăng sản xuất progesterone bởi hLH trong các tế bào mLTC-1 bị ức chế khi có sự hiện diện của FLX (Hình 3.5). Dựa trên kết quả này, chúng tôi đề xuất một mô hình với vai trò trung tâm của protein AMPK trong việc tham gia ức chế sản sinh cAMP nội bào thông qua hoạt động của enzyme adenylate cyclase để đáp ứng với FLX và MET, dẫn đến ức chế sự hình thành steroid trong các tế bào mLTC-1. Trong mô hình này, cả MET và FLX đều kích hoạt protein AMPK một cách gián tiếp, có thể bằng cách giảm mức năng lượng tế bào thông qua sự ức chế hô hấp của ty thể, do đó dẫn đến tăng tỷ lệ $(AMP+ADP)/ATP$, do đó, sự kích hoạt protein AMPK làm giảm tổng hợp cAMP bởi enzyme adenylate cyclase dưới sự kích thích của hLH.



Hình 3.5. FLX ức chế nồng độ progesterone dưới kích thích của hormone hLH trong tế bào Leydig mLTC-1

4. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy Fluoxetine và Metformin đã làm giảm cường độ tín hiệu cAMP nội bào dưới kích thích của hLH trong tế bào mLTC-1. Tuy nhiên sự suy giảm này một phần là do giảm năng lượng ATP trong tế bào và có liên quan đến hoạt động của protein AMPK. Fluoxetine và Metformin cũng đã làm giảm sản xuất progesterone trong tế bào mLTC-1.

Như vậy nghiên cứu của chúng tôi đã cho biết cơ chế hoạt động của Fluoxetine có liên quan đến con đường tín hiệu AMPK. Kết quả của chúng tôi cung cấp thêm bằng chứng về cơ chế sản sinh hormone steroid có thể bị suy giảm ở bệnh nhân trầm cảm được điều trị bằng Fluoxetine hoặc ở bệnh nhân tiểu đường được điều trị bằng Metformin.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hardie DG, Hawley SA (2001), *AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited*, Bioessays, 23, 1112-1119.
- [2] Hardie DG, Scott JW, Pan DA *et al.* (2003), *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*, FEBS Lett, 546, 113-120.
- [3] Tartarin P, Guibert E, Toure A, *et al.* (2012), *Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology*, Endocrinology, 153, 3468-3481.
- [4] Abdou HS, Bergeron F, Tremblay JJ (2014), *A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis*, Mol Cell Biol, 34, 4257-4271.
- [5] Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995), *Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective*

serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication, Life Sci, 57, 411-441.

- [6] Deak F, Lasztozci B, Pacher P *et al.* (2000) *Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells* Neuropharmacology, 39, 1029-1036.
- [7] Dong YY, Pike AC, Mackenzie A *et al.* (2015), *K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac*, Science, 347: 1256-1259.
- [8] Nahon E, Israelson A, Abu-Hamad S, *et al.* (2005) *Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death*, FEBS Lett, 579, 5105-5110.
- [9] Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK *et al.* (1998) *Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs*, J Pharmacol Exp Ther, 284, 208-214.
- Theriault O, Poulin H, Beaulieu JM *et al.* (2015), *Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 channels by antidepressant drugs*, Eur J Pharmacol, 764, 395-403.
- [10] Charles E, Hammadi M, Kischel P *et al.* (2017) *The antidepressant fluoxetine induces necrosis by energy depletion and mitochondrial calcium overload*, Oncotarget, 8, 3181-3196.
- [11] Wang J, Zhang Y, Xu H, *et al.* (2014) *Fluoxetine improves behavioral performance by suppressing the production of soluble β -amyloid in APP/PS1 mice*, Curr. Alzheimer Res, 11, 5672-5680.
- [12] Li X, Zhu W, Roh MS *et al.* (2004) *In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) by serotonergic activity in mouse brain*, Neuropsychopharmacology, 29, 1426-1431.
- [13] Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A (2012) *Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, beta-catenin and antidepressant-like effects*, Br. J. Pharmacol, 165, 1046-1057.
- [14] Nguyen TMD, Klett D, Filliatreau L *et al.* (2019) *Inhibition by fluoxetine of LH-stimulated cyclic AMP synthesis in tumor Leydig cells partly involves AMPK activation*, PLoS One, 14, e0217519.
- [15] Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987) *A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis*, FEBS Lett, 223, 217-22.
- [16] Kim J, Yang G, Kim Y, *et al.* (2016) *AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities*, Exp Mol Med, 48, e224.
- [17] Viollet B, Horman S, Leclerc J *et al.* (2010) *Andreelli, AMPK inhibition in health and disease*, Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 45: 276-295.
- [18] Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I *et al.* (2009), *Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro*, Journal of applied toxicology, 29, 673-680.
- [19] Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S *et al.* (2007), *Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK)*, Biol Reprod, 76, 368-378.
- [20] Tosca L, Crochet S, Ferre P *et al.* (2006), *AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles*, J Endocrinol, 190, 85-97.
- [21] Nguyen TM (2017), *Impact of 5'-amp-activated Protein Kinase on Male Gonad and Spermatozoa Functions*, Front Cell Dev Biol, 5, 25.
- [22] Curti C, Mingatto FE, Polizello AC *et al.* (1999), *Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity*, Mol Cell Biochem, 199, 103-109.
- [23] Owen MR, Doran E, Halestrap AP (2000), *Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain*, Biochem, 348, 607-614.