

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПАЗА D-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ИНСУЛИНА В НЕОКОРТЕКСЕ КРЫС

Поступила 05.12.12

Инсулин участвует в обеспечении нормального функционирования ЦНС; фосфолипаза D является неотъемлемой частью сигнального каскада этого гормона. С возрастом происходят изменения липидного спектра клеточных мембран, что влечет за собой нарушение работы различных сигнальных путей, в том числе пути инсулина. В настоящей работе установлено, что содержание керамидов и свободных жирных кислот в неокортексе старых (24-месячных) крыс заметно выше, чем у 3-месячных животных. В данных условиях способность инсулина активировать фосфолипазу D резко снижается. Инкубация ткани неокортекса молодых животных в присутствии экзогенного С2-керамида или пальмитиновой кислоты (предшественника сфинголипидов) приводит к увеличению содержания эндогенных керамидов. Этот процесс сопровождается подавлением стимулированного инсулином образования фосфатидилэтанола (продукта реакции трансфосфатидилирования этанола фосфолипазой D). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе старения активность фосфолипазы D-зависимого звена сигнального каскада инсулина в неокортексе существенно ослабляется; важную роль в данном процессе играет керамид.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, неокортекс, диафрагма, инсулин, фосфолипаза D, керамид.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время показано, что инсулин оказывает модулирующее воздействие на рост нейронов и глиальных клеток ЦНС, их выживание, дифференцирование, миграцию, экспрессию генов в этих клетках, синтез белка, сборку цитоскелета и формирование межнейронных синапсов [1]. Инсулин синтезируется β -клетками поджелудочной железы и транспортируется с цереброспинальной жидкостью в мозг [2], где пересекает гемато-энцефалический барьер; транспорт осуществляется главным образом посредством собственных рецептор-транспортных систем [3, 4]. Кроме того, альтернативным источником инсулина в мозгу является его синтез *de novo* [5, 6]. Рецепторы инсулина широко распространены по всей ЦНС [5, 7]. Больше всего таких рецепторов локализируются в обо-

нятельной луковице, гипоталамусе, коре головного мозга, мозжечке, гиппокампе и полосатом теле [8, 9]. Показано, что ослабление передачи нейрохимического сигнала инсулина, наблюдаемое при развитии ряда нейродегенеративных патологий, отрицательно влияет на функционирование нейронов и глии, метаболизм глюкозы, энергетический метаболизм, а также структуру и функции волокон белого вещества [10].

В настоящее время установлено, что фосфолипаза D (ФЛД) является важным компонентом соответствующих сигнальных путей. Активация этого фермента и образование фосфатидной кислоты (ФК) сопровождают многие клеточные процессы, например везикулярный транспорт и митогенез, а также влияют на выживание клеток [11–13]. Активность ФЛД в нервной системе изменяется под действием нейротрансмиттеров, факторов роста и гормонов, в том числе инсулина [14, 15]. ФЛД участвует в обеспечении пролиферации нервных клеток, процессов экзо- и эндоцитоза нейротрансмиттеров и рецепторов [16], формирования аксонов [17] и образования ацетилхолина [18].

¹ Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина, Харьков (Украина).
Эл. почта: babenko@univer.kharkov.ua (Н. А. Бабенко);
kharchenko_vitalina@meta.ua (В. С. Харченко).

В нашей лаборатории было показано, что у старых организмов ФЛД-зависимая передача сигнала инсулина в клетках печени и скелетной мускулатуры подавляется [19, 20]. Ингибирование активации ФЛД инсулином в тканях-мишенях имеет критическое значение для обмена глюкозы в клетках и коррелирует со снижением поглощения глюкозы и синтеза гликогена. Это проявляется как в условиях старения, так и при моделировании состояния резистентности к действию гормона у молодых животных. Установлено, что накопление в клетках сфинголипида церамида входит в число причин развития возрастной резистентности гепатоцитов к действию гормона. Одной из основных мишеней действия церамидов в стимулированных под влиянием инсулина клетках печени является ФЛД.

Церамид представляет собой биологически активный компонент мембран клеток [21]. Повышение количества церамидов наблюдается в тканях головного мозга при старении [22], резистентности к инсулину и сопутствующих нейродегенеративных заболеваниях [23, 24]. Церамиды, индуцируя секрецию цитокинов [25] и/или NO [26] клетками астроглии, интенсифицируют в нейронах образование активных форм кислорода [27]. В результате этого увеличивается активность β -секретазы BACE1 и стрессрегулируемых киназ (cdk5 и GSK-3), что может приводить к образованию β -амилоида, гиперфосфорилированию белка tau [28] и гибели нейронов [29].

Известно, что церамид является ингибитором ФЛД; показано, однако, что активность указанного фермента в условиях развития нейродегенеративных заболеваний увеличивается. Это связывают с ролью ФЛД в защите нервных клеток от гибели в результате апоптоза [30]. Церамид подавляет активность ФЛД в глиальных клетках [31]. В то же время продукт реакции, катализируемой ФЛД, т. е. ФК, оказывает ингибирующее действие на образование церамида в результате активации сфингомиелиназы [32]; данный эффект способствует выживанию клеток.

В настоящее время вопросы о том, в чем заключаются механизмы развития возрастных нейродегенеративных изменений мозга, а также какова связь этого патологического процесса с сигнальным путем инсулина, остаются в значительной мере открытыми. Роль церамидов в регуляции активности гормончувствительной ФЛД в мозгу изучена слабо. В настоящей работе мы пытались выяснить характер возрастных изменений ФЛД-зависимого звена

передачи сигнала инсулина и роль церамида в развитии резистентности коры головного мозга крыс к действию упомянутого гормона в старости.

МЕТОДИКА

Все исследования на животных проводили с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985), и национальных Общих этических принципов экспериментов на животных (Украина, 2001). В экспериментах использовали 3- и 24-месячных крыс-самцов линии Вистар ($n = 11$ в обеих группах) массой 200–250 (3-месячные животные) и 400–480 (24-месячные крысы) г. После декапитации мозг и диафрагму извлекали, неокортекс выделяли на льду. Кусочки ткани неокортекса 3-месячных крыс инкубировали в бикарбонатном буфере Кребса–Рингера (рН 7.4) с добавлением 0.1 % альбумина в течение 90 мин при 37 °С в присутствии D-эритро-N-ацетилсфингозина (C2-церамида, 5 мкг на 1 мл среды инкубации; “Amersham”, Великобритания) либо 0.75 мМ пальмитиновой кислоты (ПК 16:0) (“Sigma”, США) или этанола в эквивалентном объеме (контроль). Перед внесением образцов неокортекса среда инкубации была комплексирована в соотношении 16:1 с альбумином сыворотки крупного рогатого скота (BSA; “Sigma”, США), как описано Чавесом и соавт. [33]. Кусочки ткани диафрагмы 3- и 24-месячных крыс инкубировали на протяжении 90 мин в упомянутом выше буфере (рН 7.4) в присутствии [^{14}C]H₃COONa (10 мкКи/мл). После включения метки ткани отмывали в бикарбонатном буфере (рН 7.4) с 0.1 % альбумина.

Для определения активности ФЛД в тканях неокортекса и диафрагмы крыс 3- и 24-месячного возраста использовали метод, основанный на образовании фосфадилэтанола (ФЭТ – фосфолипида, образование которого опосредуется исключительно ФЛД путем трансфосфатидилирования) в присутствии 50–300 мМ этанола [12, 34, 35]. ФЭТ, в отличие от ФК, метаболизируется очень медленно и ввиду этого может использоваться как индикатор активации ФЛД в стимулированных клетках. Для определения активности ФЛД перед внесением гормона в среду инкубации ткань неокортекса и диафрагмы преинкубировали 10 мин с 300 мМ этанола; затем в среду инкубации вносили 10 нМ

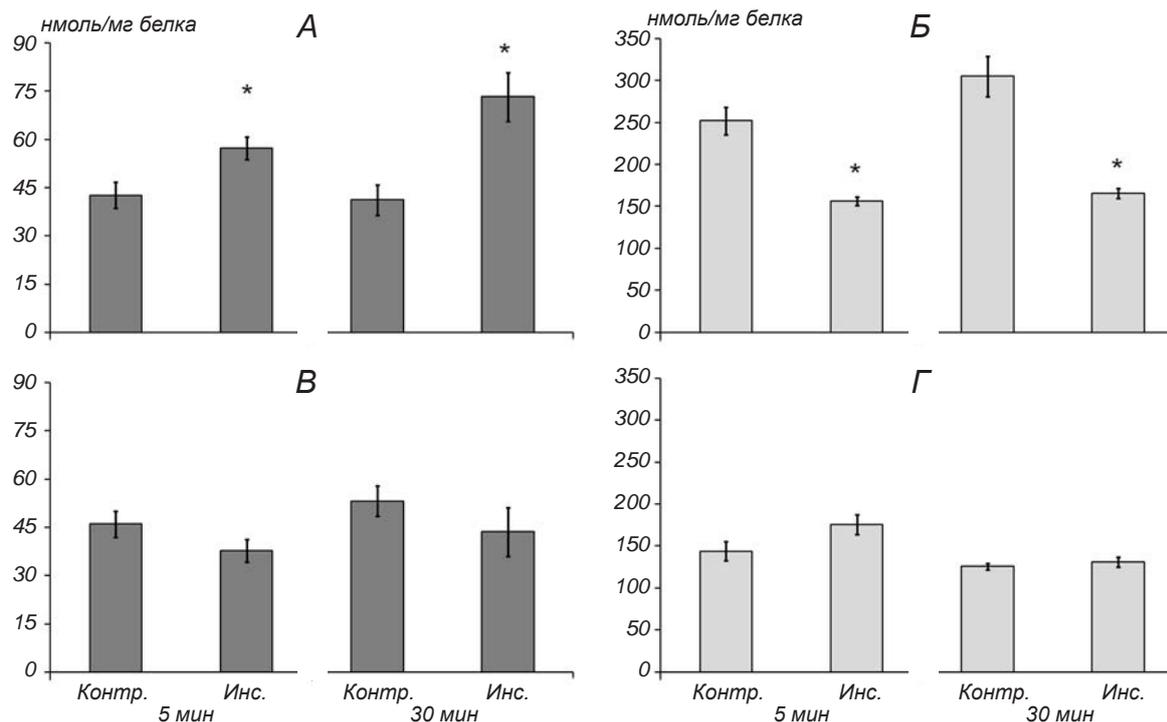
инсулина (“Индар”, Украина) или 0.9 % NaCl (в контрольных опытах) и через 5 или 30 мин оставляли реакцию путем добавления холодной (+3 °С) смеси хлороформ:метанол (1:2 по объему).

Экстракцию липидов проводили по методу Блая–Дайера [36]. Разделение отдельных липидов выполняли путем тонкослойной хроматографии в системах растворителей. Для ФЭТ использовали смесь этилацетат:изооктан:уксусная кислота:вода, 130:20:30:100 по объему, а для свободных жирных кислот (СЖК) – гексан:диэтиловый эфир: ледяная уксусная кислота, 73:25:2 по объему. Для разделения фосфатидилхолина (ФХ) и сфинголипидов использовали диэтиловый эфир (система 1) и смесь хлороформ:метанол:вода (40:10:1 по объему; система 2). Пятна липидов на хроматограммах идентифицировали, сравнивая со стандартами. Содержание СЖК в пробах определяли по методу Марча–Вейнштейна [37], фосфолипидов – по методу Бартлета [38]. Для количественного определения содержания керамидов в клетках пятна липидов переносили в пробирки и элюировали смесью хлороформа с метанолом (1:1 по объему) с последующим элюированием метанолом. Объединённые элюаты выпаривали в вакууме и подвергали гидролизу в 0.5 М растворе HCl в метаноле при 65 °С в течение 15 ч. Массу керамидов устанавливали по высвобождению длинноцепочечных оснований после гидролиза липидов [39]. Содержание белка определяли по методу Лоури [40]. Для межгрупповых сравнений использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения данных, полученных в результате множественного воздействия, – многофакторный дисперсионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что инсулин активизирует ФЛД как в ткани неокортекса, так и в классической мишени для действия гормона – мышечной ткани взрослых животных. Под действием инсулина в ткани неокортекса 3-месячных крыс уровень ФЭТ на 5-й мин инкубации увеличивался на 34, а на 30-й мин – на 78 % (рис. 1, А). Одновременно снижался уровень субстрата ФЛД, т. е. ФХ, на 62 и 54 % на 5-й и 30-й



Р и с. 1. Влияние инсулина (Инс.) на содержание фосфатидилэтанола – А, Б и фосфатидилхолина – Б, Г (нмоль/мг белка) в ткани неокортекса крыс разного возраста.

А, Б – 3-месячные, В, Г – 24-месячные (старые) крысы. *Различия при сравнении с группой контроля (Контр., введение физиологического раствора) значимы, $P < 0.05$. Под диаграммами указано время измерений после введения (мин).

Р и с. 1. Вплив інсуліну (Инс.) на вміст фосфатидилетанолу – А, Б і фосфатидилхоліну – Б, Г (нмоль/мг білка) у тканині неокортексу щурів різного віку.

мин соответственно по сравнению с контролем (Б). При инкубации ткани диафрагмы 3-месячных животных с инсулином на 5-й мин содержание ФЭТ увеличивалось в среднем на $22 \pm 8 \%$, а уровень ФХ снижался на $23 \pm 7 \%$ ($P < 0.05$) по сравнению с контролем (физиологический раствор инсулина; рис. 1).

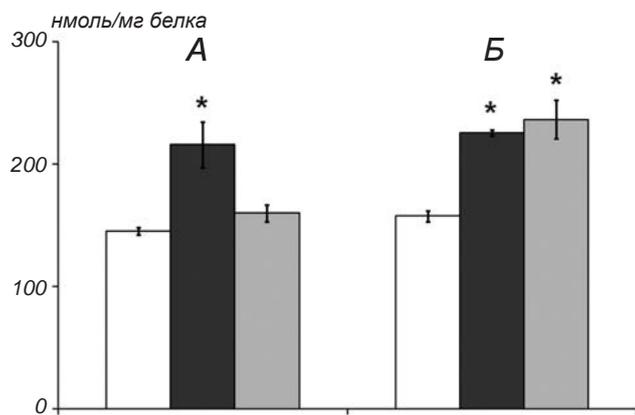
У 24-месячных (старых) животных содержание ФЭТ и ФХ в изученные промежутки времени действия инсулина на неокортекс не отличалось статистически значимо от контрольных значений (рис. 1, В, Г). В диафрагме 24-месячных крыс, инкубированной в присутствии гормона в течение 5 мин, содержание ФЭТ в контроле соответствовало 146.0 ± 9.1 , а при действии инсулина – 149.3 ± 6.2 имп/мин·мг белка. В то же время уровень ФХ соответствовал 331.9 ± 31.7 имп/мин·мг белка для контроля по отношению к инсулину и 343.2 ± 26.8 имп/мин·мг белка для образцов, на которые воздействовали гормоном.

Учитывая тот факт, что СЖК и церамиды играют важную роль в развитии резистентности мышечной ткани и клеток печени к действию инсулина у старых организмов [19, 20], следующим этапом работы было изучение содержания липидов в ткани неокортекса взрослых и старых крыс. Содержание СЖК в неокортексе 3-месячных крыс составляло в

среднем 145.1 ± 2.9 нмоль/мг белка. У 24-месячных крыс этот показатель был выше, составляя 196.6 ± 10.4 нмоль/мг белка, и эти различия оказались статистически значимыми по сравнению с показателями 3-месячных животных ($P < 0.05$). Средний уровень церамидов у 3-месячных крыс равнялся 157.5 ± 4.6 , а у 24-месячных крыс – 226.3 ± 8.5 нмоль/мг белка ($P < 0.05$).

На следующем этапе данной работе мы моделировали повышение содержания СЖК и церамида в ткани неокортекса молодых животных, подобное тому, которое наблюдается у старых животных. Для этого ткань неокортекса 3-месячных животных культивировали в присутствии экзогенных ПК 16:0 или С2-церамида. Уровни эндогенных церамидов в нервной ткани повышались (рис. 2) при действии как С2-церамида, так и ПК 16:0 (на 50 и 43 % соответственно). При воздействии на ткань неокортекса ПК 16:0 также повышалось содержание СЖК (на 49 %; рис. 2).

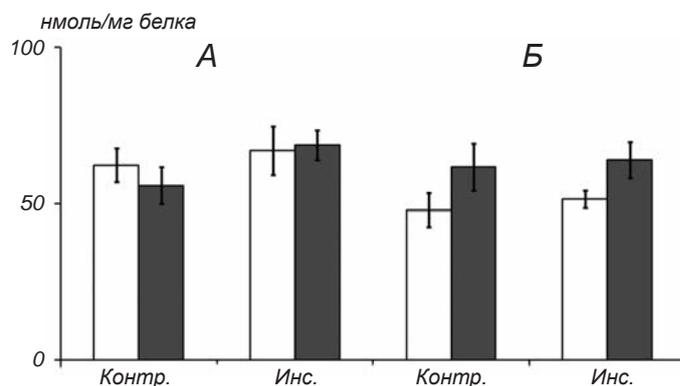
В условиях инкубирования ткани коры головного мозга 3-месячных крыс с экзогенными ПК 16:0 или С2-церамидом статистически значимых изменений в содержании ФЭТ после кратковременной стимуляции ткани инсулином не наблюдалось (рис. 3).



Р и с. 2. Влияния пальмитиновой кислоты (темные столбцы) и С2-церамида (серые столбцы) на содержание свободных жирных кислот и церамида (А и Б соответственно, нмоль/мг белка) в ткани неокортекса 3-месячных крыс (белые столбцы – контроль).

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Впливи пальмітинової кислоти (темні стовпчики) та С2-цераміду (сірі стовпчики) на вміст вільних жирних кислот і цераміду (А і Б відповідно, нмоль/мг білка) в тканині неокортексу 3-місячних щурів (білі стовпчики – контроль).



Р и с. 3. Влияние пальмитиновой кислоты (А) и экзогенного С2-церамида (Б) на содержание фосфатидилэтанола в неокортексе 3-месячных крыс.

Для белых столбцов время измерений после введений 5, для темных – 30 мин. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 3. Вплив пальмітинової кислоти (А) та екзогенного С2-цераміду (Б) на вміст фосфатидилетанола в неокортексі 3-місячних щурів.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нейротрансмиттеры, факторы роста и гормоны, включая инсулин, индуцируют активацию ФЛД в клетках-мишенях. ФЛД катализирует гидролиз ФХ с образованием ФК и холина. Как продукт реакции катализируемой ФЛД (ФК), так и сам фермент участвуют в процессах передачи сигналов и трансмембранного транспорта [11–13]. ФК представляет собой отрицательно заряженный липид. Его молекулы, будучи встроенными в мембрану, изменяют ее местную кривизну, тем самым облегчая формирование везикул и/или их слияние с плазматической мембраной клеток мозга в ходе эндо- и экзоцитоза [41, 42], реализуемых при высвобождении нейромедиаторов [43] или поглощении рецепторов к ним [44]. Другой продукт активации ФЛД – холин – является необходимым компонентом синтеза ацетилхолина в холинергических нейронах [18]. Кроме участия в образовании биологически активных продуктов, ФЛД играет одну из ключевых ролей в росте аксонов нервных клеток и формировании синапсов [17, 45]. Повышение экспрессии и активности ФЛД в культурах нервных клеток сопровождается усилением роста аксонов и синаптогенеза, а ингибирование фермента приводит к полному подавлению формирования аксонов и синапсов [45].

В присутствии этанола в результате специфической для ФЛД реакции трансфосфатилирования происходит образование ФЭТ, который является маркером активации ФЛД [12]. Полученные в нашей работе данные свидетельствуют о том, что ФЛД в тканях коры головного мозга взрослых крыс при кратковременном действии инсулина активируется. В то же время инсулин практически не оказывает стимулирующего влияния на ФЛД в ткани неокортекса 24-месячных животных. Возрастные особенности регуляции инсулином активности ФЛД в неокортексе подобны тем изменениям, которые обнаруживаются в классической мишени действия гормона – мышечной ткани. Наши результаты согласуются с данными исследований, проведенных на синапсосах коры головного мозга крыс 4- и 28-месячного возраста [15]. Авторы цитируемой работы, используя меченый [¹⁴C]ФХ, показали, что внесение инсулина в среду инкубации синапсом коры мозга крыс способствовало образованию [¹⁴C]ФЭТ у 4-месячных животных; это является свидетельством активации ФЛД у молодых животных. Подобный эффект, однако, отсутство-

вал в синапсосах старых (28-месячных) животных [15].

ФЛД локализуется в клетках и в их внутренних компартментах (таких, как аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум), а также в липидных рафтах плазматической мембраны [46]. При стимуляции агонистами ФЛД, благодаря своему РН-домену, может поступать из внутриклеточных компартментов и встраиваться в рафты плазматической мембраны [47]. Упомянутые рафты (“плоты”) представляют собой мембранные домены, обогащенные холестерином и сфинголипидами. Данные молекулярные структуры являются платформами, обеспечивающими белок-липидные и белок-белковые взаимодействия, необходимые для процессов трансдукции клеточных сигналов [48]. При старении, а также при нейродегенеративных заболеваниях происходит изменение липидного спектра мембран в целом и рафтов в частности. Хан и соавт. показали [49], что в случае болезни Альцгеймера в мозгу снижается содержание сфингомиелина и увеличивается содержание церамида. Это может приводить к изменениям в структуре мембранных липидных рафтов и, как следствие, к нарушению функционирования связанных с ними молекул.

В настоящем исследовании и в работах, проведенных в нашей лаборатории ранее, было установлено, что содержание СЖК и церамида в неокортексе 24-месячных крыс повышено [50]. В настоящей же работе продемонстрировало, что повышение содержания СЖК и церамида коррелирует с подавлением активации ФЛД инсулином. Кроме того, мы обнаружили, что с возрастом содержание церамида увеличивается и в клетках других типов, в частности в клетках тканей-мишеней инсулина (таких, как гепатоциты и мышечные клетки диафрагмы крыс), в то время как активация ФЛД в ответ на кратковременное действие инсулина отсутствует [19, 20].

В настоящее время считают, что церамид может непосредственно влиять на ФЛД, ингибируя данный фермент. Церамид может конкурировать с кофакторами ФЛД за связывание с каталитическим ядром этого фермента и ингибировать активацию ФЛД под влиянием ФК и лизоФК [51]. Церамид также частично блокирует транслокацию активаторов ФЛД (белка ARF и протеинкиназы С) [52]. Он может подавлять транскрипцию ФЛД [53]. Кроме того, действие церамида может быть опосредованным. Накопление церамидов в липидных рафтах мембран может приводить к нарушению физических свойств этих структур и ингибированию сиг-

нальных молекул, связанных с ними (в том числе ФЛД) [54].

Для выяснения роли церамидов в нарушении активации инсулином ФЛД в неокортексе старых организмов в настоящей работе активность данного фермента изучали в неокортексе зрелых молодых животных в условиях повышенного (под действием ПК 16:0 или С2-церамида) содержания эндогенных церамидов. ПК 16:0 является предшественником синтеза сфинголипидов в различных тканях, причем доступность субстрата является лимитирующим фактором этого процесса. Введение ПК в среду культивирования астроглиальных клеток усиливает процесс синтеза сфинголипидов и церамида *de novo* [55]. В нашей работе инкубация тканей неокортекса в присутствии ПК 16:0 приводила к повышению содержания и СЖК, и церамида. Можно полагать, что увеличение в клетках уровня предшественника сфинголипидов – ПК 16:0 – является важной причиной повышения содержания церамидов в неокортексе.

D-эритро-N-ацетилсфингозин (С2-церамид) часто используется в исследованиях процессов, опосредуемых этим и подобными агентами, как аналог, который легко проникает в клетки и моделирует действие эндогенных церамидов. Показано, что короткоцепочечные С2- и С6-церамиды могут утилизироваться в клетках путем образования сфингозина и сфинганина и использования данных соединений в синтезе длинноцепочечных церамидов и более сложных сфинголипидов [56]. Мы использовали экзогенный С2-церамид как инструмент, который приводит к повышению содержания эндогенных церамидов в ткани коры головного мозга молодых крыс, подобному аналогичным сдвигам у старых животных. Полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований на гепатоцитах и клетках диафрагмы молодых крыс при модулировании у них содержания церамида вследствие воздействия его предшественников [19, 20]. Введение в среду инкубации ингибитора серинпальмитоилтрансферазы мириоцина предотвращало индукцию накопления эндогенных церамидов под влиянием короткоцепочечных церамидов [20]. Мириоцин нормализовал также содержание эндогенных церамидов в гепатоцитах старых крыс и гепатоцитах молодых животных, культивируемых в присутствии как С2-церамида, так и ПК 16:0. Данное наблюдение указывает на то, что активация синтеза церамида *de novo* является одной из важных причин его накопления в клетках

печени. Эндогенные С2-церамид и ПК 16:0 полностью подавляли активирующее действие инсулина как на ФЛД, так и на обмен глюкозы в гепатоцитах молодых животных. Учитывая эти данные и результаты настоящей работы, можно предположить, что накопление вновь синтезированного церамида в клетках неокортекса, подвергнутых действию эндогенных предшественников, у молодых крыс и в клетках интактного неокортекса старых животных является важной причиной развития состояния резистентности соответствующих тканей к действию инсулина.

Таким образом, показано, что в ткани неокортекса молодых животных инсулин активирует ФЛД. В старости же происходит резкое снижение чувствительности ткани коры головного мозга к действию данного гормона. Большое значение для развития возрастной резистентности неокортекса к действию инсулина имеет изменение липидного спектра мембран клеток, в частности повышение содержания церамидов, которое наблюдается при старении. Церамид, являясь ингибитором ключевых компонентов сигнальных путей инсулина в мозгу (таких, как Akt/протеинкиназа В, ARF, протеинкиназа С и ФЛД), может приводить к существенным нарушениям функционирования данного сигнального каскада и формирования физиологических ответов. Учитывая тот факт, что ФЛД играет существенную роль в функционировании мозга и является мишенью действия церамидов в неокортексе, можно предположить, что индуцированное сфинголипидом подавление функционирования ФЛД-зависимого сигнального пути инсулина может являться важной причиной нарушений работы мозга в старости и/или фактором, содействующим развитию нейродегенеративных патологий.

Н. А. Бабенко¹, В. С. Харченко¹

ВІКОВІ ЗМІНИ ФОСФОЛІПАЗА D-ЗАЛЕЖНОГО СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ ІНСУЛІНУ В НЕОКОРТЕКСІ ЦУРІВ

¹Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна, Харків (Україна).

Резюме

Інсулін бере участь у забезпеченні нормального функціонування ЦНС; фосфоліпаза D є невід'ємною частиною сигнального каскаду цього гормону. З віком відбуваються змі-

ни ліпідного спектра клітин, що спричинює порушення роботи різноманітних сигнальних шляхів, у тому числі інсуліну. У даній роботі встановлено, що вміст керамідів і вільних жирних кислот у неокортексі старих (24-місячних) щурів є помітно вищим, ніж у 3-місячних тварин. У даних умовах здатність інсуліну активувати фосфоліпазу D різко знижується. Інкубація тканини неокортексу молодих тварин у присутності екзогенного C2-кераміду або пальмітинової кислоти (попередника сфінголіпідів) призводить до збільшення вмісту ендогенних керамідів. Цей процес супроводжується пригніченням стимульованого інсуліном утворення фосфатидилетанолу (продукту реакції трансфосфатидилування етанолу фосфоліпазою D). Таким чином, отримані результати свідчать про те, що з віком активність фосфоліпаза D-залежної ланки сигнального каскаду інсуліну в неокортексі значно послаблюється; важливу роль у даному процесі відіграє керамід.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. K. H. Lee, A. S. Calikoglu, P. Ye, and A. J. D'Ercole, "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) ameliorates and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) exacerbates the effects of undernutrition on brain growth during early postnatal life: studies in IGF-I and IGFBP-1 transgenic mice," *Pediat. Res.*, **45**, No. 3, 331-336 (1999).
2. C. R. Plata-Salamán, "Insulin in the cerebrospinal fluid," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **15**, No. 2, 243-258 (1991).
3. Y. Yu, A. Kastin, and W. Pan, "Reciprocal interactions of insulin and insulin-like growth factor I in receptor-mediated transport across the blood-brain barrier," *Endocrinology*, **147**, 2611-2615 (2006).
4. Z. Laron, "Insulin and the brain," *Arch. Physiol. Biochem.*, **115**, No. 2, 112-116 (2009).
5. W. Zhao, H. Chen, H. Xu, et al., "Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats," *J. Biol. Chem.*, **274**, No. 49, 34893-34902 (1999).
6. R. Schechter, T. Yanovitch, M. Abboud, et al., "Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures," *Brain Res.*, **808**, No. 2, 270-278 (1998).
7. J. Havrankova, J. Roth, and M. Brownstein, "Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat," *Nature*, **272**, No. 56, 827-829 (1978).
8. M. Salkovic-Petrisic and S. Hoyer, "Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach," *J. Neural. Transm., Suppl.*, No. 72, 217-233 (2007).
9. S. M. de la Monte and J. R. Wands, "Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease," *J. Alzheimers Dis.*, **7**, No. 1, 45-61 (2005).
10. S. M. de la Monte, "Insulin resistance and Alzheimer's disease," *Biochem. Mol. Biol. Reports*, **42**, No. 8, 475-481 (2009).
11. S. Cockcroft, "Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2," *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, No. 11, 1674-1687 (2001).
12. J. H. Exton, "Phospholipase D – structure, regulation and function," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **144**, 1-94 (2002).
13. G. M. Jenkins and M. A. Frohman, "Phospholipase D: a lipid centric review," *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, Nos. 19/20, 2305-2316 (2005).
14. J. Klein, V. Chalifa, M. Liscovitch, and K. Löffelholz, "Role of phospholipase D activation in nervous system physiology and pathophysiology," *J. Neurochem.*, **65**, No. 4, 1445-1455 (1995).
15. G. A. Salvador, S. J. Pasquare, M. G. Ilincheta de Boschero, and N. M. Giusto, "Differential modulation of phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase during aging in rat cerebral cortex synaptosomes," *Exp. Gerontol.*, **37**, No. 4, 543-552 (2002).
16. T. G. Oliveira and G. Di Paolo, "Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta*, **1801**, No. 8, 799-805 (2010).
17. Y. Kanaho, Y. Funakoshi, and H. Hasegawa, "Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth," *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, No. 9, 898-904 (2009).
18. D. Zhao, M. A. Frohman, and J. K. Blusztajn, "Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms," *BioMed Centr. Neurosci.*, **2**, 16 (2001).
19. Н. А. Бабенко, В. С. Харченко, "Роль керамидов в порушенні інсулінового сигналінга в діафрагмі крыс в умовах *in vivo* и *in vitro*", *Пробл. ендокрин. патології*, № 1, 37-43 (2009).
20. N. A. Babenko and V. S. Kharchenko, "Ceramide inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats," *Biochemistry*, **77**, № 2, 180-186 (2012).
21. Y. A. Hannun and L. M. Obeid, "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, No. 2, 139-150 (2008).
22. N. A. Babenko and Y. A. Semenova, "Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats," *Exp. Gerontol.*, **45**, No. 5, 375-380 (2010).
23. S. M. de la Monte, M. Tong, V. Nguyen, et al., "Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions," *J. Alzheimers Dis.*, **21**, No. 3, 967-984 (2010).
24. S. M. de la Monte, E. Re, L. Longato, and M. Tong, "Dysfunctional pro-ceramide, ER stress, and insulin/IGF signaling networks with progression of Alzheimer's disease," *J. Alzheimers Dis.*, **30**, Suppl. 2, S217-S229 (2012).
25. K. Lieb, B. L. Fiebich, M. Berger, et al., "The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells," *J. Immunol.*, **159**, 4952-4958 (1997).
26. K. Pahan, F. G. Sheikh, M. Khan, et al., "Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes," *J. Biol. Chem.*, **273**, No. 5, 2591-2600 (1998).
27. T. Wei, C. Chen, J. Hou, et al., "Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells," *Biochim. Biophys. Acta*, **1498**, No. 1, 72-79 (2000).
28. A. Szutowicz and W. Lysiak, "Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain," *J. Neurochem.*, **35**, No. 4, 775-785 (1980).
29. K. Ayasolla, M. Khan, A. K. Singh, and I. Singh, "Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E," *Free Radical. Biol. Med.*, **37**, No. 3, 325-338 (2004).

30. J. Klein, "Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain," *J. Neurochem.*, **94**, No. 6, 1473-1487 (2005).
31. S. Yoshimura, H. Sakai, K. Ohguchi, et al., "Changes in the activity and mRNA levels of phospholipase D during ceramide-induced apoptosis in rat C6 glial cells," *J. Neurochem.*, **69**, No. 2, 713-720 (1997).
32. B. Schatter, S. Jin, K. Löffelholz, and J. Klein, "Cross-talk between phosphatidic acid and ceramide during ethanol-induced apoptosis in astrocytes," *BioMed Centr. Pharmacol.*, **5**, 3 (2005).
33. J. A. Chavez, W. L. Holland, J. Bar, et al., "Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling," *J. Biol. Chem.*, **280**, No. 20, 20148-20153 (2005).
34. G. L. Moehren, J. B. Gustavsson, and J. B. Hoek, "Activation and desensitization of phospholipase D in intact rat hepatocytes," *J. Biol. Chem.*, **269**, No. 2, 838-848 (1994).
35. P. Huang, Y. M. Altshuller, J. C. Hou, et al., "Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1," *Mol. Biol. Cell*, **16**, No. 6, 2614-2623 (2005).
36. E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, No. 8, 911-917 (1959).
37. J. B. March and D. B. Weinstein, "Simple charring method for determination of lipids," *J. Lipid Res.*, **7**, No. 4, 574-580 (1966).
38. G. R. Bartlett, "Phosphorus assay in column chromatography," *J. Biol. Chem.*, **234**, No. 3, 466-468 (1959).
39. C. J. Lauter and E. G. Trams, "A spectrophotometric determination of Sphingosine," *J. Lipid Res.*, **3**, 136-138 (1962).
40. O. N. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randal, "Protein measurement with the folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, **193**, 365-375 (1951).
41. M. G. Roth, "Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic," *Traffic*, **9**, No. 8, 1233-1239 (2008).
42. Y. Humeau, N. Vitale, S. Chasserot-Golaz, et al., "A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, No. 26, 15300-15305 (2001).
43. E. Sarri, I. Böckmann, U. Kempter, et al., "Regulation of phospholipase D activity in synaptosomes permeabilized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin," *FEBS Lett.*, **440**, No. 3, 287-290 (1998).
44. M. Scarselli and J. G. Donaldson, "Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis," *J. Biol. Chem.*, **284**, No. 6, 3577-3585 (2009).
45. M. S. Yoon, C. Yon, S. Y. Park, et al., "Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, No. 3, 804-811 (2005).
46. M. Czarny, Y. Lavie, G. Fiucci, and M. Liscovitch, "Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101," *J. Biol. Chem.*, **274**, No. 5, 2717-2724 (1999).
47. G. Du, Y. M. Altshuller, N. Vitale, et al., "Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs," *J. Cell Biol.*, **162**, No. 2, 305-315 (2003).
48. L. J. Pike, "Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story," *Biochim. Biophys. Acta*, **1746**, No. 3, 260-273 (2005).
49. X. Han, S. Rozen, S. H. Boyle, et al., "Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics," *PLoS One*, **6**, No. 7, e21643 (2011).
50. Л. X. М. Хассунех, Я. О. Семенова, О. А. Красильникова, Н. О. Бабенко, "Вікові особливості вмісту сигнальних ліпідів у печінці та мозку щурів," *Фізіол. журн.*, **52**, № 6, 79-84 (2006).
51. A. Abousalham, C. Lioussis, L. O'Brien, and D. N. Brindley, "Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA," *J. Biol. Chem.*, **272**, 1069-1075 (1997).
52. A. Gidwani, H. A. Brown, D. Holowka, and B. Baird, "Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by Fc epsilonRI," *J. Cell Sci.*, **116**, 3177-3187 (2003).
53. S. Mebarek, H. Komati, F. Naro, et al., "Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation," *J. Cell Sci.*, **120**, Part 3, 407-416 (2007).
54. I. N. Singh, L. M. Stromberg, S. G. Bourgoin, et al., "Ceramide inhibition of mammalian phospholipase D1 and D2 activities is antagonized by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate," *Biochemistry*, **40**, 11227-11233 (2001).
55. S. Patil, D. Balu, J. Melrose, and C. Chan, "Brain region-specificity of palmitic acid-induced abnormalities associated with Alzheimer's disease," *BioMed Centr. Res. Notes*, **4**, 1-20 (2008).
56. N. D. Ridgway and D. L. Merriam, "Metabolism of short-chain ceramide and dihydroceramide analogues in Chinese hamster ovary (CHO) cells," *Biochim. Biophys. Acta*, **1256**, No. 1, 57-70 (1995).