

# Роль і регуляція фосфоліпази D у сигнальному каскаді інсуліну в мозку

Н.О. Бабенко, В.С. Харченко

Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна; e-mail: babenko@univer.kharkov.ua

*Вивчали фосфоліпаза D-залежну регуляцію інсуліном поглинання глюкози в неокортексі 3-місячних щурів. Для цього використовували специфічні інгібітори сигнальних шляхів інсуліну (вортманін, LY294002, галопемід, С6-церамід). Встановлено, що в неокортексі щурів пригнічення індукованого інсуліном накопичення фосфатидилетанолу з 163 % в контролі до 115 % під впливом вортманіну та 112 % при дії LY294002 вказує на регуляцію фосфоліпази D фосфатидилінозитол-3-кіназою. Пригнічення галопемідом супроводжується зниженням вмісту міченої глюкози в тканині неокортексу з 154 % в контролі до 111 % під впливом інгібітора. Це свідчить про ключову роль фосфоліпази D у регуляції захоплення глюкози тканиною неокортексу щурів. Крім того, активовані інсуліном фосфоліпаза D і поглинання глюкози в корі головного мозку щурів чутливі до вмісту церамиду, антагоніста сигнальних шляхів інсуліну. Таким чином, можна припустити, що модуляція активності фосфоліпази D за допомогою впливу на внутрішньоклітинний вміст церамідів може бути перспективним напрямком у подоланні резистентності нервової тканини до дії гормонального стимулу.*

*Ключові слова:* фосфатидилінозит-3-кіназа; фосфоліпаза D; інсулін; церамід; неокортекс; щури.

## ВСТУП

Фосфоліпаза D (ФЛД) бере участь у різних сигнальних шляхах, у тому числі в зростанні і розвитку клітин мозку. Її активація є умовою проліферації астроглії, процесів синапто- і мієлогенезу в мозку при формуванні аксонів [1], а також ендоцитозу рецепторів і екзоцитозу нейротрансмітерів [2]. Крім того, утворюється вільний холін, який потрібен для синтезу ацетилхоліну [3]. Мітогенні чинники, нейротрансмітери, фактори росту і гормони активують ФЛД у нейронах і астроцитах. Нині функціональне значення індукованої інсуліном активності ФЛД в мозку залишається невивченим. Однак існують лише поодинокі дані про активацію ФЛД в мозку у відповідь на дію інсуліну [4].

Дія інсуліну на периферичні тканини-мішені полягає в стимуляції поглинання, окиснення і запасання глюкози. В ЦНС він

модулює зростання нейронів і гліальних клітин, їх виживання, диференціювання, міграцію, експресію генів, синтез білка, складання цитоскелета і формування синапсів [5]. Поглинання і утилізація глюкози в мозку опосередковується транспортними білками ГЛЮТ, експресія та функціонування яких регулюється інсуліном. Транспортери ГЛЮТ4, разом з рецепторами інсуліну, широко експресуються в структурах мозку [6] і беруть участь в регуляції процесів енергетичного метаболізму, необхідних для процесів пам'яті і навчання. Швидкість метаболізму глюкози зростає при сенсорній, моторній і когнітивній стимуляції мозку, а також глюкоза потрібна для збереження гомеостазу нейротрансмітерів під час синаптичної активності клітин [7, 8]. Показано, що порушення утилізації глюкози в мозку, пов'язане з його інсулінорезистентністю, опосередковується пригніченням транспорту ГЛЮТ4 між

цитозолем і плазматичною мембраною [9].

У таких периферичних тканинах-мішенях інсуліну, як м'язова і жирова тканини, стимульована інсуліном ФЛД важлива для транслокації транспортерів ГЛЮТ4 у плазматичну мембрану із внутрішньоклітинних депо [10]. У гепатоцитах ФЛД регулюється фосфатидилінозит-3-кіназою (ФІЗ-кіназою) і Akt/протеїнкіназою В [11]. Блокування інсулінзалежної ФЛД за допомогою специфічних інгібіторів супроводжується пригніченням процесів поглинання та накопичення глюкози. Регуляція ФЛД і метаболізму глюкози інсуліном у гепатоцитах чутлива до добре відомого антагоніста сигнальних шляхів інсуліну цераміду. Так, активація інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози і синтезу глікогену пригнічується екзогенним С6-церамідом і ендогенними церамідами, накопичення яких індукуюється фармакологічним препаратом доксорубіцином. Чутливість гепатоцитів відновлюється за допомогою різних специфічних інгібіторів синтезу сфінголіпідів і сфінгомієліназ, які знижують вміст церамідів у клітинах печінки [11].

Метою нашої роботи було вивчення регуляції активності інсулінчутливої ФЛД та поглинання глюкози ключовою молекулою сигнального каскаду гормону ФІЗ-кіназою, а також церамідом у неокортексі щурів.

## МЕТОДИКА

В експериментах використовували 3-місячних щурів-самців лінії Вістар масою 200-250 г. Усі дослідження на тваринах проводили з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Мозок щурів, наркотизованих ефіром, швидко вилучали. Ділянку кори великих півкуль

виділяли на льоду, шматочки тканини отримували механічним подрібнюванням [12]. Для вивчення регуляції ФЛД ФІЗ-кіназою шматочки тканини неокортексу щурів інкубували в бікарбонатному буфері Кребса-Рінгера (рН 7,4) з 0,1%-м альбуміном упродовж 90 хв при 37°C за наявності [<sup>14</sup>C] пальмітоїл-СоА (0,25 мкКі/мл, «Amersham», Англія) і вортманіну (100 нмоль/л, «Sigma», США), або LY294002 (100 нмоль/л, «Sigma», США). Для дослідження впливу ФЛД на поглинання глюкози кору головного мозку інкубували з інгібітором ФЛД галопемідом (300 нмоль/л, «Sigma», США). При вивченні впливу екзогенного синтезованого цераміду на регуляцію інсуліном активності ФЛД і поглинання глюкози шматочки тканини неокортексу щурів інкубували за наявності С6-цераміду (10 мкмоль/л, «Amersham», Англія) або фумонізіну В1 (1 мкмоль/л, «Fluka», Німеччина) та С6-цераміду (10 мкмоль/л), або етанолу в еквівалентному об'ємі (контроль).

Активність ФЛД у неокортексі щурів визначали за утворенням фосфатидилетанолу (ФЕТ), фосфоліпиду, який утворюється винятково ФЛД через трансфосфатидилювання за наявності 50-300 ммоль/л етанолу [11, 13]. ФЕТ, на відміну від фосфатидної кислоти, метаболізується дуже повільно і з огляду на це є індикатором активації ФЛД в стимульованих клітинах. Для визначення активності ФЛД перед внесенням гормону в середовище інкубації, тканину неокортексу, попередньо мічену [<sup>14</sup>C]пальмітоїл-СоА, преінкубували 10 хв з 300 ммоль/л етанолом, потім у середовище інкубації додавали інсулін (10 нмоль/л, «Індар», Україна) або 0,9 %-й NaCl (як контроль до інсуліну) і через 5 або 30 хв зупиняли реакцію крижаною сумішшю хлороформ: метанолу (1: 2 за об'ємом).

Вивчали індуковане інсуліном поглинання 2-деокси-[<sup>3</sup>H]-D-глюкози (0,5 мкКі/мл) тканиною неокортексу [14], а загальний вміст білка – методом Lowry [15]. Прово-

дили екстракцію ліпідів [16], поділ окремих ліпідів – методом тонкошарової хроматографії в системах розчинників – етилацетат:ізооктан:оцтова кислота:вода (130:20:30:100 за об'ємом) для ФЕТ. Для поділу сфінголіпідів використовували системи: діетиловий ефір (система 1) і хлороформ:метанол:вода (40:10:1 за об'ємом; система 2). Плями ліпідів ідентифікували, порівнюючи зі стандартами. Радіоактивність зразків визначали за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА.

Статистичну обробку результатів здійснювали за методом варіаційної статистики з використанням критерію t Ст'юдента. Результати представлені у вигляді середніх арифметичних і стандартного відхилення.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Вплив інгібіторів ФІЗ-кінази на активацію ФЛД і поглинання глюкози. Встановлено, що внесення інгібіторів ФІЗ-кінази вортманіну або LY294002 до інкубаційного середовища тканини кори головного мозку запобігало стимулювальному впливу інсуліну на продукцію ФЛД [ $^{14}\text{C}$ ]ФЕТ, а також на поглинання глюкози (рис.1).

Вплив галопеміду на активацію ФЛД і поглинання глюкози. Для з'ясування впли-

ву інгібування ФЛД на реалізацію сигналу інсуліну в процесі поглинання глюкози тканиною кори головного мозку щурів використовували галопемід. Слід відмітити, що внесення специфічного інгібітора в середовище інкубації кори головного мозку щурів, попередньо міченої  $^{14}\text{C}$ -пальмітиновою кислотою, запобігало накопиченню [ $^{14}\text{C}$ ] ФЕТ та індукції поглинання глюкози при стимулюванні нервової тканини інсуліном (рис.2).

Вплив екзогенного С6-цераміду та інгібітора синтезу сфінголіпідів фумонізину В1 на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози. Встановлено, що в корі головного мозку щурів синтетичний С6-церамід не впливав на базальну активність ФЛД (рис.3), але запобігав стимулюванню інсуліном й активації і поглинання глюкози. Інкубування тканини кори головного мозку щурів за наявності фумонізину В1 – специфічного інгібітора синтезу *de novo* церамідів, попереджало пригнічувальну дію екзогенного С6-цераміду на агоністстимульовану активацію ФЛД і поглинання глюкози.

Було вивчено вплив екзогенного С6-цераміду на вміст ендogenous церамідів. Встановлено, що він підсилює включення міченої  $^{14}\text{C}$ -пальмітинової кислоти до пулу ендogenous церамідів кори головного мозку

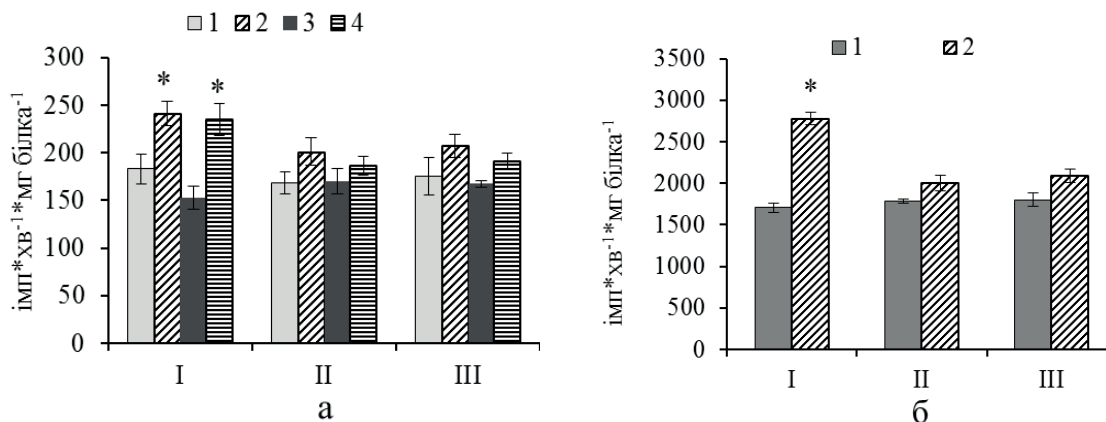


Рис. 1. Вплив інгібіторів фосфатидилінозитол-3-кінази на активацію інсуліном фосфоліпази Д (а) і поглинання глюкози (б): I – контроль; II – вортманін; III – LY294002. На а: 1 – час інкубації з інсуліном 5 хв (контроль до інсуліну), 2 – інсулін; 3 – час інкубації з інсуліном 30 хв (контроль до інсуліну), 4 – інсулін. На б: 1 – контроль; 2 – інсулін. \*  $P \leq 0,05$  відносно контролю до інсуліну (0,9%-й NaCl)

шурів, про що свідчить підвищення вмісту  $^{14}\text{C}$ -цераміду (рис.4). Водночас попередня інкубація тканини неокортексу з інгібітором синтезу *de novo* церамідів фумонізином В1 запобігала індукції накопичення мічених ендогенних церамідів.

## ОБГОВОРЕННЯ

Інсулін стимулює активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогену в класичних експериментальних мішенях (м'язи, клітини печінки). Раніше в нашій лабораторії було показано, що він індукує активацію ФЛД, а також стимулює поглинання глюкози в корі головного мозку 3-місячних шурів [11, 17]. Однак роль ФЛД у регуляції інсуліном поглинання глюкози в корі головного мозку

залишається не цілком зрозумілою. У клітинах печінки ФЛД, що індукується інсуліном, контролюється ФІЗ-кіназою [11].

Нещодавно було встановлено, що тканини мозку є чутливими до інсуліну і структура сигнального каскаду цього гормону подібна до такої в периферичних тканинах [5]. Центральною регуляторною ланкою сигнального каскаду інсуліну в периферичних тканинах (м'язовій, жировій та клітинах печінки) є ФІЗ-кіназа. Активація гормоном сигнального шляху ФІЗ-кінази викликає транслокацію інсулінчутливих транспортерів глюкози в плазматичну мембрану і посилення поглинання глюкози клітинами. Раніше вважалося, що цей процес в мозку є незалежним від дії інсуліну [18]. Однак деякі дослідники показали, що нейрони гіпокампа

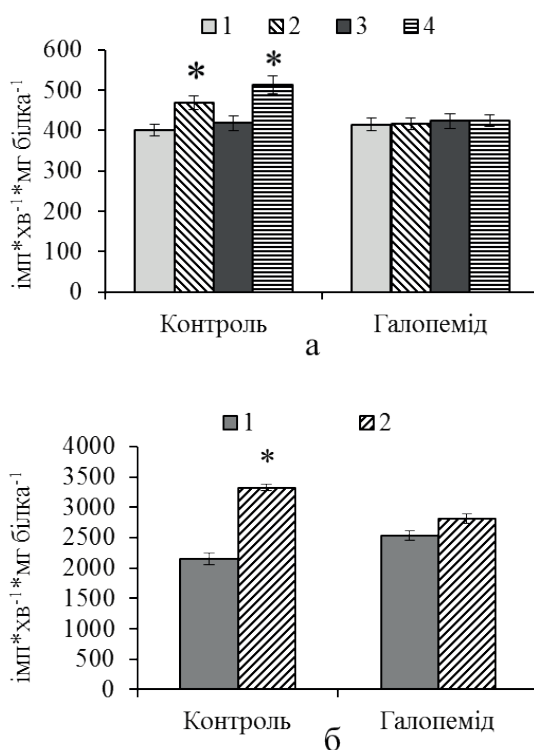


Рис. 2. Вплив галопеміду на активацію інсуліном фосфоліпази Д (а) і поглинання глюкози (б) в корі головного мозку шурів. На а: 1 – час інкубації з інсуліном 5 хв (контроль до інсуліну), 2 – інсулін; 3 – час інкубації з інсуліном 30 хв (контроль до інсуліну), 4 – інсулін. На б: 1 – контроль; 2 – інсулін. \*  $P \leq 0,05$  відносно контролю до інсуліну (0,9%-й NaCl)

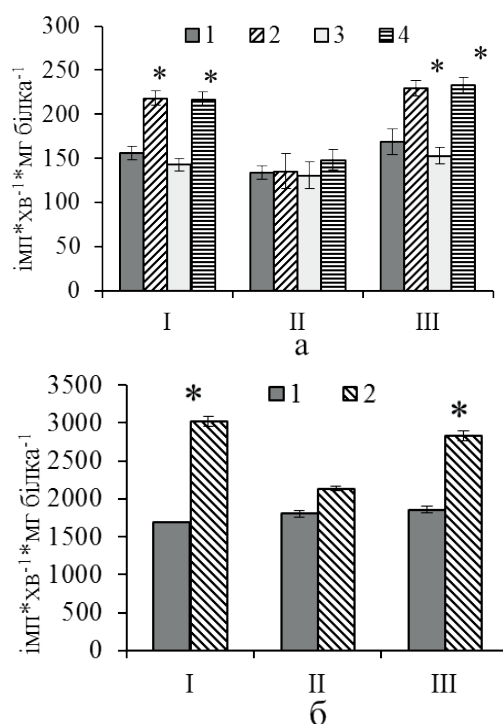


Рис. 3. Вплив екзогенного С6-цераміду і фумонізину В1 на активацію інсуліном фосфоліпази Д (а) і поглинання глюкози (б) в корі головного мозку шурів: I – контроль; II – С6-церамід; III – фумонізин В1 і С6-церамід. На а: 1 – час інкубації з інсуліном 5 хв (контроль до інсуліну), 2 – інсулін; 3 – час інкубації з інсуліном 30 хв (контроль до інсуліну), 4 – інсулін. На б: 1 – контроль; 2 – інсулін. \*  $P \leq 0,05$  відносно контролю до інсуліну (0,9%-й NaCl)

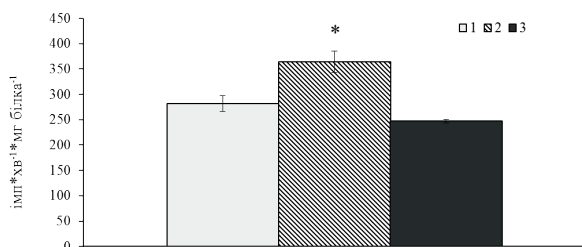


Рис. 4. Вплив екзогенного С6-цераміду і фумонізіну В1 на утворення мічених ендогенних церамідів в корі головного мозку щурів: І – контроль; ІІ – С6-церамід; ІІІ – фумонізін В1 і С6-церамід. \*  $P \leq 0,05$  порівняно з контролем

експресують високий вміст рецепторів інсуліну [19], транспортерів глюкози ГЛЮТ4 [20] і ФІЗ-кінази [21] і можуть бути чутливі до дії інсуліну. Гормон викликає транслокацію ГЛЮТ4 в мембрани гіпокампаальних нейронів за механізмом, що подібний за дією на периферичні тканини-мішені [20]. Водночас у кортикальних астроцитах метаболізм глюкози може контролюватися сигнальним шляхом, залежним від ФІЗ-кінази та Akt/протеїнкінази В [21], або незалежно від Akt/протеїнкінази В, через протеїнкіназу С і ФЛД [22]. Щоб з'ясувати чи опосередковує ФІЗ-кіназа дію інсуліну на активацію ФЛД і поглинання глюкози в корі головного мозку нами були використані специфічні інгібітори ФІЗ-кінази вортманін і LY294002. Слід відмітити, що вони пригнічують як стимульовану інсуліном активацію ФЛД, так і індуковане гормоном поглинання глюкози тканиною кори головного мозку 3-місячних щурів. Отримані результати свідчать про те, що активація ФЛД інсуліном і поглинання глюкози в нервовій тканині контролюються ФІЗ-кіназою.

Для з'ясування внеску ФЛД у регуляцію поглинання глюкози інсуліном у корі головного мозку тканину мозку було попередньо проінкубовано з галопемідом. Цей препарат і його аналоги є інгібіторами ФЛД1/ФЛД2, вони не токсичні для клітин і не впливають на ключові молекули інсулінового сигнального шляху (Akt/протеїнкіназа В і ERK), а також на внутрішньоклітинний розподіл ФЛД [23].

Дія інгібітора спрямована безпосередньо на пригнічення каталітичної активності ферменту. У літературі немає даних щодо впливу галопеміду на ФЛД мозку. Нами вперше було показано, що він нівелює стимулюючу дію інсуліну на її активність і достовірно редукує поглинання глюкози в неокортексі щурів.

Церамід – інгібітор сигналізації інсуліну в клітинах, чутливих до дії гормону. Він за допомогою дефосфорилування пригнічує активацію і транслокацію Akt/протеїнкінази В у мембрану та синтез глікогену [24]. ФЛД є мішенню дії цераміду в клітинах [25]. Пригнічення ферменту відбувається через деактивацію протеїнкінази С, мономерних G-білків, блокування транскрипції гена ФЛД або безпосередньо через зв'язування каталітичного ядра ферменту [26]. Коротколанцюгові екзогенні С2- і С6-цераміди пригнічують мітогенні ефекти ФЛД у фібробластах. Внесення в середовище інкубування гепатоцитів С6-цераміду вибірково знижує активність і експресію ФЛД1, редукує базальну і стимульовану інсуліном активність ФЛД і поглинання глюкози в клітинах печінки [11]. Показано, що у клітинах коротколанцюгові синтетичні цераміди можуть гідролізуватися до сфінгозину і долучатися до синтезу ендогенних довголанцюгових церамідів, тим самим викликаючи підвищення їх концентрації [25]. Внесення в середовище культивування тканини кори головного мозку щурів синтетичного С6-цераміду викликало підвищення вмісту мічених  $^{14}\text{C}$ -пальмітиновою кислотою ендогенних церамідів. Крім того, збільшення концентрації ендогенних церамідів супроводжувалося пригніченням інсулінзалежної активації ФЛД і поглинання глюкози в нервовій тканині. Водночас запобігання накопиченню ендогенних церамідів за допомогою специфічного інгібітора синтезу сфінголіпідів, а саме фумонізіну В1, нівелювало інгібувальну дію С6-цераміду на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози. Та-



ким чином, внесення в середовище інкубації тканини неокортексу щурів екзогенних керамідів призводить до індукції накопичення довголанцюгових ендогенних керамідів, які, ймовірно, опосередковують дію синтетичних сфінголіпідів на ФЛД-залежну ланку сигнального каскаду інсуліну.

У нашій роботі встановлено, що в корі головного мозку щурів індуковане інсуліном поглинання глюкози залежить від регуляції активності ФЛД. Активація гормоном ФЛД-залежного сигнального шляху може блокуватися специфічними інгібіторами ФІЗ-кінази. Це свідчить про те, що ФЛД у сигнальному каскаді інсуліну в корі головного мозку знаходиться після ФІЗ-кінази. Використання специфічного інгібітора галопеміду доводить участь ФЛД у процесі регуляції інсуліном поглинання глюкози в корі головного мозку щурів. ФЛД-залежний сигнальний шлях інсуліну і поглинання глюкози в корі головного мозку чутливі до зміни вмісту кераміду, антагоніста сигнальних шляхів гормону. Модуляція активності ФЛД за допомогою впливу на внутрішньоклітинний вміст керамідів є новою мішенню в подоланні порушення чутливості нервової тканини до дії гормонального стимулу.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Н.А. Бабенко, В.С. Харченко**

## **РОЛЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ Д В СИГНАЛЬНОМ КАСКАДЕ ИНСУЛИНА В МОЗГУ**

Изучали фосфолипаза Д-зависимую регуляцию инсулином поглощения глюкозы в неокортексе 3-месячных крыс. Для этого использовали специфические ингибиторы сигнальных путей инсулина (вортманнин, LY294002, галопемид, С6-керамид). Установлено, что в неокортексе крыс подавление индуцированного

инсулином накопления фосфатидилэтанола с 163 % в контроле до 115 % под влиянием вортманнина и 112 % при действии LY294002 указывает на регуляцию фосфолипазы Д фосфатидилинозитол-3-киназой. Подавление галопемидом сопровождается снижением содержания меченой глюкозы в ткани неокортекса с 154% в контроле до 111% под влиянием ингибитора. Это свидетельствует о ключевой роли фосфолипазы Д в регуляции захвата глюкозы тканью неокортекса. Кроме того, активированные инсулином фосфолипаза Д и поглощение глюкозы в коре головного мозга крыс чувствительны к содержанию керамидов, антагониста сигнальных путей инсулина. Таким образом можно предположить, что модуляция активности фосфолипазы Д при помощи влияния на внутриклеточный уровень керамидов может быть перспективным направлением в преодолении резистентности нервной ткани к действию гормонального стимула.

Ключевые слова: фосфатидилинозитол-3-киназа; фосфолипаза Д; инсулин; керамид; неокортекс; крысы.

**N.A. Babenko, V.S. Kharchenko**

## **THE ROLE AND REGULATION OF PHOSPHOLIPASE D IN BRAIN INSULIN SIGNALING PATHWAY**

The role of phospholipase D as a positive modulator of glucose uptake activation by insulin in the neocortex of 3-month-old rats were studied by using specific inhibitors of signaling pathways of insulin (wortmannin, LY294002, haloperimide, C6-ceramide). It was found that in the rat neocortex inhibitors decreased the insulin-induced accumulation of phosphatidylethanol from 163% in the control to 115% under the influence of wortmannin and 112% under the action of LY294002. Inhibition of insulin stimulated phospholipase D by phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors (wortmannin and LY294002) indicated downstream regulation of phospholipase D by phosphatidylinositol-3-kinase. The suppression of this phospholipase by a specific inhibitor haloperimide is accompanied by a decrease in the amount of labeled glucose in the neocortical tissue from 154% in the control to 111% under the influence of the inhibitor. Inhibition of insulin-induced glucose uptake by specific inhibitor of phospholipase D haloperimide points to the key role of the enzyme in the regulation of glucose uptake in the rat neocortex. In addition, phospholipase D-dependent insulin signaling and glucose uptake in the rat cerebral cortex are highly sensitive to intracellular ceramide content. The results obtained in this study provide that modulation of PLD activity, as well as ceramides content in the cells, can be a useful tool for manipulating the nerve tissue sensitivity to insulin action. Key words: phosphatidylinositol-3-kinase; phospholipase D; insulin; ceramide; neocortex; rats.

*Research Institute of Biology of the V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: babenko@univer.kharkov.ua*

## REFERENCES

1. Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H. Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791(9):898-904.
2. Rankovic M, Jacob L, Rankovic V, Brandenburg LO, Schröder H, Höllt V, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates mu-opioid receptor trafficking and signaling via activation of phospholipase D2. *Cell Signal*. 2009; 21(12):1784-93.
3. Lee HC, Fellenz-Maloney MP, Liscovitch M, Blusztajn JK. Phospholipase D-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine provides the choline precursor for acetylcholine synthesis in a human neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(21):10086-90.
4. Salvador GA, Ilincheta de Boschero MG, Pasquaré SJ, Giusto NM. Phosphatidic acid and diacylglycerol generation is regulated by insulin in cerebral cortex synaptosomes from adult and aged rats. *J Neurosci Res*. 2005; 81(2):244-52.
5. Laron Z. Insulin and the brain. *Arch Physiol Biochem*. 2009; 115(2):112-6.
6. Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26(10):1285-97.
7. Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Ring A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels. *J Neurochem*. 2009; 109 Suppl 1:87-93.
8. Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, et al. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci*. 2005; 119(5):1389-95.
9. Xu Y, Rubin BR, Orme CM, Karpikov A, Yu C, Bogan JS, Toomre DK. Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis. *J Cell Biol*. 2011; 193(4):643-53.
10. Huang P, Altshuller YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA. Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell*. 2005; 16(6):2614-23.
11. Babenko NA, Kharchenko VS. Modulation of insulin sensitivity of hepatocytes by the pharmacological downregulation of phospholipase D. *Int J Endocrin*. 2015; 794838.
12. Mokrushin AA, Pavlinova L I. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. *Gen Physiol Biophys*. 2013; 32: 489-504.
13. Oliveira TG, Di Paolo G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801(8):799-805.
14. Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide AM, Krebs N, et al. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS ONE*. 2011; 6(6): e21594.
15. Lowry ON, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:365-75.
16. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37(8):911-17.
17. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of aging and experimentally induced signal pathway modifications on insulin-induced changes of glucose metabolism in rat cerebral cortex. *Neurophysiol*. 2015; 47(1):16-22.
18. Hasselbalch SG, Knudsen GM, Videbaek C, Pinborg LH, Schmidt JF, Holm S, et al. No effect of insulin on glucose blood-brain barrier transport and cerebral metabolism in humans. *Diabetes*. 1999; 48(10):1915-21.
19. Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R. Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience*. 1997; 80(4):1033-40.
20. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3):13-24.
21. Jacques-Silva MC, Bernardi A, Rodnight R, Lenz G. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology*. 2004; 67(5-6):450-9.
22. Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. ATP-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *J Neurochem*. 1999; 73(1):334-43.
23. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev*. 2011; 111(10):6064-119.
24. Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C $\zeta$ : implications for growth arrest. *J Biol Chem*. 2002; 277(5):3286-92.
25. Pasquaré SJ, Gaveglia VL, Giusto NM. Regulation of phosphatidic Acid metabolism by sphingolipids in the central nervous system. *J Lipids*. 2011; 2011:342576.
26. Nakashima S, Nozawa Y. Possible role of phospholipase D in cellular differentiation and apoptosis. *Chem Phys Lipids*. 1999; 98(1-2):153-64.

*Матеріал надійшов  
до редакції 08.07.2016*