

ВЛИЯНИЯ СТАРЕНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫХ МОДИФИКАЦИЙ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ИНСУЛИНИНДУЦИРОВАННЫЕ СДВИГИ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Поступила 03.12.13

Исследовали индуцированную инсулином интенсификацию поглощения глюкозы и образования гликогена в коре головного мозга молодых и старых крыс. У первых из них соответствующие сдвиги были хорошо выражены; у старых же животных инсулин не оказывал существенного стимулирующего действия на процессы обмена глюкозы в ткани неокортекса. Предполагалось, что это связано с возрастным повышением уровня церамидов, обуславливающим изменения липидного спектра мембран клеток, и подавлением ключевых компонентов сигнальных путей инсулина в мозгу (таких, как Akt/протеинкиназа В, ARF, протеинкиназа С и фосфолипаза D). Данные события приводят к нарушению функционирования сигнального каскада гормона и процесса формирования физиологического ответа. Повышение содержания церамидов в ткани коры головного мозга молодых животных в результате воздействия экзогенного С2-церамида или пальмитиновой кислоты (предшественника сфинголипидов) сопровождалось подавлением интенсификации поглощения глюкозы и образования гликогена под влиянием инсулина. Учитывая существенное повышение содержания церамидов в неокортексе в старости (что согласуется с результатами настоящей работы), можно полагать, что накопление церамида с возрастом является важной причиной развития резистентности обмена глюкозы в ЦНС по отношению к инсулину.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: неокортекс, старение, глюкоза, гликоген, инсулин, церамид, пальмитиновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Глюкоза является главным источником энергии для клеток мозга млекопитающих. Она свободно пересекает гемато-энцефалический барьер и поступает либо непосредственно в нейроны, либо (в условиях физиологической активации) – в астроциты; там в процессе гликолиза глюкоза превращается в лактат. Последний выделяется из астроцитов и поглощается нейронами, являясь для них, как и глюкоза, адекватным энергетическим субстратом [1]. Глюкоза доставляется в клетки мозга (как и в клетки других тканей) с участием специфических мембранных глюкозных транспортеров (ГЛЮТ), облегчающих ее диффузию. За последние годы было идентифицировано более 10 изоформ ГЛЮТ, имеющих разную чувствитель-

ность к инсулину; их распределение в тканях также различно. Среди них только ГЛЮТ1, ГЛЮТ3 и ГЛЮТ4 рассматриваются как основные переносчики глюкозы в нервной ткани [2]. ГЛЮТ1 и ГЛЮТ3 нечувствительны к инсулину. ГЛЮТ1 обнаруживается во всех отделах как взрослого, так и развивающегося мозга [3]. ГЛЮТ3 присутствует в глиоцитах и эндотелиальных клетках мозга [4]. ГЛЮТ4 чувствителен к инсулину и обладает высокой чувствительностью к уровню глюкозы. В условиях отсутствия стимуляции он локализован преимущественно внутриклеточно. В ответ на действие инсулина внутриклеточные везикулы, содержащие в себе ГЛЮТ4, подвергаются немедленному экзоцитозу. Этот транспортер обнаружен в мозжечке, обонятельных луковицах, гиппокампе, латеральном гипоталамусе, аркуатных ядрах и коре больших полушарий [3].

Метаболизм глюкозы обеспечивает энергией физиологическое функционирование мозга, а также образование и высвобождение нейротрансмиттеров [6]. На культуре глутаматергических нейронов

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

было показано, что глюкоза необходима для сохранения гомеостаза нейротрансмиттеров в ходе синаптической активности клеток [7]. Наибольшая часть энергии в мозгу используется для обеспечения генерации потенциалов действия, постсинаптических потенциалов, поддержания мембранных градиентов ионов и, соответственно, потенциала покоя [8].

Показано, что уровень гликогена в астроцитах имеет прямое отношение к эффективности процессов обучения; гидролиз гликогена обеспечивает необходимые количества углерода для синтеза глутамата во время этих процессов [10]. Блокирование метаболизма гликогена *in vivo* с помощью ингибитора гликогенфосфорилазы 1,4-дидексил-1,4-имино-D-арабинитола ухудшает формирование памяти, реализуемое с участием гиппокампа [11].

Представления о роли инсулина как основного регулятора метаболизма глюкозы долгое время не распространялись на действие указанного гормона на нервную ткань, несмотря на то, что мозг является основным потребителем глюкозы – он использует порядка 25 % общей продукции данного энергетического субстрата [12]. Ввиду этого эффекты, обусловленные действием инсулина в мозгу, оставались практически не исследованными. В настоящее время установлено, что инсулин попадает в мозг, присутствуя в цереброспинальной жидкости; он проходит через гемато-энцефалический барьер и поступает в клетки с помощью специальных переносчиков [13]. Кроме того, есть данные, что этот гормон синтезируется и непосредственно в мозгу [14, 15]. Сигнальные процессы с участием инсулина в мозгу реализуются через специфические рецепторы, которые широко представлены в ЦНС [14, 16]. Инсулинрецепторный сигнальный каскад в ЦНС обладает принципиальным сходством с таковым в других тканях-мишенях. Ведущую роль в сопряжении активированных рецепторов инсулина с внутриклеточными путями передачи сигнала выполняют адапторные белки – инсулинрецепторные субстраты IRS. Показано, что в ЦНС экспрессируются и присутствуют IRS1 и IRS2 [17]. Эти белки за счет сайтов тирозинового фосфорилирования взаимодействуют с src-гомологичными 2-доменсодержащими белками – такими, как p85-регуляторная субъединица фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИ-3-киназы), протеин-2-связывающий рецептор фактора роста (Grb2) и протеин-тирозинфосфатаза (Src) [18]. Далее следует активация «нижележащих» сигнальных путей – Ras-Raf-МАРК-каскада и/или серин-трео-

ниновых киназ, что в конечном счете и обеспечивает реализацию биологических эффектов инсулина в ЦНС [18]. ФИ-3-киназный сигнальный путь, который связывает IRS с протеинкиназой B (ПКВ/Akt), является одним из основных путей, обеспечивающих реализацию метаболических эффектов инсулина в тканях. Как было показано на гиппокампе крыс, интрацеребровентрикулярное введение инсулина обуславливает повышение уровня этого гормона в гиппокампе, фосфорилирование Akt и усиление транслокации ГЛЮТ4 в плазматические мембраны нервных клеток, что в конечном счете приводит к увеличению поглощения глюкозы [19]. Инсулинстимулированное фосфорилирование Akt и транслокация ГЛЮТ4 блокируются ингибитором ФИ-3-киназы LY294002. Это свидетельствует об интенсификации инсулином поглощения глюкозы в гиппокампе по механизму, сходному с тем, который характерен для периферических тканей.

Показано, что нарушение функций инсулиновой системы в ЦНС, наблюдаемое при старении и диабете 2-го типа, коррелирует с развитием нейродегенеративных патологий [20, 21]. Снижение интенсивности метаболизма глюкозы, повышение экспрессии инсулиновых рецепторов и снижение уровня инсулина в мозгу на фоне возрастающего уровня этого гормона в плазме крови являются одним из признаков развития болезни Альцгеймера [22]. Однако до настоящего времени вопросы возрастных изменений инсулинового сигналинга и метаболизма глюкозы остаются практически открытыми и нуждаются в тщательном изучении.

Учитывая то, что глюкоза играет важнейшую роль в функционировании мозга, а также слабую изученность процессов регуляции процессов обмена глюкозы в нервной ткани при развитии возрастных патологий, мы в настоящей работе исследовали особенности регуляции инсулином обмена глюкозы в неокортексе старых крыс и моделировали состояние резистентности к действию инсулина в тканях ЦНС молодых животных.

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на трех- и 24-месячных крысах-самцах линии Вистар. Животных подвергали эвтаназии в состоянии наркоза. Мозг быстро извлекали, неокортекс выделяли на льду. Свежевыделенные фрагменты неокортекса трехмесячных крыс суспендировали в буфере Рингера-Кребса

(рН 7.5) и инкубировали 90 мин при 37 °С в присутствии С2-церамида (D-эритро-N-ацетилсфингозида; «Amersham», Великобритания; 5 мкг/мл среды инкубации) или пальмитиновой кислоты («Sigma», США; 0.75 мМ) или же в контрольной смеси (этанол в эквивалентном объеме). Перед внесением в среду инкубации неокортекса пальмитиновая кислота была комплексирована с BSA («Sigma», США), как было описано Чавесом и соавт. [23]. Неокортекс старых (24-месячных) крыс инкубировали без добавок в течение 90 мин при 37 °С.

Далее определяли индуцированные инсулином (инсулин свиной монокомпонентный, ЗАО «Индар», Украина) изменения поглощения [³H]-D-глюкозы (0.5 мКи/мл) тканью неокортекса и включение [U¹⁴C]-D-глюкозы (0.1 мКи/мл) в гликоген по методу, описанному Хени и соавт. [24]. Радиоактивность меченых [³H]-D-глюкозы и [¹⁴C]-гликогена определяли с помощью счетчика радиоактивности. Общее количество белка в ткани неокортекса определяли по методу Лоури [25].

Числовые данные представлены ниже в виде средних значений ± ошибка среднего. Для межгрупповых сравнений использовали *t*-критерий Стьюдента, а для сравнения данных, полученных в результате множественных воздействий, – многофакторный дисперсионный анализ.

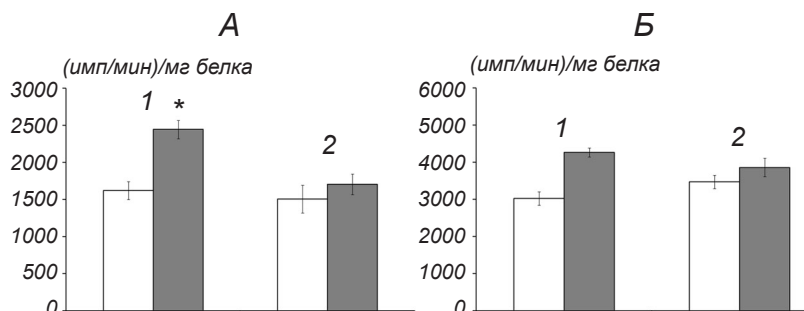
РЕЗУЛЬТАТЫ

В неокортексе трехмесячных крыс инсулин существенно интенсифицировал процессы обмена глюкозы. При инкубации изолированных блоков ткани коры головного мозга в присутствии инсулина наблюдались усиление поглощения меченой [³H]-

глюкозы в среднем на 41 % и повышение содержания [¹⁴C]-гликогена на 50 %. У старых же (24-месячных) животных в блоках ткани неокортекса после воздействия инсулина изменения уровня поглощения [³H]-глюкозы и содержания [¹⁴C]-гликогена не достигали уровня статистической значимости (рис. 1).

Ранее было показано, что в старости содержание церамидов и их предшественников свободных жирных кислот повышается, причем как в классических тканях-мишенях по отношению к действию инсулина – скелетной мускулатуре и клетках печени [26–28], так и в неокортексе и гиппокампе [26, 29, 30]. Снижение уровня церамидов в клетках старого организма с помощью ингибитора его синтеза *de novo* мириоцина приводило к усилению индуцированного инсулином повышения поглощения глюкозы [26]. Авторы пришли к заключению, что спонтанная резистентность старых клеток печени к действию данного гормона связана с возрастным накоплением церамидов.

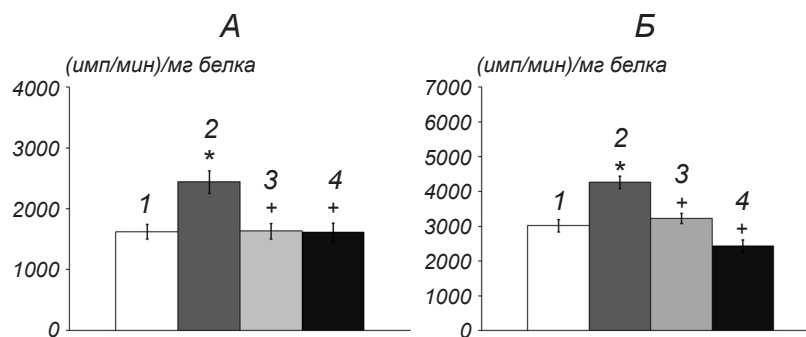
С целью моделирования состояния резистентности ткани неокортекса к действию инсулина, подобного тому, которое наблюдается при старении, на следующем этапе работы мы изучили влияние экзогенных агентов – пальмитиновой кислоты или С2-церамида – на инсулинзависимое усиление поглощения глюкозы и образования гликогена в ткани неокортекса трехмесячных крыс. Инкубация ткани коры головного мозга молодых крыс в присутствии экзогенной пальмитиновой кислоты приводила к подавлению стимулированного инсулином поглощения [³H]-глюкозы на 67 % по сравнению с соответствующим контролем (рис. 2, А). В условиях действия С2-церамида сдвиг поглощения меченой [³H]-глюкозы был меньше на 71 % по сравнению с



Р и с. 1. Индуцированные инсулином изменения поглощения меченой глюкозы (А) и образования гликогена (Б) в ткани коры головного мозга у крыс разного возраста.

1 – для трех-, 2 – для 24-месячных крыс. * $P \leq 0.05$ (разница статистически значима по сравнению с контролем).

Р и с. 1. Индуковані інсуліном зміни поглинання глюкози (А) та утворення глікогену (Б) у тканині кори головного мозку у щурів різного віку.



Р и с. 2. Влияние пальмитиновой кислоты (16:0) и экзогенного С2-церамида на индуцированные инсулином изменения поглощения глюкозы (А) и образования гликогена (Б) в ткани коры головного мозга молодых (трехмесячных) крыс.

1 – контроль; 2 – 4 – при воздействии инсулина (2), совместном воздействии инсулина и пальмитиновой кислоты (16:0) (3) и инсулина и С2-церамида (4). * $P < 0.05$ (статистически значимо по сравнению с контролем), + $P < 0.05$ (статистически значимо по сравнению с группой 2).

Р и с. 2. Впливи пальмітинової кислоти (16:0) та екзогенного С2-цераміду на індуковані інсуліном зміни поглинання глюкози (А) та утворення глікогену (Б) у тканині кори головного мозку тримісячних щурів.

таковым в условиях изолированного действия инсулина. При инкубации ткани неокортекса в присутствии пальмитиновой кислоты или С2-церамида стимулированное инсулином образование меченого [^{14}C]-гликогена в нервных клетках также резко подавлялось (Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Инсулинзависимое усиление поглощения глюкозы клетками-мишенями осуществляется с участием особых транспортеров, чувствительных к действию упомянутого гормона (ГЛЮТ4). Эти транспортеры глюкозы в неокортексе, мозжечке, церебральных ядерных структурах и спинном мозгу характеризуются высокой аффинностью [2]. ГЛЮТ4 в условиях отсутствия стимуляции инсулином находится в мембранах эндоплазматического ретикула. При стимуляции клеток инсулином происходят активация соответствующего сигнального каскада и запуск цепи событий, которые приводят к экстернализации более 50 % транспортера ГЛЮТ4 в клеточные мембраны и усилению поглощения глюкозы.

В работах нашей лаборатории, проведенных ранее на классических мишенях инсулина – мышечной ткани и гепатоцитах [26, 28], было показано, что стимулирование поглощения глюкозы и образование гликогена клетками коррелируют с активацией фосфолипазы D (ФЛД) под действием инсулина. Кроме того, ранее было установлено, что инсулин

существенно стимулирует активацию данного фермента в ткани неокортекса молодых крыс [29, 31]. Активированная ФЛД гидролизует фосфатидилхолин; в результате этой реакции образуются холин и фосфатидная кислота. ФЛД и фосфатидная кислота существенно задействованы в процессы трансдукции внутриклеточных сигналов и мембранного транспорта. В работе Ксу и соавт. было показано, что ингибирование ФЛД специфическим и неспецифическим ингибиторами (FPI и 1-бутанолом соответственно) снижает частоту слияний везикул, содержащих в себе ГЛЮТ4, с плазматической мембраной и препятствует поглощению глюкозы клетками [32]. В старости инсулинзависимая активация ФЛД и процессы обмена глюкозы в клетках диафрагмы и печени нарушаются, причем это связано с повышением содержания церамидов и их предшественников – свободных жирных кислот [26, 28]. В настоящее время появились основания считать, что церамиды могут непосредственно влиять на ФЛД, ингибируя данный фермент. Церамиды могут конкурировать с кофакторами ФЛД за связывание с каталитическим ядром фермента и ингибировать его активацию фосфатидной и лизофосфатидной кислотами [33]. Церамиды также частично блокируют транслокацию активаторов ФЛД белка ARF и протеинкиназы С [34] и могут подавлять транскрипцию ФЛД [35]. Кроме того, их действие может быть опосредованным. Накопление церамидов в липидных рафтах клеточных мембран может приводить к нарушению физических свойств этих структур и ингибированию активности связанных с ними сиг-

нальных молекул, в том числе ФЛД [36]. Церамиды также подавляют активность Akt/ПКВ, которая является важным участником регуляции метаболизма глюкозы инсулином.

Ранее было установлено, что содержание свободных жирных кислот и церамидов в ткани неокортекса старых (24-месячных) крыс по сравнению с таковым у взрослых животных меньшего возраста заметно выше [29, 30]. Кроме того, при моделировании состояния резистентности клеток печени, диафрагмы и коры головного мозга молодых (трехмесячных) крыс с помощью как экзогенного С2-церамида, так и предшественника синтеза эндогенных церамидов пальмитиновой кислоты наблюдались повышение содержания эндогенных церамидов и подавление инсулинзависимой активации ФЛД [26, 28, 29]. В классических тканях-мишенях для инсулина – мышечной ткани и печени – подавление активации инсулином ФЛД сопровождалось подавлением инсулинзависимого усиления поглощения глюкозы и образования гликогена [26, 28]. Учитывая эти данные и результаты настоящей работы, можно предположить, что нарушение регуляции инсулином активности ФЛД является одной из существенных причин подавления индукции изменений метаболизма глюкозы в неокортексе старых организмов при воздействии указанного гормона.

Для выяснения роли церамидов в нарушении активации инсулином поглощения глюкозы и образования гликогена у старых организмов в настоящей работе процессы обмена глюкозы изучали в неокортексе взрослых молодых животных в условиях повышенного содержания эндогенных церамидов, обусловленного действием пальмитиновой кислоты или С2-церамида. Пальмитиновая кислота является предшественником синтеза сфинголипидов в различных тканях, причем доступность необходимых субстратов представляет собой лимитирующий фактор этого процесса. Введение пальмитиновой кислоты в среду культивирования астроглиальных клеток усиливает процесс синтеза сфинголипидов и церамидов *de novo* [37]. В работе, проведенной ранее в нашей лаборатории, было установлено, что увеличение в клетках уровней пальмитиновой кислоты (т. е. предшественника сфинголипидов) или же непосредственно С2-церамида является важным фактором, обуславливающим существенное повышение содержания эндогенных церамидов в неокортексе [29]. С2-церамид часто используется в исследованиях процессов, опосредуемых церамидами, поскольку он легко проникает в клетки; в резуль-

тате фактически имитируется действие повышения уровня эндогенных церамидов. Короткоцепочечные С2- и С6-церамиды могут утилизироваться в клетках, что приводит к образованию сфингозина и сфинганина и их использованию в синтезе длинноцепочечных церамидов и более сложных сфинголипидов [38]. В нашей работе экзогенный С2-церамид мы использовали как инструмент, индуцирующий повышение содержания эндогенных церамидов в ткани коры головного мозга молодых крыс, подобное тому, которое наблюдается у старых животных. Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных экспериментов на гепатоцитах и клетках диафрагмы молодых крыс при модулировании в них содержания церамидов под действием предшественников последних [26, 28]. Введение в среду инкубации ингибитора серинпальмитоилтрансферазы мириоцина предотвращало индукцию накопления эндогенных церамидов, обусловленного влиянием короткоцепочечных церамидов [26]. Мириоцин нормализовал также содержание эндогенных церамидов в гепатоцитах старых крыс и в молодых гепатоцитах, культивируемых в присутствии как С2-церамида, так и пальмитиновой кислоты. Данные факты свидетельствуют о том, что активация синтеза церамидов *de novo* является важной причиной их накопления в клетках печени. Эндогенные С2-церамид и пальмитиновая кислота 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 синтезированных церамидов в неокортексе как под действием введения их предшественников у молодых крыс, так и в интактной коре старых животных является важной причиной развития состояния резистентности кортикальных тканей к действию инсулина.

Таким образом, выяснилось, что в ткани неокортекса молодых животных инсулин существенно интенсифицирует поглощение глюкозы и образование гликогена. В старости же чувствительность ткани коры головного мозга к действию этого гормона резко снижается. Большое значение для развития возрастной резистентности обмена глюкозы в неокортексе к действию инсулина имеет изменение липидного спектра мембран кортикальных клеток, в частности повышение содержания церамидов. Церамиды, являясь ингибиторами ключевых компонентов сигнальных путей инсулина в мозгу (таких, как Akt/протеинкиназа В, ARF, ПКС и ФЛД), могут

нарушать работу сигнального каскада и формирование адекватного физиологического ответа. Учитывая то, что глюкоза играет важную роль в функционировании клеток мозга, а процессы ее поглощения и запасаения – это мишень для действия керамидов в неокортексе, можно предположить, что подавление инсулинзависимой модуляции обмена глюкозы является важной причиной нарушения функционирования мозга в старости и одним из факторов, предшествующих развитию нейродегенеративных патологий.

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).

Авторы настоящей работы, Н. А. Бабенко, и В. С. Харченко, заявляют, что при выполнении исследования и публикации его результатов отсутствовали какие-либо конфликты, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями и/или лицами, которые могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

Н. А. Бабенко¹, В. С. Харченко¹

ВПЛИВИ СТАРІННЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВИКЛИКАНИХ МОДИФІКАЦІЙ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ НА ІНСУЛІНІНДУКОВАНІ ЗРУШЕННЯ ОБМІНУ ГЛЮКОЗИ В КОРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

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

Резюме

Досліджували інсулініндуковану інтенсифікацію поглинання глюкози та утворення глікогену в корі головного мозку молодих і старих щурів. У перших із них відповідні зрушення були добре вираженими; у старих же тварин інсулін не чинив істотної стимулюючої дії на процеси обміну глюкози в тканині неокортексу. Вважалося, що це пов'язано з віковим підвищенням рівня керамідів, зумовлюючим згадану зміну ліпідного спектра мембран клітин, і пригніченням ключових компонентів сигнальних шляхів інсуліну в мозку (таких, як Akt/протеїнкіназа В, ARF, протеїнкіназа С і фосфоліпаза D). Дані події призводять до порушення функціонування сигнального каскаду гормону та процесу формування фізіологічної відповіді. Підвищення вмісту керамідів у тканині кори головного мозку молодих щурів у результаті дії екзогенного С2-кераміду або пальмітинової кислоти (попередника сфінголіпідів) супроводжується пригніченням ін-

тенсифікації поглинання глюкози та утворення глікогену під впливом інсуліну. Враховуючи істотне підвищення вмісту керамідів у неокортексі в старості (що узгоджується з результатами даної роботи), можна вважати, що накопичення кераміду з віком є важливою причиною розвитку резистентності ЦНС щодо інсуліну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. L. Pellerin and P. J. Magistretti, "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, No. 22, 10625-10629 (1994).
2. C. Choëiri, W. Staines, and C. Messier, "Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain," *Neuroscience*, **111**, No. 1, 19-34 (2002).
3. A. M. Brant, T. J. Jess, G. Milligan, et al., "Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, No. 3, 1297-1302 (1993).
4. T. Kayano, H. Fukumoto, R. L. Eddy, et al., "Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues," *J. Biol. Chem.*, **263**, No. 30, 15245-15248 (1988).
5. G. W. Gould, A. M. Brant, B. B. Kahn, et al., "Expression of the brain-type glucose transporter is restricted to brain and neuronal cells in mice," *Diabetologia*, **35**, No. 4, 304-309 (1992).
6. G. A. Dienel, "Fueling and imaging brain activation," *Am. Soc. Neurochem. Neuro.*, **4**, e00093 (2012).
7. L. K. Bak, A. Schousboe, U. Sonnewald, and H. S. Waagepetersen, "Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **26**, No. 10, 1285-1297 (2006).
8. C. Howarth, P. Gleeson, and D. Attwell, "Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum," *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **32**, 1222-1232 (2012).
9. M. V. Ivannikov, M. Sugimori, and R. R. Llinás, "Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons," *Cell Calcium*, **47**, 507-513 (2010).
10. M. Dinuzzo, S. Mangia, B. Maraviglia, and F. Giove, "The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity," *Neurochem. Res.*, **37**, 2432-2438 (2012).
11. A. Suzuki, S. A. Stern, O. Bozdagi, et al., "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation," *Cell*, **144**, 810-823 (2011).
12. G. S. Watson and S. Craft, "Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease," *Eur. J. Pharmacol.*, **490**, Nos. 1/3, 97-113 (2004).
13. Z. Laron, "Insulin and the brain," *Arch. Physiol. Biochem.*, **115**, No. 2, 112-116 (2009).
14. 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).
15. 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).
16. 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).
 17. E. Araki, M. A. Lipes, M. E. Patti, et al., “Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene,” *Nature*, **372**, No. 6502, 186-190 (1994).
 18. L. Plum, M. Schubert, and J. C. Brüning, “The role of insulin receptor signaling in the brain,” *Trends Endocrinol. Metab.*, **16**, No. 2, 59-65 (2005).
 19. C. A. Grillo, G. G. Piroli, R. M. Hendry, and L. P. Reagan, “Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent,” *Brain Res.*, **1296**, 35-45 (2009).
 20. S. M. de la Monte, “Insulin resistance and Alzheimer’s disease,” *BMB Reports*, **42**, No. 8, 475-481 (2009).
 21. 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. Alzheimer’s Dis.*, **30**, Suppl. 2, S217-S229 (2012).
 22. D. Kapogiannis and M. P. Mattson, “Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer’s disease,” *Lancet Neurol.*, **10**, 187-198 (2011).
 23. 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).
 24. M. Heni, A. M. Hennige, A. Peter, et al., “Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes,” *PLoS ONE*, **6**, No. 6, e21594 (2011).
 25. 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).
 26. N. A. Babenko and V. S. Kharchenko, “Ceramide inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats,” *Biochemistry*, **77**, No. 2, 180-186 (2012).
 27. N. A. Babenko, L. K. Hassouneh, V. S. Kharchenko, and V. V. Garkavenko, “Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells,” *Age (Dordr.)*, **34**, 905-915 (2012).
 28. Н. А. Бабенко, В. С. Харченко, “Роль церамидов в нарушении инсулинового сигналинга в диафрагме крыс в условиях *in vivo* и *in vitro*”, *Пробл. эндокрин. патологии*, № 1, 37-43 (2009).
 29. N. A. Babenko and V. S. Kharchenko, “Age-related changes in the phospholipase D-dependent signal pathway of insulin in the rat neocortex,” *Neurophysiology*, **45**, No. 2, 120-127 (2013).
 30. 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).
 31. 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).
 32. Y. Xu, B. R. Rubin, C. M. Orme, et al., “Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis,” *J. Cell Biol.*, **193**, No. 4, 643-653 (2011).
 33. 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).
 34. A. Abousalham, C. Liossis, 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).
 35. A. 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).
 36. 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 FcepsilonRI,” *J. Cell Sci.*, **116**, 3177-3187 (2003).
 37. S. Patil, D. Balu, J. Melrose, and C. Chan, “Brain region-specificity of palmitic acid-induced abnormalities associated with Alzheimer’s disease,” *BMC Res. Notes*, **4**, 1-20 (2008).
 38. 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).