Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Харченко Віталіна Сергіївна

УДК 577.115:577.175.72:612.67

ДИСЕРТАЦІЯ

«РОЛЬ СФІНГОЛІПІДІВ В МОДУЛЯЦІЇ ФОСФОЛІПАЗА Д-ЗАЛЕЖНОГО СИГНАЛІНГА ІНСУЛІНА В СТАРОСТІ»

Спеціальність 03.00.04 – «Біохімія»
(Біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____В. С. Харченко

Науковий керівник: Бабенко Наталія Олексіївна, доктор біологічних наук, професор

Харків – 2018

АНОТАЦІЯ

Харченко В. С. Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга інсуліна в старості. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (Біологічні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2018.

Наведено результати дослідження деяких особливостей змін регуляції інсуліном фосфатидилхолін-залежної фосфоліпази Д і обміну глюкози в клітинах печінки, м'язовій тканині і неокортексі щурів лінії Вістар, які відбуваються в старості та за умов моделювання порушення чутливості клітин- та тканин-мішеней до дії гормонального стимулу.

На першому етапі цього дослідження було вивчено дію інсуліна на активність фосфоліпази Д в різних тканинах щурів. Для визначення стимульованої інсуліном активації ендогенної фосфоліпази Д в тканинах щурів використовували метод, заснований на утворенні фосфатидилетанолу або фосфатидилбутанолу, які продукуються тільки фосфоліпазою Д, у реакції трансфосфатидилювання в присутності первинних спиртів (етанолу або бутанолу). Встановлено, що внесення інсуліна в середовище інкубації клітин печінки, м'язової тканини або тканини неокортексу статистично значимо збільшує активність фосфоліпази Д. Інсулін стимулює продукцію фосфатидилетанолу і зниження вмісту субстрату фосфоліпази Д, фосфатидилхоліну в тканинах, мічених [^{14}C]пальмітиновою кислотою.

За допомогою загального антагоніста фосфоліпази Д (1-бутанолу) та інгібітора фосфатази фосфатидної кислоти (пропранололу) було показано пригнічення утворення та накопичення фосфатидної кислоти та диацилгліцеролу фосфоліпазою Д і скасування стимулюючого ефекта інсуліна на активність фосфоліпази Д і поглинання глюкози в ізольованих гепатоцитах 3-місячних щурів,

отримані результати свідчать про участь фермента в сигнальній трансдукції інсуліна.

Для з'ясування на якому етапі сигнального каскаду інсуліна задіяно фосфоліпазу Д в клітинах печінки та неокортексі молодих щурів були використані специфічні інгібітори ключових ферментів учасників сигнальної трансдукції гормону. Індуковану інсуліном активацію сигнального шляху фосфоліпаза Д/фосфатидна кислота в клітинах печінки та неокортексі молодих тварин було заблоковано специфічними інгібіторами фосфатидилінозітол-3-кінази – вортманіном та LY294002. Отримані дані доводять, що фосфоліпаза Д активується інсуліном в сигнальному каскаді після фосфатидилінозітол-3-кінази.

На наступному етапі даного дослідження було вивчено вплив флавонів, лютеоліну і апігеніну, на фосфоліпаза Д-залежний сигналінг інсуліна в первинній культурі гепатоцитів. Показано, що лютеолін, апігенін та їх глікозильовані форми є модуляторами сигнальних шляхів інсуліна в клітинах-мішенях. Обидва флавони інгібують стимульовані інсуліном фосфорилювання/активацію Akt/протеїнкінази B, транслокацію ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану і поглинання глюкози. У цій роботі було досліджено вплив лютеолін-7-глюкозида і апігенін-7-глюкозида на активність фосфоліпази Д, поглинання глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах щурів, стимульованих інсуліном. З огляду на те, що лютеолін пригнічує стимульоване інсуліном фосфорилювання β-субодиниці рецептора інсуліна, а апігенін має тільки тенденцію до пригнічення фосфорилювання інсулінового рецептора, в цьому дослідженні було проведено експерименти двох типів: (1) флавони додавали в інкубаційне середовище перед інсуліном; (2) флавони додавали після внесення гормона. Фарбування трипановим синім не показало порушення проникності мембран гепатоцитів при дії лютеолін-7-глюкозіда або апігенін-7-глюкозіда. Внесення флавонів у середовище інкубації гепатоцитів перед інсуліном або після нього, супроводжувалося значним зниженням активації інсуліном ФЛД, а також поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах щурів, в той час як флавони не змінювали активність ФЛД і метаболізм глюкози в нестимульованих клітинах.

Для подальшого вивчення участі та ролі фосфоліпази Д в сигналінгу інсуліна в клітинах- і тканинах-мішенях, ми використовували специфічний інгібітор фосфоліпази Д, галопемід та антагоніст стимульованої активності фермента, церамід. Активація фосфоліпази Д, також як і поглинання глюкози або утворення глікогена, в стимульованих інсуліном клітинах, були значно пригнічені за допомогою екзогенного С6-цераміду. Враховуючи те, що церамід може діяти не тільки на сигнальний шлях фосфоліпаза Д/фосфатидна кислота, але й впливати на функціонування інших учасників сигнальних шляхів інсуліна, зокрема фосфатидилінозітол-3-кіназу або Akt/протеїнкіназу В, за допомогою використання специфічного інгібітора фосфоліпази Д – галопеміда – було досліджено чи бере участь фермент в регуляції метаболізму глюкози інсуліном. Галопемід пригнічував активність фосфоліпази Д і значно редукував стимуляцію поглинання глюкози і синтеза глікогена інсуліном, як в гепатоцитах, так і в неокортексі молодих щурів. Таким чином, на даному етапі дослідження було встановлено, що активована інсуліном фосфоліпаза Д задіяна в реалізації сигнала гормона на процеси поглинання та запасання глюкози.

В наступній частині дослідження встановлено, що в умовах вікового підвищення рівня внутрішньоклітинних церамідів відбувається пригнічення індукованої інсуліном активності фосфоліпази Д поряд із стимульованим гормоном обміном глюкози в клітинах печінки, діафрагмі і неокортексі щурів. За умов моделювання порушення чутливості тканин-мішеней до дії інсуліна за допомогою дієти з високим вмістом насичених жирних кислот, в умовах *in vivo*, відбуваються зміни ліпідного спектру клітин- і тканин-мішеней та порушення активації фосфоліпази Д. В умовах *in vitro* при культивуванні клітин печінки, тканини діафрагми і неокортексу молодих щурів за наявності попередників синтеза сфінголіпідів – пальмітинової кислоти, С2-цераміду – та індукторів утворення цераміду, протипухлинних препаратів – паклітакселу й доксорубіцину – відбувається стимулювання синтеза і накопичення ендогенних церамідів. За допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів (міріоцина,

фумонізина B1) та сфінгомієліназ (іміпраміну, GW4869) встановлено, що пальмітинова кислота і С2-церамід індукують синтез ендогенного цераміду *de novo*, а доксорубіцин і паклітаксел підвищують вміст сфінголіпіду як шляхом синтеза, так і активуючи сфінгомієлінази. Використанням інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ встановлено, що саме знову синтезований церамід пригнічує фосфоліпаза Д-залежну ланку сигнального шляху інсуліна при моделюванні стану порушення чутливості клітин печінки молодих щурів за допомогою попередників церамідів (пальмітинової кислоти і С2-цераміду) та індуктора накопичення церамідів паклітакселу. Крім того, внесення суміші інгібіторів синтеза та деградації сфінголіпідів сприяє відновленню активаці інсуліном фосфоліпази Д, процесів поглинання глюкози і утворення глікогена за рахунок зниження рівня ендогенного цераміду. Викликане сфінголіпідами пригнічення фосфоліпаза Д-залежного сигналінгу інсуліна може бути важливою причиною порушення функціонування м'язової, нервової тканини і печінки в старості і передувати розвитку різних патологій.

Таким чином, модуляція активності фосфоліпази Д в клітинах за допомогою специфічних інгібіторів може стати зручним інструментом для регулювання чутливості клітин печінки і неокортексу до дії інсуліна. Одержані дані про активацію фосфоліпази Д інсуліном і регуляцію цього ферменту ключовими учасниками сигнального каскаду гормону фосфатидилінозітол-3-кіназою, Akt/протеїнкіназою B і фосфатазою фосфатидної кислоти розкривають раніше не вивчені аспекти сигнальної трансдукції інсуліна в клітинах печінки та неокортексі. Вплив активації інсуліном фосфоліпази Д на метаболізм глюкози розширює класичні уявлення про реалізацію сигнала інсуліна, розкриває функціональне значення індукції інсуліном фосфоліпази Д і надає нову терапевтичну мішень для пошуку шляхів подолання проблеми порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів. Отримані дані про пригнічення фосфоліпаза Д-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна і процесів обміну глюкози в старості поглиблюють уявлення про клітинні механізми розвитку вікової нечутливості

клітин-мішеней до дії інсуліна. У той же час, за допомогою модуляції вмісту сфінголіпідів специфічними інгібіторами, які представляють собою затверджені лікарські засоби, встановлена оборотність цих процесів. Такий підхід до відновлення чутливості клітин і тканин-мішеней до дії інсуліна надає перспективи для пошуку нових шляхів у подоланні вікових патологій, пов'язаних з порушенням чутливості до інсуліна.

Ключові слова: церамід, сфінголіпіди, фосфоліпаза Д, інсулін, старіння, гепатоцити, неокортекс, діафрагма.

ABSTRACT

Kharchenko V.S. Role of sphingolipids in the modulation of phospholipase D-dependent insulin signaling in old age. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Biology: Specialty 03.00.04 – Biochemistry (Biology). – V. N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2018.

Through the present study some special aspects of the insulin-induced phosphatidylcholine-dependent phospholipase D activity regulation and glucose metabolism in liver cells, muscle tissue and neocortex of Wistar rats during aging and by model experiments of the hormonal resistance were determined.

In the first phase of this study, the effects of insulin on the phospholipase D activity in various rat tissues were studied. To determine the phospholipase D activity in rat tissues and isolated hepatocytes, a sensitive assay was used. The method was based on formation of phosphatidylethanol or phosphatidylbutanol, which were produced only by phospholipase D as a result of transphosphatidylation in the presence of ethanol or butanol. Once synthesized, the phosphatidylethanol and phosphatidylbutanol metabolized very slowly and, therefore, could be used as an indicator of phospholipase D activation in stimulated cells. It was established that the insulin significantly increases the activity of phospholipase D in the liver cells, muscle tissue or neocortex tissues. Insulin stimulates

the production of phosphatidylethanol and decreases the content of phospholipase D substrate, phosphatidylcholine in tissues labeled with [^{14}C]palmitic acid.

The general antagonist of phospholipase D (1-butanol) and phosphatidate phosphohydrolase inhibitor (propranolol) reduced of the formation and accumulation of phosphatidic acid and diacylglycerol by phospholipase D and abolished the stimulating insulin effect on phospholipase D activity and glucose uptake in primary hepatocytes of three-month-old rats. These results indicate the enzyme's participation in signaling transduction of insulin.

To find out the stage of insulin signaling cascade involved phospholipase D in the liver cells and neocortex of young rats, specific inhibitors of the key enzymes of the hormone signal transduction were used. Insulin induced activation of phospholipase D/phosphatidic acid signaling pathway in liver cells and neocortex of young animals was blocked by specific inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase – wortmannin and LY294002. Obtained results have demonstrated that in the insulin-stimulated hepatocytes the phospholipase D/phospatidic acid pathway was activated downstream of PI3-kinase and possibly Akt. prove that phospholipase D is activated by insulin in the signal cascade after phosphatidylinositol-3-kinase.

At the next stage of this study, the effects of flavones, luteolin and apigenin, on phospholipase D-dependent insulin signaling in the primary hepatocytes culture were studied. Luteolin (LU7Glu) and apigenin (AP7Glu) and their glycosidic forms are well known modulators of insulin signaling in the target cells. Both flavones inhibit insulin-stimulated Akt phosphorylation/activity, Glut4 translocation into the plasma membrane, and glucose uptake. In the present work, we studied effects of LU7Glu and AP7Glu on PLD activity and glucose uptake and glycogen synthesis in the rat hepatocytes, stimulated by insulin. Taking into account the fact that luteolin inhibits insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor- β subunit, and apigenin only tended to inhibit the IR-phosphorylation, in the present study we performed experiments of two types: (1) flavones were added to the incubation media prior to insulin; (2) flavones were added after insulin addition. Trypan Blue staining indicated that there was no disruption of hepatocytes

membranes under LU7Glu or AP7Glu action. Flavones addition to the incubation media prior to or after insulin was accompanied by significant reduction of insulin-stimulated phospholipase D activity, as well as glucose uptake and glycogen synthesis in rat hepatocytes. While flavones did not alter the phospholipase D activity and glucose metabolism in the nontreated cells. No difference was found between these two types of experiments.These results suggest that both drugs, LU7Glu and AP7Glu, act mainly downstream of insulin receptor and are potent suppressors of insulin stimulated phospholipase D and glucose metabolism in the liver cells.

To study phospholipase D functions in insulin signaling of target cells and tissues a specific inhibitor of phospholipase D, halopemide and an antagonist of stimulated phospholipase D activity, ceramide were used. The phospholipase D activation, as well as glucose uptake or glycogen formation, in insulin-stimulated cells were significantly suppressed by exogenous C6-ceramide. Given that ceramide can affect not only on the signaling pathway of phospholipase D/phosphatidic acid, but also to affect the function of other participants of insulin signaling pathways, in particular phosphatidylinositol-3-kinase or Akt/protein kinase B, using a specific phospholipase D inhibitor – halopemide – whether the enzyme is involved in the regulation of glucose metabolism by insulin were investigated. Halopemide inhibited phospholipase D activity and significantly reduced stimulation of glucose uptake and insulin glycogen synthesis, both in hepatocytes and in neocortex of young rats. Thus, at this stage of the study, it was found that insulin-activated phospholipase D is involved in the implementation of a hormone signal on glucose metabolism.

In the next part of the study, the increase of the intracellular ceramide levels in ageing were found. Under these conditions the inhibition of insulin-induced phospholipase D activity, hormone stimulated glucose uptake and storage in liver cells, diaphragm and neocortex of rats are suppressed. Changes in the lipid spectrum of target cells and tissues and phospholipase D activity inhibition occure in the experimentaly induced resistance of the target tissues to the insulin action *in vivo* by a high saturated fatty acids diet, or *in vitro* by cultivation of young rat liver cells, tissue diaphragm and neocortex in the presence of

sphingolipid synthesis precursors – the palmitic acid and the C2-ceramide – or inductors of ceramide formation, cytostatic drugs – the paclitaxel and the doxorubicin – which stimulate the synthesis and accumulation of endogenous ceramides. Using the specific inhibitors of the sphingolipids synthesis (myriocin, fumonisin B1) and sphingomyelin degradation (imipramine, GW4869), it was found that palmitic acid and C2-ceramide induce the synthesis of endogenous ceramide *de novo*, while doxorubicin and paclitaxel increase the content of sphingolipid both by synthesis *de novo* and by sphingomyelinase activation. Using inhibitors of the sphingolipids synthesis and sphingomyelin degradation, it was found that the newly synthesized ceramides suppress phospholipase D-dependent stage of the insulin signaling pathway in the experimentaly induced hormonal resistance of the young rat liver cells by the ceramide precursors (palmitic acid and C2-ceramide) and by the inducers of ceramides accumulation the paclitaxel and doxorubicin. In addition, introducing a mixture of inhibitors of the synthesis of sphingolipids and sphingomyelinases contributes to the restoration of insulin activating phospholipase D, glucose uptake and glucose formation by reducing the level of endogenous ceramide. Induced by sphingolipids, the inhibition of phospholipase D-dependent signaling of insulin can be an important cause of impaired functioning of muscle, nervous tissue and liver in old age and precede the development of various pathologies.

Thus, the modulation of the phospholipase D activity in cells with specific inhibitors can be a convenient tool for controlling the sensitivity of liver cells and neocortex to insulin action. Obtained data of the activation of phospholipase D insulin and the regulation of this enzyme by key molecules of the hormone signaling cascade, the phosphatidylinositol-3-kinase, Akt/protein kinase B, and phosphatase phosphohydrolase reveal previously unknown aspects of insulin signaling transduction in liver cells and neocortex. The effects of insulin activation of phospholipase D on glucose metabolism extend the classical presentation of the implementation of an insulin signal, reveal the functional significance of insulin induction of phospholipase D, and provide a new therapeutic target to overcome the problem of cellular sensitivity to hormonal stimuli. Obtained data on the suppression of phospholipase D-dependent stage of the insulin

signaling cascade and the processes of glucose metabolism in old age clearify the cellular mechanisms of age-related resistance development of target cells to insulin action. At the same time, modulation of the sphingolipid contents by specific inhibitors, which are approved pharmacological compaunds, established the reversibility of these processes. Such an approach to restoring the sensitivity of cells and target tissues to insulin action provides prospects for finding new approaches to overcoming age-related pathologies associated with a disturbance of sensitivity to hormonal stimuli. Pharmacological modulation of phospholipase D activity, as well as ceramides content in the cells, can be a useful tool for manipulating the target cells and tissues sensitivity to insulin action.

Key words: ceramide, sphingolipids, phospholipase D, insulin, aging, hepatocytes, neocortex, diaphragm

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Effects of Aging and Experimentally Induced Modifications of Signal Pathways on Insulin-Induced Shifts of Glucose Metabolism in the Rat Neocortex. Neurophysiology [Internet]. 2015 Feb 24;47(1):16–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-015-9491-4. (SCOPUS).

2. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Age-Related Changes in the Phospholipase D-Dependent Signal Pathway of Insulin in the Rat Neocortex. Neurophysiology. 2013;45(2):120-127. (SCOPUS).

3. **Харченко ВС.** Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе молодых крыс // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2012. [cited 2017 Jun 1]; 15(1008):41–49. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VKhb_2012_1008_15_7

4. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Роль церамідов в нарушении інсулінового сигналинга в диафрагме крыс в условиях in vivo и in vitro. Проблеми ендокринної патології. 2009;1:37–43. 1. [Цитовано 2017 Вер 30]; Available from: http://www.jpep.endocrinology.org.ua/issues/2009_01/2009_01.pdf.

Статті, що входять до міжнародних наукометричних баз

5. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2015 Jan 21 [cited 2017 Jun 5];80(1):104–12. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297915010125 (SCOPUS, PubMed).

6. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. Int J Endocrinol [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 4];2015:794838. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ije/2015/794838/ (SCOPUS, PubMed).

7. Babenko N, Hassouneh L, **Kharchenko V**, Garkavenko V. Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells. Age (Omaha) [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2017 Sep 30];34(4):905–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796379 (SCOPUS, PubMed*). (Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

8. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2012 Feb 29 [cited 2017 Jun 1];77(2):180–6. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297912020095. (SCOPUS, PubMed).

9. Babenko NA, Semenova YA, **Kharchenko VS.** Effects of Fat-Enriched Diet on the Content of Sphingolipids in the Brain and on Cognitive Functions in Old Rats. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2009 Aug 20 [cited 2017 Sep 30];41(4):258–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-010-9101-4. (SCOPUS). *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

10. Бабенко НА, **Харченко ВС**. Роль фосфолипазы Д в сигнальном каскаде инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання); 2014 Бер. 13-14; Харків. Харків; 2014. с. 25-6.

11. **Харченко ВС.** Экспериментально индуцированные изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах молодых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали XIX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 6(3). с. 148-9.

12. **Харченко ВС**, Белый АН, Бабенко НА. Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д при паклитаксел-индуцированной инсулинорезистентности. В: Укр. біохім. журнал. Матеріали XI Українського

біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(1). с. 216. *(Здобувач брав участь у постановці модельного експерименту, заборі біологічного матеріалу, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

13. Стороженко ГВ, **Харченко ВС**, Бабенко НА. Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

14. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Ceramide synthesis *de novo* involved in insulin signaling disruption and insulin resistance development at old age. III International Symposium Intracellular signaling and bioactive molecules design; 2012 Sept 17-23; Lviv (Ukraine); 2012. 134 p.

15. **Харченко ВС**, Тимофийчук ОА. Возрастные особенности инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в тканях-мишенях. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Ендокринна патологія у віковому аспекті. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю; 2012 Лист. 1-2; Харків. Харків; 2012. с. 87-8. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

16. **Харченко ВС.** Фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе крыс. возрастные и индуцированные изменениюю. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский

институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы X междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 Мая 16-19; Харьков. Харьков; 2012. с. 63-4.

17. **Харченко ВС.** Роль церамидов в нарушении передачи фосфолипаза Д-зависимого сигнала инсулина в неокортексе крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Одинадцяті Данилевські читання); 2012 Бер. 1-2; Харків. Харків, 2012. с.137-8.

18. **Харченко ВС.** Активация инсулином фосфолипазы Д в гепатоцитах крыс. возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы IX междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 Мая 26-29; Харьков. Харьков, 2010. с. 28-9.

19. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті; 2009 Жовт 29-30; Харків. Харків; 2009. с. 16-7.

20. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д и модуляции состояния инсулинорезистентности. В: Асоціація патологів україни Запорізький медичний університет. Матеріали V нац. конгресу патофізіологів України Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів; 2008 Вер. 17-19; Запоріжжя. Запоріжжя; 2008. Т. 5(2). с. 85.

21. Куликова (**Харченко**) ВС. Содержание липидов и индукция инсулином обмена ФХ и фосфатидилэтаноламина в коре головного мозга молодых крыс в условиях высококалорийного рациона и введения кверцетина. В: ГУ «Институт

проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 97.

22. Куликова (**Харченко**) ВС, Никитина ИВ. Возрастные особенности индукции инсулином фосфолипазы Д в коре головного мозга крыс. Влияние кверцетина на сигналинг инсулина в старости. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы VIII междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 Мая 21-24; Харьков. Харьков, 2008. с. 34. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

Статті, що додатково відображають зміст дисертації

23. Бабенко НА, Белый АН, **Харченко ВС.** Роль церамидов с различной длиной ацильной цепи в нарушении функционального состояния клеток печени. Таврический медико-биологический. вестник. 2013 [cited 2017 Sep 30];3(61):29–34. 1. Available from: http://www.csmu.edu.ua/res/200917/Tmbv_2013_16_1(3)__7.pdf *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

Електронне видання

24. **Харченко ВС**, Стороженко ГВ. Влияние насыщенных жиров диеты на содержание липидов и регуляцию инсулином фосфолипазы Д в тканях крыс. Research [Internet]. 2014 May 20 [cited 2017 Sep 30];ru1. Available from: http://www.labome.ru/research/The-effects-of-high-fat-diet-on-lipid-content-and-regulation-of-phospholipase-D-by-insulin-in-rat-ti.html *Дата звернення* 2014-05-20, *дата обновления 2016-04-21 (Здобувач брав участь в плануванні та самостійно*

виконував експериментальну частину роботи, здійснював статистичний аналіз даних, оформлював одержані дані у формі статті).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……..20

ВСТУП…….....21

РОЗДІЛ 1. СИГНАЛЬНА ТРАНСДУКЦІЯ ІНСУЛІНА ТА ЇЇ РЕГУЛЯЦІЯ СФІНГОЛІПІДАМИ (літературний огляд)……..……..…….....28

1. 1 Роль фосфоліпази Д в сигнальній трансдукції……28

1. 1. 1 Структура та функції фосфоліпази Д……..…..……..28

1. 1. 2 Роль фосфоліпази Д в передаванні сигнала інсуліна і інсулін-залежному поглинанні глюкози…….…..……33

1. 2 Сигнальний каскад інсуліна і його реалізація в різних типах тканин-мішеней……..….....37

1. 2. 1 Особливості передавання сигнала інсуліна в м'язовій тканині 37

1. 2. 2 Особливості передавання сигнала інсуліна в клітинах печінки……40

1. 2. 3 Функції інсуліна в центральній нервовій системі…….....42

1. 3 Роль сфінголіпідів у порушенні функціонування сигнального каскаду інсуліна…….....46

Висновки до розділу 1……...…48

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…….....50

2. 1 Постановка експерименту…….....50

2. 2 Експерименти на тканині печінки……...51

2. 2. 1 Виділення первинних гепатоцитів…….……..….51

2. 2. 2 Вивчення впливу 1-бутанолу на активацію інсуліном фосфоліпази Д…….……...52

2. 2. 3 Вивчення впливу галопеміда, С6-цераміда та пропранолола на активацію фосфоліпази Д ……..53

2. 2. 4 Вивчення впливу інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д…….....54

2. 2. 5 Вивчення впливу інгібіторів Akt/протеїнкінази В на активацію фосфоліпази Д інсуліном…….…….....54

2. 2. 6 Вивчення впливу індукторів утворення цераміду і інгібіторів обміну сфінголіпідів і сфінгомієліназ активацію інсуліном фосфоліпази Д…....55

2. 2. 7 Вивчення впливу екзогенних попередників цераміду на стимульовану інсуліном активацію фосфоліпази Д ……..……...55

2. 2. 8 Модулювання інсулін-залежної активації фосфоліпази Д, поглинання глюкози і синтеза глікогена за допомогою інгібіторів метаболізму сфінголіпідів…….….....56

2. 3 Експерименти на м'язовій тканини…….…….…….57

2. 3. 1 Ізолювання тканини діафрагми…….……....57

2. 3. 2 Визначення активності альдолази в середовищі інкубації діафрагми…….....57

2. 4 Експерименти на неокортексі…….…….58

2. 4. 1 Ізолювання тканини неокортексу…….……....58

2. 4. 2 Вивчення впливу галопеміду на активність фосфоліпази Д..……59

2. 4. 3 Вивчення впливу інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази на активацію інсуліном фосфоліпази Д…….……..59

2. 4. 4 Вивчення впливу екзогенних попередників цераміда на стимульовану інсуліном активність фосфоліпази Д……..…….……...60

2. 4. 5 Модулювання інсулін-залежної активації фосфоліпази Д і поглинання глюкози за допомогою інгібіторів метаболізма сфінголіпідів……..60

2. 5 Визначення активності фосфоліпази Д…….…….....60

2. 6 Експерименти з вивчення поглинання глюкози клітинами- і тканинами-мішенями дії інсуліна…….…….…62

2. 6. 1 Визначення поглинання глюкози в клітинах печінки…….……...62

2. 6. 2 Визначення поглинання глюкози м'язовою тканиною…….…..62

2. 6. 3 Визначення поглинання глюкози в неокортексі…….……...63

2. 7 Експерименти з вивчення утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях дії інсуліна……..….....63

2. 7. 1 Вивчення утворення глікогена в клітинах печінки……...63

2. 7. 2 Визначення утворення глікогена в м'язовій тканині і неокортексі……..…..……64

2. 8 Визначення сфінгомієліназної активності в гепатоцитах…….....65

2. 9 Вивчення впливу високожирової дієти на вміст сфінголіпідів і активацію фосфоліпази Д……...65

2. 10 Екстракція ліпідів……....…….…..66

2. 11 Поділ ліпідів за допомогою тонкошарової хроматографії…….....…..66

2. 12 Елюювання ліпідних фракцій…….....67

2. 13 Кількісне визначення ліпідних фракцій…….....…….....67

2. 14 Визначення білка в досліджуваних тканинах……..…...…...67

2. 15 Статистична обробка даних……....…...68

Висновки до розділу 2……...….....68

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ…….……..……..69

3. 1 Роль та регулювання фосфоліпази Д в сигнальному каскаді інсуліна.……69

3. 1. 1 Регуляція фосфоліпази Д в сигнальному каскаді інсуліна в клітинах печінки……..……..69

3. 1. 2 Фосфатидилінозіт-3-кіназо- і фосфоліпазо Д-залежна сигналізація інсуліна в мозку……..….....87

3. 2 Моделювання вікових змін регулювання інсуліном фосфоліпази Д в клітинах- і тканинах-мішенях…….....95

3. 2. 1 Вікові та експериментально індуковані зміни активації фосфоліпази Д інсуліном……...95

3. 2. 2 Вплив екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміда на накопичення цераміда і інсулін-залежну активацію фосфоліпази Д в клітинах- і тканинах-мішенях …….....106

3. 2. 3 Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміду і інгібіторів обміну сфінголіпідів на стимуляцію інсуліном ФЛД в клітинах- і тканинах-мішенях.…….……...116

3. 3 Моделювання вікових змін регулювання інсуліном метаболізма глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях …….…….....125

3. 3. 1 Вікові особливості стимульованого інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях ……...….....125

3. 3. 2 Вплив екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміда на стимульований інсуліном метаболізм глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях ……..…….131

3. 3. 3 Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміда і інгібіторів обміну сфінголіпідів на стимуляцію інсуліном метаболізму глюкози у клітинах- і тканинах-мішенях …….……136

3. 4 Корекція вікового зниження чутливості тканин до дії інсуліна…….…....141

3. 4. 1 Корекція вікового зниження чутливості фосфоліпаза Д-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна …….……..…….141

3. 4. 2 Вплив інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ на регуляцію інсуліном метаболізма глюкози..…….……..……..148

Висновки до розділу 3..……...…….…..156

ВИСНОВКИ…….……158

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….....160

ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації…….…..212

ДОДАТОК 2 Акт впровадження…….....219

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АП7Гл	- апігенін-7-глюкозид
БСА	- бичачий сироватковий альбумін
ВЖК	- вільні жирні кислоти
ГЛЮТ	- транспортер глюкози
ДАГ	- діацилгліцерол
ЖК	- жирні кислоти
ЛЮ7Гл	- лютеолін-7-глюкозид
ПКС	- протеїнкіназа С
СПТ	- серинпальмітоїлтрансфераза
СФМ	- сфінгомієлін
СФМза	- сфінгомієліназа
ТАГ	- триацилгліцерол
ФБУТ	-фосфатидилбутанол
ФЕТ	- фосфатидилетанол
ФІ3-киназа	- фосфатидилінозітол-3-кіназа
ФК	- фосфатидна кислота
ФЛД	- фосфоліпаза Д
ФЛС	- фосфоліпаза С
ФХ	- фосфатидилхолін
ЦМ	- церамід
Akt/ПКВ	- Akt/протеїнкіназа В
ARF	- фактор рибозилювання АДФ
GSK3	- кіназа-3 глікогенсинтази
PIns	- фосфатидилінозіт
PIns4,5P_2	- фосфатидилінозітол-4,5-бісфосфат
Pins3,4,5P_2	- фосфатидилінозітол-3,4,5-трисфосфат

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В процесі старіння зростає ризик виникнення метаболічних захворювань, таких як ожиріння [2], діабет 2 типу [2], нейродегенеративних патологій [3]. Порушення сигналінгу інсуліна є спільною рисою цих патологій [4, 5, 6]. Сигнальні шляхи інсуліна тонко регулюють синтез мітохондріальної ДНК, синтез білків, окисне фосфорилювання, продукцію АТФ, антиоксидантну систему клітин, тому порушення регуляції сигнальних шляхів інсуліна асоційоване з порушенням функцій мітохондрій, розвитком хронічних запальних процесів, що в свою чергу і призводить до виникнення широкого спектру метаболічних захворювань [7, 8]. У клітинах-мішенях інсулін, активуючи рецептори і рецепторні тирозинкінази, індукує послідовну активацію низки сигнальних молекул, таких як фосфатидилінозітол-3-кіназа (ФІ3-кіназа), Akt/протеїнкіназа В (Akt/ПКВ), ARF, протеїнкіназа С (ПКС) і тим самим впливає на регулювання метаболізму глюкози [9]. Недавніми дослідженнями було показано, що в окремих типах клітин інсулін індукує активацію фосфоліпази Д (ФЛД) [10, 11]. На культурі 3Т3-L1 адипоцитів показано, що ФЛД бере участь в ключовому етапі індукованого інсуліном поглинання глюкози жировими клітинами, а саме, в транслокації транспортерів глюкози ГЛЮТ з внутрішньоклітинних депо в плазматичну мембрану. [10, 12]. Експресія каталітично неактивної форми ФЛД-K898R в адіпоцитах, а також використання загального антагоніста ФЛД (1-бутанолу) або нового специфічного інгібітора ФЛД (5-флуорен-2-індол дес-хлорогалопеміда (FIPI)) призводять до пригнічення стимульованої інсуліном транслокации ГЛЮТ в клітинну мембрану і пригнічення поглинання глюкози жировими клітинами [10, 12, 13]. Також показана активація інсуліном ФЛД в гепатоцитах [14] і синаптосомах кори головного мозку молодих статевозрілих щурів, проте функціональне значення цього процесу не встановлено [15]. ФЛД, гідролізує фосфатидилхолін (ФХ) до фосфатидної кислоти (ФК) і холіну, локалізується у внутрішніх компартментах клітин і в ліпідних рафтах плазматичної мембрани [16]. Фермент регулює процеси клітинного транспорту, реорганізації цитоскелету, ендоцитозу і екзоцитозу

рецепторів, міграції клітин, а також є критично важливим регулятором проліферації, виживання і трансформації клітин [17]. Беручи до уваги важливу роль ФЛД в регуляції клітинної фізіології і поодинокі дані про активацію інсуліном ФЛД та участі ліпази в реалізації сигнала інсуліна, актуальним є вивчення функціональної ролі ФЛД в клітинах і тканинах-мішенях дії інсуліна в умовах вікзалежних і експериментально індукованих змін ліпідного обміну клітин- і тканин-мішеней.

В старості, а також при розвитку стану інсулінорезистентності встановлено підвищення вмісту сфінголіпіда цераміда в клітинах [18, 19, 20, 21, 22]. Показано, що екзогенний церамід пригнічує активність ключових учасників сигнальних шляхів інсуліна, таких як Akt/ПКВ, ARF і ПКС [23]. Нещодавно було встановлено, що синтетичні аналоги цераміду також можуть негативно регулювати ФЛД [24, 25, 26]. Вважають, що сфінголіпід може пригнічувати активність ферменту або прямими шляхами (на рівні транскрипції, або шляхом конкуренції з кофакторами за активний центр), або опосередковано (змінюючи структуру мембранних ділянок – рафтів, де знаходиться ФЛД) [24, 25, 26].

На сьогодні немає даних щодо впливу ендогенних церамідів на регуляцію інсуліном ФЛД в клітинах печінки, м'язовій тканини і неокортексі в старості. Залишається відкритим питання про те, які шляхи утворення церамідів призводять до їх накопичення в клітинах і є важливою ланкою в розвитку інсулінорезистентності в старості. Зважаючи на це, актуальним є вивчення особливостей зміни рівня церамідів в тканинах-мішенях дії інсуліна в старості та їх впливу на залежні від віку зміни функціонування ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчення регуляції та функціонального значення індукованої інсуліном ФЛД при зміні чутливості клітин- і тканин-мішеней до дії інсуліна. Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

– за допомогою інгібіторів ФІ3-кінази та Akt/ПКВ, а також специфічного інгібітора ФЛД з’ясувати місце та значення активації ФЛД у сигнальному каскаді

інсуліна та інсулін-індукованому поглинанні та накопиченні глюкози в гепатоцитах і неокортексі 3-місячних щурів;

– дослідити вікові особливості індукованої інсуліном активації ФЛД і поглинання глюкози в тканинах-мішенях щурів 3- і 24-місячного віку;

– оцінити вплив харчового раціону, збагаченого насиченими жирними кислотами на утворення сфінголіпідів і активацію ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна в морфо-функціонально різних органах і тканинах молодих тварин;

– дослідити модулюючу дію попередників та індукторів утворення сфінголіпідів: пальмітинової кислоти, N-ацетил-D-сфінгозина (С2-цераміду), N-гексаноїл-D-сфінгозина (С6-цераміду), доксорубіцина і паклітаксела на вміст сфінгомієліна і цераміда, активацію інсуліном ФЛД, поглинання глюкози і синтеза глікогена в тканинах-мішенях дії інсуліна у молодих тварин;

– з’ясувати вплив специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ на вікові та експериментально індуковані зміни вмісту сфінголіпідів, активацію інсуліном ФЛД і обміну глюкози в гепатоцитах щурів різного віку.

об'єкт дослідження – вікові особливості регуляції ФЛД інсуліном, моделювання змін активності ФЛД за допомогою аліментарних факторів, попередників та індукторів утворення та накопичення ендогенних церамідів, інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ.

предмет дослідження – активація ФЛД, вміст цераміда, сфінгомієліна (СФМ), [^{3}H]глюкози і [^{14}C]глікогена в клітинах печінки, діафрагмі та неокортексі щурів у старості, а також при моделюванні підвищенного вмісту церамідів *in vivo* за допомогою високожирової дієти або *in vitro* за допомогою індукторів синтеза і накопичення сфінголіпідів (пальмітинової кислоти, С2-цераміда, С6-цераміда, доксорубіцина і паклітаксела), і корекції даного стану інгібіторами синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ.

Методи дослідження. Методи клітинної біології (виділення та ізолювання гепатоцитів за методом Петренка і співав., визначення цілісності клітинних мембран гепатоцитів – тест з трипановим синім); біохімічні методи (визначення активності

ФЛД та СФМаз, екстракція ліпідів за методом Bligh, Dyer, визначення білку за методом Lowry), хроматографічні (розподіл ліпідних фракцій за допомогою тонкошарової хроматографії), радіоізотопні (включення мічених попередників до ліпідів та глікогена, поглинання міченої глюкози клітинами та тканинами), статистичні методи (аналіз отриманих даних).

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі встановлено, що активація ФХ-ФЛД в клітинах- і тканинах-мішенях, стимульованих інсуліном, асоціюється з посиленням поглинання глюкози і синтеза глікогена. Показано, що індукована інсуліном ФЛД знаходиться під контролем ключових учасників сигнального каскаду інсуліна, а саме ФІ3-кінази, Akt/ПКВ, фосфатази фосфатидної кислоти, і при стимуляції клітин-мішеней інсуліном ФЛД активується після ФІ3-кінази і Akt/ПКВ. Виявлено порушення передавання сигнала інсуліна через ФЛД-залежну ланку в старості в печінці, діафрагми і неокортексі, яке супроводжується пригніченням процесів поглинання глюкози і утворення глікогена. Встановлено, що моделювання вікового підвищення вмісту ендогенного цераміду в печінці, діафрагмі і неокортексі молодих щурів за допомогою високожирової дієти, екзогенних пальмітинової кислоти, С2- та С6-цераміду і індукторів утворення сфінголіпідів, протипухлинних препаратів доксорубіцину і паклітакселу, проявляється порушенням активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання і запасання глюкози. У той же час, зниження вмісту ендогенного цераміду за допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ, супроводжується відновленням активації інсуліном ФЛД і посиленням процесів обміну глюкози, як в старості, так і при моделюванні порушення чутливості клітин- і тканин-мішеней інсуліна фармакологічними індукторами утворення цераміду. Таким чином, показана висока чутливість ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна до змін вмісту ендогенних церамідів в клітинах- і тканинах-мішенях в старості.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист

хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних Законів України. Комісією НДІ біології порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 8 від 20.10.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником д.б.н, проф. Бабенко Н. О. обраний об'єкт і предмет дослідження, визначена мета, завдання і тема дисертаційної роботи і проведена інтерпретація отриманих результатів. Усі експериментальні дослідження, аналіз наукової літератури, статистична обробка отриманих результатів, оформлення і підготовка матеріалів до публікації проведено автором самостійно.

Апробація результатів дисертації. Матеріали досліджень були представлені та обговорені на VII, VIII і IX Международных симпозиумах “Биологические механизми старения” (Харьков, 2008, 2010, 2012), на науково-практичних конференціях з міжнародною участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Харків, 2008) та «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Харків, 2012, 2013, 2014), V національному конгресі патофізіологів України «Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів» (Запоріжжя, 2008), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті» (Харків, 2009), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті» (Харків, 2012), III International Symposium: Intracellular signaling and bioactive molecules design (Lviv, 2012), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), XIX-го з’їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2014).

Публікації. За темою дисертаціонної роботи було опубліковано 24 наукових праці, з яких 11 статей в наукових фахових виданнях (5 статей в виданнях, які входять до переліку наукових фахових видань України, 4 статті в індексованих англомовних виданнях, 1 стаття у вітчизняному журналі, 1 стаття в електронному

журналі) та 13 тез доповідей в збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних з'їздів і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 219 сторінок, з них основного тексту 142 сторінки. Робота ілюстрована 53 рисунками. Список використаних джерел містить 349 найменувань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у відділі фізіології онтогенезу НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в рамках науково-дослідних робіт «Роль ліпідів, які беруть участь у сигнальній трансдукції, в модулюванні процесу старіння» (державний номер реєстрації 0109U001577, здобувач – виконавець); «Роль метаболітів сфінгомієлінового циклу в розвитку резистентності клітин до дії фізіологічних стимулів у процесі старіння» (державний номер реєстрації 0111U010555, здобувач – виконавець); «Роль сфінгомієліназ у індукованої лікарськими препаратами резистентності клітин до дії інсуліна та тироксину в умовах передчасного старіння» (державний номер реєстрації 0115U000489, здобувач – виконавець).

Практичне значення одержаних результатів. Проведені в дисертаційній роботі дослідження щодо активаціїї ФЛД інсуліном і регуляції цього ферменту ключовими учасниками сигнального каскаду гормону ФІ3-кіназою, Akt/ПКВ і фосфатазою фосфатидної кислоти розкривають раніше не вивчені аспекти сигнальної трансдукції інсуліна в клітинах печінки.

Залежність між регуляцією активності ФЛД і метаболізму глюкози розширює класичні уявлення про реалізацію сигнала інсуліна, розкриває функціональне значення індукованої інсуліном ФЛД і надає нову терапевтичну мішень для пошуку шляхів подолання проблем інсулінорезистентності.

Отримані дані про пригнічення ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна і процесів обміну глюкози в старості поглиблюють уявлення про клітинні

механізми розвитку вікової резистентності клітин-мішеней до дії інсуліна. У той же час, за допомогою модуляції вмісту сфінголіпідів специфічними інгібіторами, які представляють собою затверджені лікарські засоби, встановлена оборотність цих процесів. Такий підхід до відновлення чутливості клітин і тканин-мішеней до дії інсуліна є перспективним для пошуку нових шляхів у подоланні вікових патологій, пов'язаних з порушенням чутливості до інсуліна.

Результати дисертаційної роботи щодо регуляції ФЛД-залежної ланки сигнальної трансдукції інсуліна впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини та тварини біологічного факультету у рамках спеціальних курсів: «Ендогенні модулятори фізіологічних функцій» та «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 5-го курсу біологічного факультету за ОКР «Магістр» (впровадження підтверджено відповідним актом).

РОЗДІЛ 1

СИГНАЛЬНА ТРАНСДУКЦІЯ ІНСУЛІНА ТА ЇЇ РЕГУЛЯЦІЯ СФІНГОЛІПІДАМИ

(літературний огляд)

1. 1 Роль фосфоліпази Д в сигнальній трансдукції

1. 1. 1 Структура та функції фосфоліпази Д

ФЛД грає важливу роль в регуляції внутрішньоклітинного транспорту мембранних везикул, реорганізації цитоскелету, проліферації клітин та сигналів їх виживання [27, 28, 29]. ФЛД і ФК беруть участь в цілому ряді патофізіологічних процесів і захворювань, таких як рак, нейродегенеративні патології, серцево-судинні захворювання [28]. ФЛД бере участь в регуляції рухливості клітин і їх міграції, основні етапи, які сприяють поширенню раку. Висока активність ФЛД в клітинах раку молочної залози людини MAD-MB-231 і клітинах лімфоми EL4 підвищує здатність ракових клітин мігрувати і утворювати метастази [30, 31]. Вважають, що ФЛД може брати участь в процесі амілоїдогенезу при розвитку хвороби Альцгеймера [32]. ФЛД присутня в тромбоцитах при активації клітин тромбіном, бере участь в процесі агрегації тромбоцитів і застосування специфічних інгібіторів ФЛД, зокрема FIPI, є перспективним напрямком в антитромбоцитарній терапії та запобіганні інсультів і легеневої емболії [33].

Класична ФЛД (ЄС 3.1.4.4) є фосфодіестеразою, яка в присутності води, каталізує гідроліз ФХ з утворенням ФК і вільної основи – холіну. Виділяють 3 ізоформи ФЛД: ФЛД1 [34], ФЛД2 [35] і мітоФЛД [36]. Члени суперсімейства ФЛД мають схожий консервативний повтор в структурі молекули – $HxK(x)_4D(x)_6GSxN$, де H – гістидин, K – лізин, D – аспарагінова кислота, а x – є будь-яким амінокислотним залишком [37]. Всі члени сімейства ФЛД містять дві HKD ділянки.

Припускають, що дана амінокислотна послідовність необхідна для забезпечення каталітичної функції ферментів. ФЛД1 і ФЛД2 відрізняються один від одного головним чином N- і С-кінцями. Крім того, ФЛД1 містить ділянку-петлю що складається з 116 амінокислотних залишків, яка знаходиться відразу за першою HKD-ділянкою. Амінокислотні залишки двох HKD фрагментів формують єдину активну ділянку (каталітичний центр) і залишок гістидину однієї ділянки служить в якості нуклеофільного компонента в реакції утворення фосфоферментного проміжного продукту, в той час як залишок гістидину іншої ділянки бере участь в гідролізі фосфодіефірного зв'язку [38]. За наявності первинних спиртів, таких як етанол або 1-бутанол, ФЛД каталізує реакцію трансфосфатидилювання, в результаті якої утворюється фосфатидилетанол (ФЕТ) або фосфатидилбутанол (ФБУТ) замість ФК [39, 40]. Ці фосфатидилспірти не можуть в подальшому метаболізуватися і біологічно інертні. Тому, первинні спирти часто використовуються для визначення клітинної активності ФЛД або в якості інгібіторів, що запобігають утворенню ФК.

Іншими високо консервативними ділянками, знайденими в класичних генах ФЛД є phox послідовність (PX), плекстрин-гомологічний (PH) домен і ділянку, що зв'язує фосфатидилінозітол 4,5-бісфосфат ($PIns4,5P_2$). Мутаційний аналіз ФЛД1 показав що N-кінець ФЛД необхідний для активації протеїнкінази С (ПКС) [41], тоді як малий G-білок RhoA взаємодіє з С-кінцем [11, 42]. Ділянка взаємодії з ARF залишається неідентифікованою, але припускають, що вона знаходиться на С-кінці ферменту [41].

ФЛД1 і ФЛД2 ідентичні на 50% і мають загальні властивості, зокрема зв'язування з мембраною, потреби в $PIns4,5P_2$ в якості кофактора для активації, і здатність безпосередньо стимулювати членів сімейства ARF. ARF найбільш відомі завдяки їх ролі в регуляції формування везикул [38, 43, 44, 45]. ФЛД1 також стимулюється безпосередньо членами сімейства Rho [43] і класичними ПКС α і β незалежно від їх кіназної активності [43, 46]. ARF, Rho і ПКС активують ФЛД шляхом взаємодії з певними ділянками ферменту, комбінація цих стимуляторів зумовлює синергічне посилення активності ферменту [38, 47, 48].

На відміну від ФЛД1, ФЛД2 конститутивно активна *in vitro* і *in vivo*, та її активність не чутлива до стимуляції ГТФазамі Rho сімейства. ФЛД2 також демонструє слабку відповідь на дію форболових ефірів, що передбачає можливість регуляції ферменту ПКзою С [47].

ФЛД1 і ФЛД2 експресуються в більшості тканин ссавців. Дослідження щодо внутрішньоклітинного розподілу ФЛД1 і ФЛД2 суперечливі. Вимірювання біохімічної активності шляхом субклітинного фракціонування показали, що ФЛД може бути виявлена в більшості клітинних мембран, включаючи ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, транспортні/секреторні везикули, плазматичну мембрану і ядерне оточення [39]. Імуноцитохімічний аналіз показує локалізацію ФЛД1 в перинуклеарному просторі, в ендоплазматичному ретикулумі, апараті Гольджі і пізніх ендосомах [35, 50, 51]. Крім того, в деяких типах клітин, ФЛД1 знаходиться також в секреторних гранулах або в плазматичній мембрані [52, 53]. Показано, що у відповідь на стимуляцію агоністами ФЛД1 транслокується в плазматичну мембрану [54, 55, 56]. Активність ФЛД2 навпаки, асоційована з плазматичною мембраною, цитозолем і субмембраннимі везикулами, що прямують до центру сортування [35, 42, 57].

Активація ФЛД відбувається під час цілої низки клітинних процесів і, зокрема, під час мембрано-транспортних процесів, але не обмежується екзоцитозом і ендоцитозом. Наприклад, в якості даунстрім ефектора ARF ФЛД опосередковує відєднання везикул від апарату Гольджі, транспорт з ендоплазматичного ретикулуму до мембрани апарату Гольджі і вивільнення секреторних пухирців, що утворилися, з транс-Гольджі мережи [58, 59].

Регульований екзоцитоз складається з серії етапів, які включають в себе (в деяких типах клітин): реорганізацію кортикального бар'єру F-актину, який фізично блокує везикули від плазматичної мембрани; рух везикул до плазматичної мембрани, прикріпленню цих везикул до мембрани; примірування; і злиття пухирців з плазматичною мембраною. Дослідження Huang і співавторів показали, що ФЛД і ФК відіграють вирішальну роль в процесі злиття мембран або в етапі екзоцитозу,

наступним за процесом заякорівання, в процесі транслокації пухирців, що містять ГЛЮТ, в плазматичну мембрану адипоцитів [12] або вивільненні інсуліна з гранул β-клітин підшлункової залози [60].

Механізм участі ФЛД/ФК в полегшенні злиття мембран може бути як прямим, так і непрямим. ФК може діяти як ліпідний якір і активувати фосфатидилінозітол-4-фосфат-5-кіназу, в результаті чого збільшується вміст $PIns4,5P_2$ [61]. Паралельно, ФК може запускати злиття мембран безпосередньо, діючи як фузогенний липид [52]. Будучи присутнім у внутрішньому шарі мембран, що піддаються злиттю, ФК збільшує негативну кривизну, приводячи до того, що контактуючи мембрани зв'язуються внутрішніми сторонами і ліпід знижує енергію необхідну для злиття [52].

Дію ФК як фузогенного ліпіду було показано *in vitro* на препаратах мембран нейтрофілів [62]. Harsh і Blackwood показали, що при стимуляції нейтрофілів, утворення ФК відбувається в плазматичній мембрані клітин і везикулярних субклітинних фракціях [61]. Пізніше, з використанням безклітинної системи для вивчення NSF (nonstimulated fusion) прикріплення (SNARE)-залежного рецептора і зв'язування мембрани, Vicogne і співавтори виявили, що система ФЛД/ФК, в цих умовах, підсилює злиття асиметрично (тобто посилення відбувається тільки, коли ФЛД і ФК присутні на акцепторній мембрані (модельний еквівалент плазматичної мембрани в експерименті)) [62].

Показано, що нормальне функціонування клітин мозку, особливо нейронів, залежить від активності ФЛД під час формування синапсів, екзоцитозу нейротрансмітерів і ендоцитозу їх рецепторів. Крім того, ФК є кальцієвим іонофором і пов'язана з деполяризацією мембран синапсів, входом Ca^{2+} і вивільненням нейротрансмітерів [63, 64]. Існують дані про те, що ФЛД бере участь в ендоцитозі рецепторів безпосередньо, не залежно від утворення ФК, по клатрин-залежному шляху через взаємодію з дінаміном, або по клатрин-незалежному шляху, взаємодіючи з білком Arf6 [65, 66, 67].

Ще одна функція ФЛД стосується утворення холіну, необхідного для синтеза ацетилхоліну. Холін утворюється при розщепленні ФХ ФЛД і використовується холінергічними нейронами для синтеза ацетилхоліну [68, 69]. Цей шлях важливий, коли екстраклітинна концентрація холіну мала або, коли синтез і вивільнення ацетилхоліну посилюється, при високій активності нейронів, таким чином, виникає велика потреба в холіні [70]. Відхилення в ФЛД-залежному вивільненні холіну може очікуватися в результаті зниження транспорту холіну і/або загального порушення функціонування холінергічних клітин. Такі порушення і дегенерація холінергічних нейронів мозку притаманні хворобі Альцгеймера [71]. Вважають, що подібні зміни частково викликають втрату пам'яті при цьому захворюванні.

Низкою дослідників показано, що ФЛД грає ключову роль в зростанні аксонів нейрональних клітин і формуванні синапсів [72, 73]. При диференціюванні нейронів в культурі клітин Е12 кори головного мозку щурів посилюється експресія і активність ФЛД, експресія синапсіна 1 (маркера синаптогенезу) і посилюється зростання аксонів. У клітинах феохромоцитоми РС12 фактор росту нервів стимулює активацію ФЛД2, яка діє в складі сигнального каскаду зростання аксонів і регулюється MAP-кіназою p38 [74]. А в стовбурових клітинах попередниках гіпокампу H19-7 під дією основного фактора росту фібробластів ФЛД1 регулює експресію Bcl-2 через JNK/STAT3, що посилює формування аксонів [75]. Пригнічення активності ФЛД у всіх описаних випадках супроводжується повним пригніченням росту аксонів нейрональних клітин [72-75].

У висновку слід зазначити, що ФЛД і продукт її реакції ФК беруть участь в регуляції процесів внутрішньоклітинного транспорту, проліферації та виживання різних типів клітин. Як ФЛД1, так і ФЛД2 експресуються в мембранних структурах більшості типів клітин і тканин ссавців; активуються біологічно активними речовинами (гормонами, факторами росту) і беруть участь в процесах сигнальної трансдукції. ARF, Rho і класичні ПКС регулюють активність ФЛД в ході мембрано-транспортних процесів. Показано, що ФЛД і ФК відіграють важливу роль в процесі транспорту і транслокації пухирців, що містять ГЛЮТ в мембрани клітин-мішеней

інсуліна. Зміни регуляції ФЛД спостерігаються при розвитку різних патофізіологічних процесів, починаючи від запалення та закінчуючи діабетом і різними нейродегенеративними захворюваннями.

1. 1. 2 Роль фосфоліпази Д в передаванні сигнала інсуліна і інсулін-залежному поглинанні глюкози

Відомо, різні ізоформи ФЛД ссавців регулюються екстраклітинними агоністами, такими як гормони, фактори росту, нейротрансмітери і цитокіни, які діють через G-білок-зв'язані рецептори і рецепторні тирозинкінази [49]. Voss і співавтори на ембріональних клітинах нирок людини HEK293 показали, що дія ростових факторів, таких як EGF, PDGF і інсуліна підвищує ендогенну активність ФЛД [76]. Індукована інсуліном активація ФХ-специфічної ФЛД в плазматичній мембрані спостерігається в клітинах ендотелію людини [77], L6 і ВСЗН-1 міоцитах [78-80], в адипоцитах [81] і гепатоцитах щурів [14]. У клітинах HEK 293 і гепатоцитах щурів інсулін стимулює ПКС- і ФЛСγ-залежну активацію ФЛД [11, 14]. В адипоцитах щурів індукована інсуліном активація ФІ3-кінази призводить до продукції поліфосфоінозітидів в плазматичній мембрані з подальшою транслокацією Rho, активацією ФЛД [81] і посиленням транспорту глюкози.

Дослідженнями на адипоцитах і м'язових клітинах було показано, що активація інсуліном ФЛД часто корелює з посиленням поглинання глюкози клітинами-мішенями [82, 83]. У клітинах-мішенях стимульоване інсуліном поглинання глюкози здійснюється транспортерами глюкози ГЛЮТ. В не стимульованому стані, 3-10% транспортерів глюкози локалізуються на клітинній поверхні і більш 90% повільно циклюють між плазматичною мембраною і внутрішньоклітинними компартментами [82, 83]. Інсулін регулює транслокацію транспортерів глюкози двома взаємопов'язаними шляхами. Гормон перемикає потік руху везикул, що містять ГЛЮТ. По-перше, основна активність гормону спрямована на вивільнення ГЛЮТ від білка-блокатора TUG, що зв'язує і утримує його всередині

не стимульованих клітин. По-друге, інсулін, шляхом активації ФЛД, знижує кількість kiss-and-run подій і збільшує частоту злиття везикул з плазматичною мембраною [10] Активація рецептора інсуліна призводить до збільшення швидкості екзоцитозу везикул, що містять ГЛЮТ, і зниження швидкості інтерналізації транспортерів шляхом ендоцитозу.

Регуляція екзоцитозу може здійснюватися по одному або більше наступних етапів: 1) етап утворення пухирців, при якому везикули вивільняються з навколоядерного ретикулярного депо, щоб поповнити запаси везикулярного компартменту; 2) етап руху, в якому розсіяні мембранні пухирці рухаються у напрямку до плазматичної мембрани; 3) вхід мембранних пухирців в загальну рециркулюючу ендосомальну систему; 4) стикування і прикріплення везикул; 5) етап, який включає злиття пухирців, що містять ГЛЮТ, з площиною мембрани.

Активація ФЛД встановлена у великій кількості мембрано-транспортних процесів [49]. Обидві форми ФЛД1 і ФЛД2 регулюються інсуліном [11, 48], показано, що ФЛД2 фізично асоційована з рецептором інсуліна, хоча залишається невідомим чи є активація ферменту результатом прямого контакту між ФЛД2 і рецептором або ФЛД2 активується в результаті послідовної стимуляції рецептора.

На клітинах первинної хромафинної тканини і PC12 клітинах (в цих клітинах ФЛД1 локалізується в плазматичній мембрані) показано, що зниження активності ФЛД1 в цих клітинах викликає затримку в швидкості злиття секреторних пухирців і подовжує тривалість подій злиття [50]. Багато відомо про білки, які беруть участь у злитті – наприклад, SNARE і Munc18 [84], однак також показано, що ліпідне оточення може полегшувати перебіг процесів, що каталізують ці ферменти [85, 86, 87]. Чи є цей механізм прямим (наприклад, ФК діє як фузогенний ліпід) або опосередкованим (ФК діє як сигнальний ліпід, який підвищує вміст $PIns4,5P_2$) залишається невідомим, проте відомо, що підвищення рівня ФК полегшує процес злиття мембран. Це було показано на нейронах, в процесі вивільнення нейротрансмітерів [87]. У нейтрофілах і тучних клітинах функції ФЛД1 полягають в регуляції транспорту і секреції секреторних гранул [88]. У тучних клітинах ФЛД1

локалізується в секреторних гранулах замість плазматичної мембрани [88]. Більш того, Choi і співавтори виявили, що активність ФЛД1 необхідна для транслокації гранул в плазматичну мембрану, і що ФЛД2 полегшує злиття гранул з плазматичною мембраною при субмаксимальній концентрації антигену (роль ФЛД1 в злитті гранул була протестована оскільки інгібування активності ФЛД1 блокує більш ранні етапи в цьому шляху, а саме транслокацію гранул в плазматичну мембрану) [88, 89]. Таким чином, в даний час зібрано багато даних щодо ролі ФЛД в регуляції везикулярного транспорту у великій кількості експериментальних модельних систем. З огляду на зазначені факти, важливим є визначення функцій ФЛД в клітинах, що містять і транслокують транспортери глюкози ГЛЮТ. Дослідженнями Emoto і співавторів показано, що ФЛД1 може регулювати транслокацію ГЛЮТ4 [90]. Було показано, що ФЛД1 локалізується спільно зі структурами що містять ГЛЮТ4 і, що мікроін'єкції бактеріальної або рослинної ФЛД діють синергічно з субмаксимальними концентраціями інсуліна, посилюючи транслокацию ГЛЮТ4 [90, 91]. Результатом дії інсуліна і м'язового скорочення є транслокація білків ГЛЮТ4 на поверхню клітин скелетної мускулатури з внутрішньоклітинних мембран донорів/везикулярних компартментів.

Біохімічні механізми, які задіяні в мембранному трафіку білків, були раніше пояснені з використанням безклітинних систем [92]. Було встановлено, що ФЛД, ARF (фактор рибозилювання ADP) і класичні ізоформи ПКС є важливими факторами для мобілізації/формування везикул, що переносять «вантаж» білків. ARF, білки оболонки, нуклеотиди, PIns4,5P_2, ФК і ЖК-CoA також є важливими кофакторами для утворення везикул. Фактично, в моделі позитивного зворотнього зв'язку, було припущено, що гуанозин нуклеотид-обмінюючи чинники переносять фосфат на ГДФ в результаті чього в ARF утворюється ГТФ. Активований ГТФ-ARF зв'язується з мембраною і активує ФЛД, таким чином, індукуючи швидкий гідроліз ФХ і утворення ФК. ФК активує ФІ4-кіназу, ФІ5-кіназу і ФЛД. Посилення активності зазначених кіназ призводить до фосфорилювання фосфатидилінозітолу (PIns) і фосфатидилінозітол-4-фосфату (PIns4P), викликаючи локальне підвищення

концентрації PIns4,5P_2 і це може збільшувати вигин мембрани і посилювати утворення везикул [92]. Цей механізм прямого зв'язку, контрольований ключовим ферментом ФЛД, може бути також залучений в інсулін-індуковане формування малих везикул що містять ГЛЮТ4 з великих мембран донорів ГЛЮТ4 в клітинах скелетної мускулатури. Зокрема, перетворення PIns4,5P_2 на фосфатидилінозітол-3,4,5-трисфосфат (PIns3,4,5P_3) інсулін-чутливою ФІ3-кіназою може викликати активацію ГТФ-обмінюючих факторів, які активують ARF білки і, за допомогою цього, ФЛД [92]. Таким чином, інсулін може індукувати ФЛД шляхом активації ARF через утворення PIns3,4,5P_3. Більш того, було показано, що інсулін стимулює як ARF, так і саму ФЛД. До того ж, везикули, що містять ГЛЮТ4, також містять аденозин-чутливу ФІ4-кіназу, яка продукує PIns4,5P_2 – кофактор для ФЛД і субстрат для ФІ3-кінази. Крім того, показано, що пухирці містять ГЛЮТ4, ізольовані з адипоцитів, зв'язуються з ацил-СоА синтазою і продукт активності цієї синтази «ацил-СоА» є важливим для формування пухирців. Нарешті, транслокація ГЛЮТ4 стимулюється аналогом ГТФ, ГТФγS, що демонструє важливу роль ГТФ-зв'язуючих білків у регуляції процесу поглинання глюкози. Крім того, подібні результати отримані і на культурі клітин CHO [92].

Показано, що сигнальні каскади інсуліна і ендотеліну-1 включають мобілізацію F-актину в жирових і м'язових клітинах у формі кортикального актину і агенти, які порушують реорганізацію цього актину, призводять до блокування транслокації ГЛЮТ4 і вбудовування в плазматичну мембрану [93] . Більш того, посилення експресії конститутивно активних сигнальних молекул в нормі регульованих інсуліном і ендотеліном-1, таких як ФІ3-кіназа або Akt/ПКВ, викликає реорганізацію актину і транслокацію ГЛЮТ4 [94]. Крім того, було показано, що С-кінцевий домен ГЛЮТ4 взаємодіє з біфункціональним гліколітичним ферментом альдолазою, яка каталізує оборотне розщеплення фруктоза-1,6-бисфосфату і дигідроксіацетон фосфату [95]. В експериментах *in vitro* ГЛЮТ4 асоційований з актином тільки в присутності альдолази. Вважають, що альдолаза функціонує в якості молекулярної платформи, що зв'язує ГЛЮТ4 і F-актин [106]. Субстрат

альдолази і продукт реакції можуть опосередковувати дисоціацію комплексу ГЛЮТ4-альдолаза і пригнічувати екзоцитоз ГЛЮТ4 і транспорт глюкози шляхом негативного зворотного зв'язку. І нарешті, ФЛД2 взаємодіє з альдолазою та її активність пригнічується альдолазою [96]. Ймовірно, в результаті взаємодії між альдолазою і ГЛЮТ4, метаболіти альдолази підсилюють взаємодію між альдолазою та ФЛД2 і надалі інгібують активність ФЛД.

Важливим є те, що дві ізоформи ФЛД1 і ФЛД2 активуються у відповідь на дію інсуліна і беруть участь в процесі поглинання глюкози на різних його етапах – на етапі зміни цитоскелету під дією інсуліна, що необхідно для транспорту транспортерів глюкози до плазматичної мембрани, а також на етапі злиття пухирців що містять транспортери глюкози з плазматичною мембраною. Пригнічення активності ФЛД призводить до порушення процесів транспорту глюкози під дією гормону.

Наприкінці слід зазначити, що інсулін індукує активацію ФХ-специфічної ФЛД в плазматичній мембрані клітин-мішеней гормону. Для класичних тканин-мішеней інсуліна показано посилення поглинання глюкози клітинами на тлі активації ФЛД. Однак механізми, за допомогою яких здійснюється регуляція транспорту глюкози і функціонування ФЛД в умовах інсулін-залежної стимуляції метаболізму глюкози вивчені ще недостатньо.

1. 2 Сигнальний каскад інсуліна і його реалізація в різних типах тканин-мішеней

1. 2.1 Особливості передавання сигнала інсуліна в м'язовій тканині

Гормон підшлункової залози інсулін викликає в організмі людини і тварин гіпоглікемічний ефект – гормон підсилює транспорт глюкози в інсулін-чутливих тканинах. До них відносяться, зокрема, м'язова і жирова тканини.

Реалізація функцій інсуліна в тканинах і клітинах-мішенях здійснюється завдяки активації рецептора гормону. Рецептор інсуліна є гетеротетрамер, що складається з двох екстраклітинних α-субодиниць і двох трансмембранних β-субодиниць, пов'язаних один з одним дисульфідними зв'язками. Зв'язування інсуліна з α-субодиницями рецептора викликає його конформаційні зміни, які призводять до автофосфорилювання залишків тирозину, присутніх в β-субодиниці рецептора [97, 98]. Залишки фосфорильованого тирозину розпізнаються фосфотирозин-зв'язуючими доменами адаптерних білків сімейства IRS [97, 98]. Відбувається фосфорилювання ключових залишків тирозину IRS білків, деякі з яких розпізнаються Src-гомологічним 2 доменом (SH2) P85-регуляторної субодиниці ФІ3-кінази. Каталітична субодиниця ФІ3-кінази – P110 – фосфорилює $PIns4,5P_2$ і призводить до утворення $PIns3,4,5P_3$. За участю $PIns3,4,5P_3$ відбувається активація 3-фосфоінозитид залежної протеїнкінази-1 (PDK-1), яка в комбінації з ще неідентифікованою кіназою призводить до фосфорилювання і активації Akt/ПКВ і реалізації фізіологічних ефектів інсуліна [97].

Відомо, що ключовою дією інсуліна в м'язовій тканині є стимулювання поглинання глюкози клітинами-мішенями. Це досягається за допомогою транспортерів глюкози ГЛЮТ, які транслокуються з внутрішньоклітинних депо в плазматичну мембрану [99]. ГЛЮТ циркулюють між плазматичною мембраною і внутрішньоклітинними депо, що містять транспортери глюкози. У відсутності сигнала інсуліна основна частина траспортерів знаходиться в мембранах ендоплазматичного ретикулуму [100]. Ключову роль в процесі утворення везикул, що містять ГЛЮТ, грає ФІ3-кіназа [101, 102]. Показано, що перетворення $PIns4,5P_2$ в $PIns3,4,5P_3$ інсулін-чутливою ФІ3-кіназою може викликати активацію ГТФ-обмінюючих факторів, які активують ARF білки. Припускають, що в свою чергу ARF активують ФЛД [101]. ФЛД індукує швидкий гідроліз ФХ і утворення ФК. ФК активує ФІ4-кіназу, ФІ5-кіназу і саму ФЛД, зв'язуючись безпосередньо з ліпазою. Посилення активності ліпідкіназ призводить до фосфорилювання PIns і PIns4P, тим самим викликаючи місцеве підвищення концентрації $PIns4,5P_2$ і це може

збільшувати вигин мембрани і утворення везикул [101]. Під дією інсуліна також відбувається вивільнення транспортера глюкози з комплексу TUG-ГЛЮТ, де TUG є білком блокатором транслокации ГЛЮТ-містячих пухирців в нестимульованих гормоном клітинах-мішенях інсуліна [102, 102]. У стимульованих інсуліном клітинах-мішенях везикули, що містять ГЛЮТ4, транспортуються до периферії клітини уздовж мікротрубочок [104]. В процесі прикріплення ГЛЮТ4-везикул, ці структури утримуються біля периферії клітини за допомогою актинового цитоскелета через ACTN4 і/або за допомогою комплексу екзоціст [105, 106]. Потім ГЛЮТ4 зв'язується з мембраною через комплекси SNARE [86, 107]. Необоротне включення везикул, що містять ГЛЮТ4, в плазматичну мембрану клітин посилюється інсуліном і реалізується білками Munc18c і SNARE [86, 107]. Крім того, в роботі Xu і співавторами було показано, що гальмування ФЛД специфічним (FIPI) і неспецифічним (1-бутанол) інгібіторами знижує частоту злиття везикул, що містять ГЛЮТ4 з плазматичною мембраною [10]. Таким чином, в результаті активації сигнального каскаду інсуліна запускається ланцюг подій, що приводить до екстерналізації на поверхні клітин-мішеней більше 50% транспортерів ГЛЮТ4, і посиленню поглинання глюкози. Крім того, важливе місце в реалізації цього процесу відведено ФЛД [90, 96, 101].

Паралельно з процесом транслокації транспортерів ГЛЮТ в плазматичну мембрану клітин-мішеней інсуліна відбувається і запуск процесу синтеза глікогена. [108-110]. Інсулін-чутлива ФІ3-кіназа сприяє фосфорилюванню Akt/ПКВ за залишком Ser 473. В результаті Akt/ПКВ активується і виходить з плазматичної мембрани в цитоплазму, де фосфорилює по залишку Ser 9 і інактивує кіназу-3 глікогенсинтази (GSK3). Головний субстрат GSK3 – це глікогенсинтаза, фермент, який каталізує утворення глікозидного зв'язку між атомом С1 UDP-глюкози і атомом С4 кінцевого залишку глюкози в глікогені з вивільненням уридиндифосфату UDP. GSK3 фосфорилює глікогенсинтазу, тим самим переводячи її в неактивний стан, і пригнічує синтез глікогена. Фосфорилювання GSK3 Akt/ПКзой В призводить

до інактивації ферменту і активізації процесу запасання глюкози у вигляді глікогена [109].

Таким чином, в м'язовій тканині під дією інсуліна активується каскад реакцій, кінцевим підсумком яких є активація процесу поглинання глюкози і запасання її у вигляді глікогена. Особливістю функціонування сигнального каскаду інсуліна в м'язовій тканині є транслокація інсулін-чутливих транспортерів глюкози ГЛЮТ4 при гормональній стимуляції. Інсулін також викликає активацію ФЛД і утворення продукту її реакції ФК, які грають критичну роль в процесі вбудовування пухирців що містять ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану, тим самим сприяючи посиленню процесів утилізації глюкози клітинами.

1. 2. 2 Особливості передавання сигнала інсуліна в клітинах печінки

Печінка є центральним органом, який бере участь в регуляції гомеостазу глюкози і ліпідів в організмі. Добре відомо, що інсулін підсилює надходження глюкози в клітини печінки, индукуючи активацію глюкокінази і стимулюючи глікогенсинтазу [109, 110]. Активація глюкокінази призводить до збільшення кількості фосфорильованої глюкози, в результаті чого знижується внутрішньоклітинна концентрація глюкози, що сприяє її додатковому надходженню в клітину [110]. Крім того, показано, що у мишей нокаутних по гену глюкокінази печінки спостерігається достовірне зниження рівня мРНК рецептора інсуліна і ГЛЮТ2 [110].

Відомо, що ГЛЮТ2 є основним транспортером глюкози, який експресується в клітинах печінки [111, 112]. Він має низьку афінність і високу пропускну здатність. Показано, що цей транспортер локалізується на синусоїдальній мембрані гепатоцитів поза стимуляції клітин інсуліном. ГЛЮТ2 забезпечує транспорт глюкози через плазматичну мембрану гепатоцитів в двох напрямках. При низькому вмісті глюкози в крові вміст ГЛЮТ2 в плазматичній мембрані клітин печінки збільшується і посилюється продукція глюкози печінкою.

Показано, що зв'язування інсуліна з рецептором посилює інтерналізацію рецептора інсуліна паралельно з активацією ГЛЮТ2 в плазматичній мембрані [111]. Рецептор інсуліна і ГЛЮТ2 утворюють комплекс: рецептор-транспортний білок в гепатоцитах, який здійснює інсулін-опосередковану регуляцію транспорту глюкози в клітини [112]. Дослідженнями з фракціонування мембран показано, що рецептори інсуліна і ГЛЮТ2 переносяться з плазматичної мембрани в ендосомальні компартменти в рівних співвідношеннях. Крім того, в ході біофізичних досліджень встановлено, що ці білки розташовані в плазматичній мембрані гепатоцитів на відстані в 20-60 Å і фізично взаємодіють [113]. Показано, що вміст комплексів рецептор інсуліна/ГЛЮТ2 збільшується у мишей з підвищеною чутливістю до інсуліна (PTD1B-null mice) [114]. Це істотно впливає на продукцію глюкози печінкою. У стані голодування печінка продукує глюкозу. Останнім етапом глюконеогенезу або глікогенолізу є гідроліз глюкозо-6-фосфату до глюкози, яка потім вивільняється в кров через ГЛЮТ2. В стані абсорбції, коли концентрація глюкози плазми і інсуліна зростають, печінка запасає глюкозу у вигляді глікогена або метаболізує її шляхом ліпогенезу. Продукція ендогенної глюкози блокується у разі пригнічення ферментів глюконеогенезу. Видалення ГЛЮТ2 з плазматичної мембрани є ефективним механізмом для запобігання виходу глюкози з гепатоцитів. У щурів, які утримувались на висококалорійному раціоні, вміст ГЛЮТ2 в клітинах печінки знижувався на 30% і цього було достатньо для значущих змін у функції печінки, що свідчить про важливу роль змін у вмісті транспортерів глюкози на фізіологію печінки [115].

Сигнальний шлях ФІ3-кіназа/Akt/mTORC1 активується як поживними речовинами, так і інсуліном [116]. Показано, що цей комплекс ферментів конститутивно активний у мишей нульових по TSC2 (комплекс туберозного склерозу 2), що проявляється в умовах *in vitro* в пригніченні поглинання глюкози шляхом регулювання трафіку ГЛЮТ2 і ГЛЮТ4 [114]. Ця робота є першим повідомленням про паралельну регуляції транспорту ГЛЮТ2 і ГЛЮТ4. Припускають, що молекулярні механізми регуляції транслокации ГЛЮТ2 [117] і

ГЛЮТ4 [118] можуть бути подібними. Проте, в тонкому кишківнику і гепатоцитах інсулін інтерналізує ГЛЮТ2, тоді як в адипоцитах і м'язових клітинах інсулін екстерналізує ГЛЮТ4. Показано, що поряд з ГЛЮТ2 гепатоцити експресують регульований інсуліном ГЛЮТ4 [119-123].

Akt/ПКВ є важливим учасником сигнального каскаду інсуліна і метаболізму глюкози в клітинах печінки. У відповідь на активацію Akt/ПКВ, поглинання глюкози стимулюється в результаті посилення синтеза глікогена через GSK-3β. Додатковими учасниками регуляції метаболізму глюкози інсуліном є різні ізоформи ПКС. Дослідженнями, проведеними на первинній культурі гепатоцитів щурів і клітинній лінії AML-12 показано, що інсулін підсилює активність ПКСδ, в той час як активність ПКСα залишається незмінною [117]. ПКСδ постійно зв'язана з рецептором інсуліна і активується при стимуляції гормоном. Пригнічення експресії ПКСδ редукує як стимульовану інсуліном активацію Akt/ПКВ, так і інгібування GSK-3β і значимо знижує інсулін-індуковане поглинання глюкози [117].

Необхідним компонентом складного шляху поглинання і метаболізму глюкози клітинами печінки є глюкокіназа. Інсулін є першим активатором експресії глюкокінази. Показано, що у щурів з діабетом, індукованим стрептозотоцином, редуковано вміст мРНК глюкокінази і самого ферменту. Інсулін відновлює експресію в першу чергу через транскрипцію гена глюкокінази. У культурі гепатоцитів інсулін підсилює експресію цього ферменту незалежно від концентрації глюкози. Дія інсуліна на експресію гена глюкокінази опосередковується через сигнальний шлях ФІЗК/Akt/ПКВ, а також фактор транскрипції SREBP-1c і інші недостатньо вивчені фактори транскрипції [122]. Існує припущення, що форболові ефіри, активатори ПКС через активацію ФЛД можуть надавати переважний вплив на стимульовану інсуліном експресію глюкокінази [123].

1. 2. 3 Функції інсуліна в центральній нервовій системі

Дія інсуліна на периферичні тканини полягає в стимуляції поглинання, окислення і запасання глюкози [124]. В ЦНС інсулін модулює зростання нейронів і

гліальних клітин, їх виживання, диференціювання, міграцію, експресію генів, синтез білка, складання цитоскелету і формування синапсів [125]. Інсулін синтезається β-клітинами підшлункової залози і транспортується з цереброспинальною рідиною в мозок [126-128]. Гормон перетинає гематоенцефалічний бар'єр головним чином за допомогою спеціальних переносників. Цей процес є активним, насичуємим, регульованим, чутливим до змін температури і обмежується бар'єрної системою, утвореної щільними контактами між ендотеліальними клітинами [129]. Крім того, перферійний інсулін може потрапляти в ЦНС безпосередньо через саме заднє поле гіпоталамуса, область з нещільним гематоенцефалічним бар'єром [130].

Альтернативним джерелом інсуліна в мозку є його синтез *de novo* [131]. Це підтверджується дослідженнями Zhao і співавторів, які виявили, що мРНК I і II препроінсуліна присутня в зародковому мозку і культурі нейронів. Крім того, ними була показана наявність імунореактивного інсуліна в ЕПР, апараті Гольджі, цитоплазмі нейронів, аксонах, дендритах і синапсах [131-134]. Ці дані свідчать про синтез гормону нейрональними клітинами. Також, прямим доказом утворення інсуліна в мозку є синтез гормону культурою нейронів мозку щурів [124]. Вивільняється інсулін з клітин шляхом K^+ і Ca^{2+} індукованої деполяризації мембран. Синтез інсуліна відбувається в пірамідальних нейронах (наприклад, гіпокампу, префронтальної кори і нюхової цибулини), але не в клітинах глії [136-138].

Інсулінрецепторний каскад в ЦНС має принципову схожість з таким в інших периферичних тканинах-мішенях. У мозку інсулін зв'язується з рецепторами, які широко поширені по всій ЦНС [133, 139]. Особливо багато рецепторів інсуліна локалізується в нюховій цибулині, гіпоталамусі, корі головного мозку, мозочку, гіпокампі і смугастому тілі [129, 140, 141]. У мозку ссавців виявлено 2 різних типи рецепторів інсуліна: периферійні рецептори і нейрон-специфічний тип рецепторів [142]. Зв'язування інсуліна з α-субодиницею рецептора інсуліна викликає до автофосфорілірованію β-субодиниць про залишками тирозину 1158, 1162 і 1163, таким чином включається його внутрішня тирозинкіназна активність, яка викликає фосфорилювання IRS-зв'язаних білків IRS1-4 по залишками тирозину [143]. Потім

сигнальні молекули, які містять Src-гомологічний-2 домен, (а саме, регуляторна p85 субодиниця ФІ3-кінази) активують каталітичну субодиницю ФІ3-кінази, а також білок, що зв'язує рецептор фактора росту-2 (Grb-2). Як наслідок, активуються 2 основні сигнальні шляхи: ФІ3-кіназа/Akt/GSK-3β і Ras/Raf-1/ERK1 і ERK2, ERK1/2 (кінази, регульовані зовнішніми сигналами) [129, 144-146]. Існують поодинокі дані про активацію ФЛД в мозку у відповідь на дію інсуліна. Salvador і співавторами була показана активація інсуліном ФЛД в синаптосомах 4-місячних щурів [15]. Є також дані цих же дослідників про те, що інсуліна не активує ФЛД в синаптосомах кори головного мозку старих щурів [15].

При супрафізіологичних концентраціях глюкози активація сигналінгу інсуліна мозку призводить до гіперполяризації глюкочутливих нейронів, активації K^+ АТФ-каналів, ослаблення нейронних активуючих імпульсів і зниження ваги тіла. І навпаки, ослаблення сигналінгу інсуліна мозку (що відбувається при периферичній інсулінорезистентності) активує янус-кінази, які фосфорилють IRS-1 по залишкам Ser/Thr, вони, в свою чергу, запускають інгібування рецептора інсуліна за принципом зворотного зв'язку, що призводить до збільшення маси тіла [146]. На додаток до контролю ваги тіла інсулін мозку регулює продукцію глюкози печінкою [147].

Недавніми дослідженнями показано, що метаболізм глюкози в мозку може контролюватися сигнальними шляхами нейронний інсулін/рецептор інсуліна [148]. Це підтверджується розповсюдженням інсуліна, рецепторів інсуліна та транспортерів глюкози ГЛЮТ1, 3 і 4 в різних ділянках мозку. Метаболізм глюкози здійснюється в наступних напрямках: активація ключових ферментів гліколізу і посилення окислення глюкоза по аеробному шляху, а також посилення депонування глюкози у вигляді глікогена [148]. Відомо, що вміст глікогена в тканині головного мозку невеликий. Глюкоза, яка надходить в клітку, переважно витрачається в процесі аеробного окислення з виділенням енергії [148]. У той же час, із загального глікогена клітин мозку виділяють пул глікогена, який утворюється у відповідь на масований вхід глюкози в клітину.

Мозок утилізує глюкозу як головне джерело енергії синтеза АТФ і 90 % продукції АТФ мозку здійснюється в мітохондріях нервових клітин шляхом окисного фосфорилювання [149]. Швидкість метаболізму глюкози зростає при сенсорній, моторній і когнитивній стимуляції мозку [150]. На культурі глютаматергічених нейронів показано, що глюкоза необхідна для збереження гомеостазу нейротрансмітерів під час синаптичної активності клітин [151, 152]. Блокування метаболізму глікогена *in vivo* за допомогою 1,4-дідексил-1,4-іміно-D-арабінітола, інгібітору глікогенфосфорилази, послаблює формування пам'яті гіпокампом [152]. Показано, що зниження метаболізму глюкози спостерігається у хворих на діабет, а також при старінні і є ознакою розвитку хвороби Альцгеймера [152].

Існує велика кількість свідчень про важливу роль інсуліна в різних морфо-функціональних тканинах-мішенях дії гормону, а також про подібність сигнального каскаду інсуліна в усіх тканинах-мішенях. У м'язовій тканині і клітинах печінки інсулін регулює процеси метаболізму глюкози і важливу роль в цих процесах бере ФЛД. Однак існують поодинокі дані про активацію цього ферменту під дією інсуліна в мозку. Крім того, ще не визначено на якому етапі передавання інсулінового сигнала бере участь ФЛД. Важливим також є вивчення вікових змін гормон-індукованої активації ФЛД в тканинах-мішенях дії інсуліна.

1. 3 Роль сфінголіпідів у порушенні функціонування сигнального каскаду інсуліна

Сфінголіпіди представляють собою клас біологічно активних молекул, залучених до регуляції фізіологічних процесів, таких як ріст клітин, апоптоз, аутофагія, ангіогенез, запалення і нейродегенерація [153]. Сфінголіпіди грають важливу роль в розвитку резистентності клітин-мішеней до дії інсуліна [154]. Модуляція вмісту сфінголіпідів в тканинах-мішенях дії інсуліна в умовах *in vivo* та в експериментах на культивованих клітинах, як правило, супроводжується зміною їх

чутливості до дії гормону. Найбільш активними інгібіторами різних ланок сигнальної трансдукції інсуліна є – цераміди і гангліозиди [153, 154]. Інсулінорезистентність, індукована висококалорійною дієтою або інфузією ліпідів, супроводжується накопиченням в м'язовій тканині і печінці не тільки попередника синтеза сфінголіпідів *de novo* – пальмітинової кислоти, але і цераміду [25, 155, 156]. Церамід є точкою збігання багатьох метаболічних шляхів і тому шлях синтеза *de novo* і сфінгомієліназний шлях є предметами інтенсивного дослідження [153-156]. Синтез цераміду починається зі шляху синтеза на поверхні ендоплазматичного ретикулуму і являє собою конденсацію пальмітоїл-СоА і серина СПТ 1 з утворенням 3-кетосфінганіна. Потім 3-кетосфінганін конвертується в дигідросфінгозин. Дигідроцерамідсинтаза ацилює дигідросфінгозин в результаті утворюється дигідроцерамід, який редукується до цераміду дигідроцераміддесатуразою. [157]. Шлях *de novo* може бути індукований метаболічно, у відповідь на надмірне надходження в клітину субстратів – серина і пальмітинової кислоти [157-159]. Також шлях синтеза *de novo* активується хіміотерапевтичними агентами, тепловим шоком, окисленими ЛПНЩ [160] і каннабіноїдами [161]. Церамід, утворений шляхом *de novo* опосередковує дію вищевказаних чинників на стресорну відповідь і може індукувати апоптоз [161, 200]. Також церамід може утворюватися зі сфінгомієліна (СФМ), в результаті гідролізу ліпіда кислою або нейтральною сфінгомієліназами (СФМазами) [19, 162]. Ці ферменти розщеплюють СФМ з утворенням цераміду і фосфорилхоліну і активуються у відповідь на дію ФНП-альфа [161], Fas ліганда [162] або оксидативного стресу [163].

У старості істотно зростає ризик розвитку різних патологій, в тому числі і інсулінорезистентності, яка в свою чергу може бути результатом ліпідних перебудов, що відбуваються в клітинах. У 1990 році Turinsky і співавтори виявили підвищення концентрації церамідів в печінці і клітинах скелетної мускулатури інсулінорезистентних щурів лінії Zucker [164]. Роботами, проведеними в нашій лабораторії, показано підвищення вмісту вільних жирних кислот (ВЖК) і цераміду в діафрагмі [165], неокортексі [166, 167] і в гепатоцитах 24-місячних щурів [21, 166].

Крім того, підвищення маси церамідів спостерігається в тканинах головного мозку при старінні [20], інсулінорезистентності, індукованої висококалорійної дієтою [167, 169, 170], і супутніх їм нейродегенеративних захворюваннях [171, 172]. Хан і співавторами було показано [173], що при хворобі Альцгеймера в мозку знижується вміст СФМ і збільшується вміст цераміду, що може призводити до змін в структурі ліпідних рафтів і, як наслідок, порушення функціонування пов'язаних з ними молекул. Rivas і співавторами було показано підвищення вмісту C16:0-церамідів і C20:0-церамідів в скелетних м'язах при старінні [174]. Старіння також асоційоване з підвищенням фосфорилювання транскрипційного фактора NFκB в загальних і ядерних клітинних фракціях. Більш того, також послаблюється активація сигнальних молекул, таких як Akt, FOXO1 і S6K1, які є учасниками сигнального каскаду інсуліна [174].

Відомо, що церамід може діяти на різні компоненти сигнального каскаду інсуліна і призводити до порушення реалізації функцій інсуліна. При додаванні в культуру клітин синтетичних аналогів цераміду (C2-церамід, C6-церамід) пригнічується стимульоване інсуліном поглинання глюкози, транслокація транспортерів глюкози і/або синтез глікогена. У культурі м'язових клітин, адипоцитів і гепатоцитів синтетичні C2 і C6-цераміди інгібують активацію Akt/ПКВ, яка лежить в основі швидких ефектів поглинання глюкози і анаболічного метаболізму [175-179]. Церамід пригнічує цей сигнальний крок двома незалежними механізмами. По-перше, церамід підсилює дефосфорилювання Akt/ПКВ шляхом прямої активації протеїнфосфатази 2A, яка відповідає за дефосфорилювання протеїнкінази [179]. По-друге, церамід пригнічує транслокацию і активацію Akt/ПКВ шляхом активації ПКСζ, яка фосфорилирует Akt/ПКВ по інгібуючому залишку, що знаходиться в PH-домені ферменту [180]. Крім того, церамід пригнічує ФЛД, невід'ємного учасника інсулін-стимульованого метаболізму глюкози. Так, на ендотеліальних клітинах пупкової вени людини і в диплоїдних фібробластах людини Venable і співавтори показали, що при фізіологічному старінні клітин

відбувається збільшення вмісту цераміду, яке супроводжується порушенням взаємодії ФЛД з ПКС і/або ARF, а також істотним зниженням активності ФЛД [181].

Показано, що церамід пригнічує ФЛД, проте, яким саме чином він діє залишається не ясним. Існує цілий ряд робіт, які передбачають різні механізми пригнічення ФЛД церамідом. Singh і співавтори вважають, що церамід пригнічує ФЛД на рівні каталітичної субодиниці, конкуруючи з її кофактором $PIn4,5P_2$ [24]. У той же час Abousalham і колеги показали, що церамід частково блокує транслокацію активаторів ФЛД – ARF і ПКС, що корелює зі зниженням активності ФЛД [26]. Gidwani і співавтори показали, що руйнування ліпідних рафтів церамідами супроводжується пригніченням ФЛД [25]. Крім того, церамід може блокувати транскрипцію ФЛД [182].

Таким чином, з огляду на дані численних досліджень, підвищення рівня церамідів в морфологічно і функціонально різних типах клітин і тканин є універсальним процесом в умовах розвитку метаболічного синдрому, діабету, серцево-судинних і нейродегенеративних захворювань. Цераміди беруть участь в регуляції активності ключових молекул учасників сигнального каскаду інсуліна. У той же час залишається відкритим питання, яка роль в регуляції змін інсулін-залежної активації ФЛД в старості відведена цераміду, як в класичних мішенях дії гормону, так і в нових, таких як нервова тканина.

Висновки до розділу 1

Здійсненно аналіз першоджерел щодо структури та функціональної ролі ФЛД в клітинах і тканинах ссавців, а також регуляції ферменту в різних клітинних процесах. Визначено, що ФЛД та її продукт ФК беруть участь в регуляції процесів внутрішньоклітинного транспорту, проліферації та виживання різних типів клітин. Показано, що ФЛД і ФК відіграють важливу роль в процесі транспорту і транслокації пухирців, що містять ГЛЮТ в мембрани клітин-мішеней інсуліна. Зміни регуляції ФЛД спостерігаються при розвитку різних патофізіологічних процесів (запалення, цукрового діабету, нейродегенеративних захворювань).

Розглянуто інформацію яка відома про роль ФЛД в сигнальній трансдукції інсуліна та регуляції гормоном процесів поглинання та запасання глюкози. Виявлено, що інсулін індукує активацію ФХ-специфічної ФЛД в плазматичній мембрані окремих клітин-мішеней гормону. Для класичних тканин-мішеней інсуліна показано посилення поглинання глюкози клітинами на тлі активації ФЛД. Однак відкритим є питання про механізми, за допомогою яких здійснюється регуляція транспорту глюкози і функціонування ФЛД в умовах інсулін-залежної стимуляції метаболізму глюкози в тому числі і в віковому аспекті.

Розглянуто особливості сигнальної трансдукції інсуліна в класичних мішенях гормону, зокрема клітинах печінки та м’язовій тканині, та некласичній – нервовій тканині. Також проаналізовано особливості впливу інсуліна на метаболізм глюкози в печінці, м’язовій тканині та мозку.

Проаналізовано наукові джерела щодо механізмів патологічного та вікового розвитку порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів та ролі в даних процесах сфінголіпіду – цераміду. Поставлено питання про роль цераміду в регуляції активності інсулін-залежної ФЛД в старості в печінці, м’язовій тканині та мозку.

Результати власних досліджень наведено в публікаціях [165, 167, 168, 169, 170].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2. 1 Постановка експерименту

При виконанні цієї роботи в якості піддослідних тварин були використані самці щурів лінії Вістар 3- і 24-місячного віку вагою 205 ± 7,07 і 474 ± 14,4 г, що утримувались в стандартних умовах віварію НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Всі дослідження на тваринах проведені з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985) і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Залежно від завдань експерименту тварини були розділені на наступні групи:

1. Тварини 3- і 24-місячного віку з діафрагми, печінки і неокортексу яких отримували препарати тканин для вивчення вікових особливостей вмісту ліпідів, а також стимульованих інсуліном активації ФЛД, поглинання глюкози і утворення глікогена.

2. Тварини 3-місячного віку, з печінки яких виділяли гепатоцити для вивчення особливостей регуляції активності ФЛД в сигнальному каскаді інсуліна і індукованого гормоном поглинання глюкози за допомогою загальних антагоністів ФЛД (1-бутанолу, етанолу) та специфічного інгібітора ФЛД (галопеміда), специфічних інгібіторів ФІ3-кінази (вортманіна і LY294002), специфічного інгібітору фосфатази фосфатидної кислоти (пропранололу), а також інгібіторів Akt/ПКВ (апігенін-7-глюкозида і лютеолін-7-глюкозида).

3. Тварини 3-місячного віку, з головного мозку яких виділяли неокортекс для вивчення особливостей регуляції інсуліном активності ФЛД і метаболізму глюкози за допомогою специфічного інгібітора ФЛД (галопеміда); специфічних інгібіторів ФІ3-кінази (вортманіна і LY294002).

4. Тварини 3- і 24-місячного віку, з печінки яких виділяли гепатоцити для вивчення вікових особливостей вмісту і обміну сфінголіпідів, модуляції вмісту цераміду і СФМ за допомогою індукторів синтеза сфінголіпідів (пальмітинової кислоти, С2-цераміду, доксорубіцину, паклітакселу) та інгібіторів метаболізму сфінголіпідів (міріоцина, фумонізина В1, іміпраміну, GW4869), а також вікових та експериментально індукованих змін інсулін-залежної активації ФЛД, поглинання глюкози і утворення глікогена.

5. Тварини 3- і 24-місячного віку, з головного мозку яких виділяли неокортекс для вивчення вікових особливостей вмісту і обміну сфінголіпідів, модуляції вмісту цераміду за допомогою індукторів синтеза сфінголіпідів (пальмітинової кислоти, С2 і С6-цераміду) та інгібіторів метаболізму сфінголіпідів (міріоцина, фумонізина В1, іміпраміну, GW4869), а також вікових та експериментально індукованих змін інсулін-залежної активації ФЛД, поглинання глюкози.

6. При вивченні короткочасного впливу високожирової дієти на вміст сфінголіпідів і індуковану інсуліном активацію ФЛД використовували тварин 2-місячного віку, які протягом 5 тижнів перебували на дієті, збагаченій яловичим жиром. З печінки, діафрагми і неокортексу отримували препарати тканин для вивчення вмісту ліпідів і активації інсуліном ФЛД.

2. 2 Експерименти на тканині печінки

2. 2. 1 Виділення первинних гепатоцитів

Із печінки 3- і 24-місячних щурів гепатоцити було ізольовано неферментативним методом, як описано Петренко А. Ю. і співавторами [184]. Печінку ізолювали з піддослідних тварин наркотизованих ефіром і перфузували окигенованим безкальцієвим сольовим розчином, який містить сахарозу 250 мМ, KCl 5 мМ, Na_2HPO_4 0,4 мМ, $MgCl_2$ 0,8 мМ, ЕДТА 1 мМ, БСА 0,5 %, стрептоміцин 100 мг/мл, пеніцилін 60 мг/мл (37 ºС, pH~7,4). Подрібнену тканину піддавали механічній дезагрегації шляхом вібрації. Далі тканину пропускали через

капроновий фільтр, центрифугували, відмивали, визначали кількість клітин в гемоцитометрі та ресуспендували у відповідному середовищі. Нативність клітинних мембран гепатоцитів, оцінювали за допомогою 0,4 % розчину трипанового синього («Serva», Німеччина) та оцінювали вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) у середовище інкубування клітин печинки. Активність ЛДГ визначали за допомогою стандартних наборів реактивів фірми "Філісіт діагностика", Україна. Вихід життєздатних клітин печінки 3-місячних щурів становив 95±2,5 %, 24-місячних тварин – 90±2,6 %. Свежовиділені гепатоцити ресуспендувалі (до концентрації ~ $4 \cdot 10^7$ клітин в мл) в живильному середовищі 199 («PAA», Австрія) (pH 7,4), що містить 25 мМ HEPES («ABCR», Німеччина), пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика (ТОВ «Біолот», Росія), [^{14}C]пальмітіновую кислоту (0,25 мкКі/мл) «Amersham», Англія). Клітини інкубували протягом 90 хв при 37^o C, 5 % CO_2. Після закінчення інкубації з кожної чашки відбирали аліквоту і визначали кількість і життєздатність гепатоцитів (тест з трипановим синім, визначення активності ЛДГ в інкубаційному середовищі). Потім мічені і немічених гепатоцити відмивали буфером Кребс-Хенселейта, що містить 118 мМ NaCl; 5мМ KCl; 1мМ KH_2PO_4, 1 мМ $MgSO_4$; 2 мМ $CaCl_2$; 0,2% $NaHCO_3$; 0,1 % БСА («Sigma Aldrich», США); 61 мг/л пеніцилін і 100 мг/л стрептоміцин (pH 7,5; +4^o C). Потім клітини печінки ресуспендувалі до концентрації ~ $2 \cdot 10^7$ кл/мл в середовищі 199, що містить 25 мМ HEPES, пеніцилін (61 мг/л) і стрептоміцин (100 мг/л), без ембріональної сироватки. У мічених клітинах визначали стимульовану інсуліном активацію ФЛД (див. пункт 2.5) і вміст мічених сфінголіпідів. У немічених гепатоцитах визначали стимульовані інсуліном поглинання глюкози (див. пункт 2.6) і утворення глікогена (див. пункт 2.7).

2. 2. 2 Вивчення впливу 1-бутанолу на активацію інсуліном фосфоліпази Д

Для вивчення ефекту загального антагоніста ФЛД (1-бутанола) на сигналінг інсуліна, клітини печінки були попередньо проінкубовані в присутності

[^{14}C]пальмітінової кислоти (0,25 мкКі/мл) протягом 2 год при 37° С, 5 % CO_2. Потім гепатоцити були оброблені 10 нМ інсуліном (інсулін свинячий монокомпонентний «Монодар», «Індар», Україна) або фізіологічним розчином (0,9 % NaCl в якості контролю до інсуліна) і проінкубовані 5 хв при 37° С з наступним додаванням в клітинну суспензію 0,1 % 2-бутанолу (в якості контролю) або 0,1 % 1-бутанолу та потім гепатоцити інкубували ще 5 хв і 30 хв. Реакцію зупиняли крижаною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом) і активність ФЛД визначалася як зазначено в пункті 2.5.

Для визначення ефектів бутанола на інсулін стимульований метаболізм глюкози, використовували немічені гепатоцити. Індуковане інсуліном поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози (4 МБк/М, Росія) і включення міченої D-[U^{14}C]-глюкози (2 ГБК/мМ, Чехія) в глікоген визначали, як описано в пунктах 2.6. і 2.7.

2. 2. 3 Вивчення впливу галопеміда, С6-цераміда та пропранолола на активацію фосфоліпази Д

Для вивчення дії різних інгібіторів сигнального шляху ФЛД/ФК на сигналінг інсуліна, гепатоцити попередньо мічені [^{14}C]пальмітиновою кислотою (для визначення активності ФЛД, див. пункт 2.5) і немічені клітини печінки (для визначення поглинання глюкози і утворення глікогена, см. пункти 2.6 і 2.7) були оброблені специфічним інгібітором ФЛД, галопемідом (200, 300 нМ) («Sigma», США) або N-гексаноїл-D-сфінгозином (С6-церамід) (15 мкМ, «Amersham», Англія) протягом 90 хв або пропранололом (100 мкМ, «Sigma», США) протягом 15 хв або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інгібіторів). Реакцію зупиняли крижаною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом) і активність ФЛД визначали як описано в пункті 2.5.

2. 2. 4 Вивчення впливу інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д

Для з'ясування впливу ФІ3-кінази на стимульовану інсуліном активність ФЛД і метаболізм глюкози, використовували специфічні інгібітори. Гепатоцити попередньо мічені [^{14}C]пальмітиновою кислотою (для визначення активності ФЛД, див. пункт 2.5) і немічені клітини (для визначення поглинання глюкози та утворення глікогена, див. пункт 2.6 і 2.7) були оброблені вортманіном (100 нМ) або LY294002 (100 нМ) або ДМСО (контроль). Реакцію зупиняли крижаною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом).

2. 2. 5 Вивчення впливу інгібіторів Akt/протеїнкінази В на активацію фосфоліпази Д інсуліном

Для вивчення дії інгібіторів Akt/ПКВ лютеолін-7-глюкозида (ЛЮ7Гл) і апігенін-7-глюкозида (АП7Гл) на індуковану інсуліном активацію ФЛД були проведені 2 типи експериментів. У першому типі дослідів ізольовані гепатоцити мітили [^{14}C]пальмітиновою кислотою (0,25 мкКі/мл) протягом 90 хв при 37 ºС, 5 % CO_2 потім обробляли інсуліном (10 нМ) або 0,9 % NaCl (контроль) протягом 5 хв і потім вносили до середовища інкубації ЛЮ7Гл (20 мкМ) або АП7Гл (20 мкМ) (флавони, виділені з Chamomilla recutita, ДП "Державний науковий центр лікарських засобів" м Харків, Україна) або ДМСО (контроль) і інкубували клітини протягом 15 хв. Після цього в середовище інкубації додавали 0,1 % етанол і інкубували 20 хв. У другому типі дослідів, гепатоцити попередньо мічені [^{14}C]пальмітиновою кислотою (0,25 мкКі/мл), були оброблені протягом 15 хв ЛЮ7Гл (20 мкМ) або АП7Гл (20 мкМ) перед внесенням інсуліна (10 нМ) або 0,9 % NaCl (контроль) і 0,1 % етанолу в інкубаційне середовище. Клітини, оброблені флавонами і інсуліном, були використані для визначення активності ФЛД як описано в пункті 2.5. Для визначення дії флавонів на метаболізм глюкози в інсулін-стимульованих клітинах,

використовували немічені гепатоцити; поглинання глюкози і синтез глікогена були вивчені як описано в пунктах 2.6 та 2.7.

2. 2. 6 Вивчення впливу індукторів утворення цераміду і інгібіторів обміну сфінголіпідів і сфінгомієліназ активацію інсуліном фосфоліпази Д

Для модуляції вмісту ендогенних церамідів в гепатоцитах і їх чутливості до дії інсуліна клітини були проінкубовані в присутності [^{14}C]пальмітинової кислоти (0,25 мкКі/мл) і доксорубіцину (Доксорубіцин-Тева Pharmachemie BV, Нідерланди), або паклітакселу (Паклитаксел-«Ебеве»ЕБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х. Нфг. КГ А-4866 унтер, Австрія)) (30 нМ) або суміші доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і міріоцина (5 мкМ, «Sigma», США), або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і GW4869 (20 мкМ, «Sigma», США), або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і іміпраміна (50 мкМ, «Sigma», США) або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і суміші всіх інгібіторів протягом 90 хв при 37º С, 5 % CO_2. Контрольні чашки містили відповідну кількість розчинників для інгібіторів. Клітини, інкубували з різними інгібіторами і модуляторами, потім оброблялися інсуліном (10 нМ) або 0,9 % NaCl (контроль) протягом 5 хв і 30 хв, і використовували для визначення активності ФЛД (див. пункт 2.5) і поглинання та запасання глюкози як описано в пунктах 2.6 і 2.7.

2. 2. 7 Вивчення впливу екзогенних попередників цераміду на стимульовану інсуліном активацію фосфоліпази Д

Клітини інкубували з пальмітиновою кислотою (кінцева концентрація в розчині – 0,75 мМ/л, «Sigma Aldrich», США) або С2-церамідом (10 мкг/мл, «Amersham», Англія) або з контрольною сумішшю етанол: додекан (49: 1, за об'ємом) протягом 3 год при 37° С, 5 % CO_2. Перед внесенням в середовище інкубації пальмітинова кислота була комплексована з БСА, як описано раніше [185]. Коротко, пальмітинову кислоту було розчинено в етанолі (75 мМ) и

розчинено у живильному середовищі 199, що містило 2 % БСА у співвідношенні 1:25. Після обробки ультразвуком та інкубації протягом 10 хв при 55° С, зразки було розведено до необхідної концентрації, охолоджено та додано до клітин. Для пригнічення синтеза цераміду *de novo* в середовище інкубації гепатоцитів 3-місячних щурів за 30 хв до внесення пальмітинової кислоти або С2-цераміду додавали 5 мкМ міріоцина. Загальний час інкубації з інгібітором склало 3 год. Гепатоцити 24-місячних щурів за наявності міріоцина також інкубували 3 год при 37° С. Після інкубації гепатоцити відмивали буфером Кребса-Хенселейта з 0,1 % БСА і розводили перед початком експерименту в тому ж буфері. Концентрація гепатоцитів становила ~ $2 \cdot 10^7$ клітин в 1 мл. Далі визначали стимульовану інсуліном активацію ФЛД як описано в пункті 2.5, поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і синтез [^{14}C]глікогена, як описано в пунктах 2.6 та 2.7. Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодної сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом) і проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.10.

2. 2. 8 Модулювання інсулін-залежної активації фосфоліпази Д, поглинання глюкози і синтеза глікогена за допомогою інгібіторів метаболізму сфінголіпідів

Гепатоцити 24-місячних щурів інкубували в присутності 5 мкМ міріоцина, фумонізина В1, 50 мкМ іміпраміна, 20 мкМ специфічного інгібітора нейтральної СФМази – GW4869, суміші всіх інгібіторів або без них (в якості контролю) протягом 90 хв при 37°С, 5 % CO_2. Після інкубації гепатоцити відмивали буфером Кребс-Хенселейта з 0,1 % БСА і визначали індуковану інсуліном активацію ФЛД як описано в пункті 2.5, поглинання глюкози і утворення глікогена як описано в пунктах 2.6 та 2.7.

2. 3 Експерименти на м'язовій тканині

2. 3. 1 Ізолювання тканини діафрагми

Діафрагму щурів, наркотизованних ефіром, витягували з черевної порожнини на льодовій бані з Кребс-Рингер бікарбонатним буфером, видаляли сухожильну фасцію і розділяли скальпелем на м'язові фрагменти розміром ~ 3-5 мм. Для визначення вмісту ліпідів зразок тканини діафрагми розтирали в гомогенізаторі з 0,9 % NaCl при +4º С. Для вивчення обміну ліпідів і активності ФЛД шамточки тканини діафрагми інкубували в Кребс-Рінгер бікарбонатному буфері, що містить 118 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 1,3 мМ $CaCl_2$, 1,2 мМ KH_2PO_4, 1,2 мМ $MgSO_4$, 25 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ глюкозу, 100 мкМ аскорбінову кислоту, 25 мМ HEPES, [^{14}C]пальмітинову кислотою (0,25 мкКі/мл) протягом 90 хв при 37 °С. Перед внесенням тканини буфер аерували газовою сумішшю 95 % O_2 5 % CO_2. Нативність тканини діафрагми визначали за зміненням активності альдолази в середовищі інкубування як описано в пункті 2.3.1. Для моделювання стану резистентності *in vitro* шматочки діафрагми 3-місячних тварин інкубували в буфері Кребс-Рінгера протягом 3 год при 37° С в присутності [^{14}C]пальмітинової кислоти (0,25 мкКі/мл) (попередника синтеза ліпідів), С2-цераміда (15 мкМ) або пальмітинової кислоти (0,75 мМ) або без них. Після включення мітки шматочки діафрагми відмивали буфером Кребс-Рінгера з 0,1 % БСА та ресуспендували перед початком експерименту в тому ж буфері. Далі визначали стимульовану інсуліном активацію ФЛД як описано в пункті 2.5. Після закінчення інкубації реакцію зупиняли холодної сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за обємом) і проводили екстракцію ліпідів як описано в пункті 2.10. Поглинання глюкози і синтез глікогена визначали в неміченій [^{14}C]пальмітиновою кислотою діафрагмі як описано в пунктах 2.6 та 2.7.

2. 3. 2 Визначення активності альдолази в середовищі інкубації діафрагми

Активність альдолази визначали за методом Кулганека і Клашка [186]. Принцип методу: альдолаза розщеплює фруктозо-1,6-дифосфат на глицеральдегид-

3-фосфат і діоксіацетонфосфат. Утворені при розпаді субстрату фосфотріози уловлюються за допомогою гідразинсульфату. Потім вільні тріози визначають по реакції з 2,4-дінітрофенілгідразіном.

Для визначення активності альдолази до 0,1 мл середовища інкубування діафрагми додавали 0,5 мл 0,005 М розчину фруктозо-1,6-дифосфату в 0,056 М розчині гідразину та інкубували 30 хвилин при 37 ^{0}С. Потім реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл 2 Н HCl. Білки не видаляли і для кольорової реакції використовували весь об'єм реакційної суміші. До пробі доливали 0,5 мл 0,6 Н розчину NaOH і суміш залишали при кімнатній температурі 30 хвилин. Потім додавали 1,5 мл 0,6 Н 2,4-дінітрофенілгідразіна, інкубували 30 хвилин при кімнатній температурі. Після закінчення цього терміну в пробу доливали 4,5 мл 0,6 Н NaOH і 20 хвилин витримували в темряві. Оптичну щільність вимірювали проти води в кюветі товщиною 1 см при 536 нм. У контрольну пробу субстрат додавали після підкислення соляною кислотою. Альдолазная активність вимірються в мкмоль фруктозодіфосфата, перетвореного 1 мл надосадової рідини за 1 годину. Для побудови калібрувальної кривої використовували діоксіацетон.

2. 4 Експерименти на неокортексі

2. 4. 1 Ізолювання тканини неокортексу

Мозок щурів, наркотизованих ефіром, швидко витягували, область кори великих півкуль головного мозку виділяли на льоду. Видаляли мозгові оболонки, нюхову цибулину, середній мозок (до 4 хвилин з момента декапітації). Отриману область мозку на крижаній бані з буфером Кребс-Рингера подрібнювали. Шматочки тканини отримані таким чином промивали 3 рази в свіжіх порціях крижаного попередньо оксигенованого газовою сумішшю 95 % O_2 5 % CO_2 буферу Кребс-Рингера. Під мікроскопом визначали розмір шматочків тканини неокортексу, який складав ~ 100-160 мкм. Фрагменти тканини вагою 100 мг вологої тканини поміщали в пластикові 30 мм чашки Петрі з 4 мл оксигенованого Кребс-Рингер бікарбонатного

буфера, що містить 118 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 1,3 мМ $CaCl_2$, 1,2 мМ KH_2PO_4, 1,2 мМ $MgSO_4$, 25 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ глюкозу, 100 мкМ аскорбінову кислоту, 25 мМ HEPES, pH 7,4; [^{14}C]пальмітіновую кислоту (0,25 мкКі/мл) і інкубували протягом 90 хв при 37^{o} С. Нативність тканини визначали за рівнем активності ЛДГ в середовищі інкубування. Активність ЛДГ визначали за допомогою стандартних наборів реактивів фірми “Філісіт діагностика” (Україна). У міченій тканині визначали стимульовану інсуліном активацію ФЛД (див. пункт 2.5) і вміст мічених сфінголіпідів. У немміченій тканині визначали стимульовані інсуліном поглинання глюкози (див. пункт 2.6) і утворення глікогена (див. пункт 2.7).

2. 4. 2 Вивчення впливу галопеміду на активність фосфоліпази Д

Для вивчення дії інгібітора ФЛД на сигналінг інсуліна, тканину неокортексу, попередньо мічену [^{14}C]пальмітіновою кислотою (для визначення активності ФЛД, див. пункт 2.5) і немічену тканину неокортексу (для визначення поглинання глюкози і утворення глікогена, см. пункти 2.6 та 2.7) була оброблена специфічним інгібітором ФЛД, галопемідом (200 або 300 нМ) протягом 90 хв при 37 ^{o}C, 5 % CO_2. Активність ФЛД була визначена як описано в пункті 2.5.

2. 4. 3 Вивчення впливу інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази на активацію інсуліном фосфоліпази Д

Для вивчення впливу ФІ3-кінази на активацію інсуліном ФЛД і метаболізму глюкози, використовували специфічні інгібітори. Тканина неокортексу, попередньо мічена [^{14}C]пальмітіновою кислотою (для визначення активності ФЛД, див. пункт 2.5) і немічена тканина неокортексу (для визначення поглинання глюкози і утворення глікогена, див. пункти 2.6 і 2.7) були оброблені специфічними інгібіторами вортманіном (100 нМ, «Sigma», США) або LY294002 (100 нМ, «Sigma», США) або ДМСО (контроль) протягом 90 хв при 37 °С, 5 % CO_2. Реакцію зупиняли крижаною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об`ємом).

2. 4. 4 Вивчення впливу екзогенних попередників цераміда на стимульовану інсуліном активність фосфоліпази Д

Для вивчення впливу екзогенних і ендогенних церамідів на стимульовану інсуліном активність ФЛД неокортексі 3-місячних щурів інкубували в буфері Кребс-Рінгера в присутності [^{14}C]пальмітінової кислоти (0,25 мкКі/мл) і С2-цераміду (10 мкМ), або С6-цераміду (10 мкМ, «Amersham», Англія), або С6-цераміду (10 мкМ) і фумонізина В1 (1 мкМ, Fluka, Німеччина), або неміченою пальмітиновою кислотою (0, 75 мМ, Sigma, США) або без них протягом 90 хв при 37 °С, 5 % CO_2. Після закінчення інкубації шматочки тканини неокортексу відмивали буфером Кребс-Рінгера і ресуспендували в тому ж буфері. Далі визначали стимульовану інсуліном активацію ФЛД як описано в пункті 2.5. У неміченій тканині неокортексу визначали поглинання глюкози (див. пункт 2.6) і синтез глікогена (див. пункт 2.7).

2. 4. 5 Модулювання інсулін-залежної активації фосфоліпази Д і поглинання глюкози за допомогою інгібіторів метаболізма сфінголіпідів

Неокортекс 24-місячних щурів інкубували в присутності 5 мкМ міріоцина, 1 мкМ фумонізина В1, 50 мкМ іміпраміна, 20 мкМ специфічного інгібітора нейтральної СФМази – GW4869, суміші всіх інгібіторів, а також суміші всіх інгібіторів і 300 нМ галомеміда або без них (в якості контролю) протягом 90 хв при 37 °С, 5 % CO_2. Після інкубації тканину неокортексу відмивали буфером Кребс-Хенселейта з 0,1 % БСА і визначали індуковану інсуліном активацію ФЛД як описано в пункті 2.5, поглинання глюкози як описано в пункті 2.6.

2. 5 Визначення активності фосфоліпази Д

Для визначення активності ФЛД використовували специфічний чутливий метод, заснований на утворенні фосфатидилетанола (ФЕТ) або фосфатидилбутанола (ФБУТ), фосфоліпідів, які утворюються виключно ФЛД через

трансфосфатидилювання в присутності 50-300 мМ етанолу або 0,1-0,3% 1-бутанолу [12, 29, 187, 188, 189].

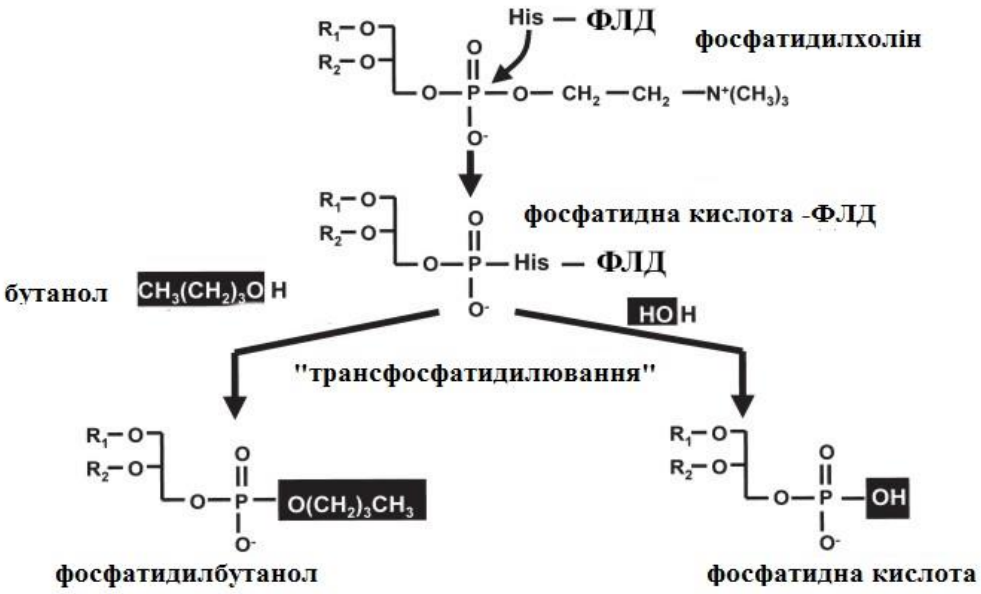

Рис. 2.1. Реакція трансфосфатидилювання фосфатидної кислоти фосфоліпазою Д.

ФЕТ і ФБУТ, на відміну від ФК, метаболізуються дуже повільно і з огляду на це є індикаторами активації ФЛД в стимульованих клітинах. Для визначення активності ФЛД попередньо мічені [^{14}C]пальмітіновой кислотою м'язова тканина, неокортекс і ізольовані гепатоцити відмивалися буфером Кребс-Рінгера (для м'язової тканини і неокортексу) або Кребс-Хенселейта (для гепатоцитів), що містили 0,1 % БСА, і ресуспендували в тому ж буфері.

Перед внесенням інсуліна в середовище інкубації м'язова тканина, неокортекс і клітини печінки попередньо інкубувалися в присутності 300 мМ етанолу або 0,1 % бутанолу протягом 10 хв, потім в середовище інкубації додавали 10 нМ інсулін або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна). Реакцію зупиняли через 5 або 30 хв крижаною сумішшю хлороформ: метанол (1: 2, за об'ємом). Екстракція ліпідів проводилася, як описано в пункті 2.10. Хлороформенну фазу використовували для хроматографічного розділення ліпідів (див. пункт 2.11).

2. 6 Експерименти з вивчення поглинання глюкози клітинами- і тканинами-мішенями дії інсуліна

2. 6. 1 Визначення поглинання глюкози в клітинах печінки

Транспорт глюкози визначали з використанням 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози (0,5 мкКі/мл) [189]. Гепатоцити інкубували в буфері Кребс-Хенселейта, що містить 118 мМ NaCl; 5мМ KCl; 1мМ KH_2PO_4; 1мМ $MgSO_4$; 2 мМ $CaCl_2$; 0,2% $NaHCO_3$; 0,2% БСА; 61 мг/л пеніцилін і 100 мг/л стрептоміцин (pH 7,5) присутності 10 нМ інсуліна або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна) протягом 30-40 хв при 37 °С в атмосфері 5 % CO_2. Клітини відмивали 3 рази теплим (37°С) буфером HBS (HEPES-buffered saline), що містить 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ $CaCl_2$, 5мМ глюкозу, 20 мМ HEPES, остання порція буфера була замінена 0,75 мл HBS, що містить 0,5 мкКі/мл 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і 0,1 мМ глюкозу. Клітини інкубували 10 хв при 37 °С. Потім гепатоцити відмивали 3 рази крижаним (+ 4°С) буфером HBS і лізували 1 мл 50 мМ NaOH протягом 30 хв. Радіоактивність отриманих зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику.

2. 6. 2 Визначення поглинання глюкози м'язовою тканиною

Діафрагму попередньо інкубували в буфері Кребс-Хенселейта, що містить 118 мМ NaCl; 5мМ KCl; 1мМ KH_2PO_4; 1мМ $MgSO_4$; 2 мМ $CaCl_2$; 0,2% $NaHCO_3$; 0,2 % БСА; 61 мг/л пеніцилін і 100 мг/л стрептоміцин (pH 7,5), С2-церамід (15 мкм) або пальмітинову кислоту (0,75 мМ) або інгібітори обміну сфінголіпідів або без них протягом 90 хв при 37 °С. Буфер попередньо внесенню тканини аерували газовою сумішшю 95 % O_2 5 % CO_2. Після закінчення інкубації шматочки тканини відмивали від добавок буфером HBS, що містить 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ $CaCl_2$, 25 мМ глюкозу, 20 мМ HEPES і інкубували 30 хв. Після цього додавали інсулін (10 нМ) або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна), 0,5 мкКі/мл 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і інкубували ще 10 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли крижаним 0,9 % NaCl і відмивали тим же розчином 3 рази. Тканину

діафрагми лізували 50 мМ NaOH. Радіоактивність отриманих зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику.

2. 6. 3 Визначення поглинання глюкози в неокортексі

Шматочки тканини неокортексу щурів інкубували в Кребс-Рінгер бікарбонатному буфері, що містить 118 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 1,3 мМ $CaCl_2$, 1,2 мМ KH_2PO_4, 1,2 мМ $MgSO_4$, 25 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ глюкозу, 100 мкМ аскорбінову кислоту, 25 мМ HEPES, С2-церамід (15 мкм), або пальмітинову кислоту (0,75 мМ), або С6-церамід (10 мкм), або суміш фумонізина В1 (1 мкМ) і С6-цераміду (10 мкМ), або інгібітори ФІ3-кінази (вортманін і LY294002, 100 нМ) або інгібітори метаболізму сфінголіпідів (міріоцин, фумонізин В1, іміпрамін, GW4869) або без них протягом 90 хв при 37° С. Перед внесенням тканини буфер аерували газовою сумішшю 95 % O_2 5 % CO_2. Після закінчення інкубації шматочки тканини неокортексу відмивали 3 рази теплим (37 °С) буфером Кребс-Рінгера-HEPES і стимулювали інсуліном (10 нМ) або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна) протягом 30 хв. Потім в інкубаційну суміш додавали 0,5 мкКі/мл 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкозу і 0,1 мМ немічену глюкозу і інкубували ще 30 хв. Реакцію зупиняли крижаним (+ 4-6°С) буфером Кребс-Рінгера-HEPES. Кусочки тканини неокортексу лізували 0,2 N NaOH. Радіоактивність отриманих зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику.

2. 7 Експерименти з вивчення утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях дії інсуліна

2. 7. 1 Вивчення утворення глікогена в клітинах печінки

Свежовиділені гепатоцити ресуспендували (до концентрації $4 \cdot 10^7$ клітин в 1 мл) в живильному середовищі 199 з індикатором (pH 7,4), що містить 25 мМ HEPES, пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), без ембріональної сироватки і інкубували в присутності інгібіторів ключових учасників сигнального

шляху інсуліна – ФЛД/ФК-залежного шляху (0,1 % 1-бутанолу або 2-бутанолу (в якості контролю), галопеміда (200, 300 нМ) або N-гексаноїлсфінгозина (С6-цераміду, 10 мкМ) або пропранололу (100 мкМ); інгібіторів ФІ3-кінази (вортманіна (100 нМ) або LY294002 (100 нМ) або ДМСО (в якості контролю)) протягом 90 хв при 37 °С, 5 % CO_2. Для модуляції вмісту ендогенних церамідов в гепатоцитах і чутливості клітин до дії інсуліна клітини печінки попередньо інкубували протягом 90 хв при 37° С в присутності [^{14}C]пальмітинової кислоти (0,25 мкКі/мл) і доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) або суміші доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і міріоцина (5 мкМ) або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і GW4869 (20 мкМ), або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і іміпраміна (50 мкМ) або доксорубіцину (паклітакселу) (30 нМ) і суміші всіх інгібіторів. У контрольні чашки додавали еквівалентну кількість розчинників інгібіторів. Після інкубації в присутності інгібіторів і модуляторів середовище інкубації видаляли, клітини печінки відмивали буфером Кребс-Хенселейта (містить 118 мМ NaCl; 5мМ KCl; 1мМ KH_2PO_4; 1мМ $MgSO_4$; 2 мМ $CaCl_2$; 0,2 % $NaHCO_3$; 0,2 % БСА; 61 мг/л пеніцилін і 100 мг/л стрептоміцин (рН 7,5; 37 °С)) 3 рази і ресуспендували в тому ж буфері. Клітини печінки інкубували з D-[U^{14}C]-глюкози (1 мкКі/мл) і 10 нМ інсуліном або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна) протягом 2 год при 37 °С, 5 % CO_2, потім клітини відмивали крижаним 0,9 % NaCl 3 рази і лізували в 0,5 мл 0,2 N NaOH. Радіоактивність отриманих зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику.

2. 7. 2 Визначення утворення глікогена в м'язовій тканині і неокортексі

Діафрагму або шматочки тканини неокортексу інкубували протягом 2 год при 37° С, в буфері HBS, що містить 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,5 мМ $MgSO_4$, 1 мМ $CaCl_2$, 5мМ глюкозу, 20 мМ HEPES, 10 нМ інсулін або 0,9 % NaCl (в якості контролю до інсуліна) і 1 мкКі/мл D-[U^{14}C]-глюкози. Буфер попередньо внесенню тканини аерували газовою сумішшю 95 % O_2 5 % CO_2. Реакцію зупиняли крижаним 0,9 % NaCl і відмивали їм же 3 рази. Тканини лізували 60 % КОН 30 хв, потім до

розчину додавали глікоген 1 мг/мл і кип'ятили 30 хв при 95°С. Осад двічі відмивали крижаним етанолом і розчиняли у воді. Радіоактивність отриманих зразків визначали на сцинтиляційному лічильнику.

2. 8 Визначення сфінгомієліназної активності в гепатоцитах

Для пригнічення кислої і нейтральної СФМзи гепатоцити 24-місячних щурів інкубували протягом 2 год при 37 °С, 5 % CO_2 в присутності 50 мкМ іміпраміна або 5 мкМ GW4869, відповідно. Для визначення активності СФМаз (ЄС 3.1.4.12) гепатоцити лизували в буфері, що містив 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 мМ ЕДТА, 10 мМ MgCl2, 0,65 % тритон Х-100 (для подальшого визначення активності нейтральної СФМази), або в буфері, що містив 50 мМ CH_3COONa (pH 5,0), 0,65 % тритона Х-100 (для подальшого визначення активності кислої СФМази). Реакційна суміш містила 1,5 мг білка і 0,74 нмоль СФМ [метил-^{14}С-холін]сфінгомієліна (52 мКі/мМ, «Amersham», Англия) в кінцевому об’ємі 200 мкл. Проби інкубували протягом 1 год, реакцію зупиняли додаванням 1,5 мл суміші хлороформ: метанол (1: 2, за об’ємом) з подальшим додаванням 1 мл хлороформу і 1 мл H_2O. Суміш центрифугували протягом 5 хв при 3000 об/хв. Після поділу фаз аліквоти верхньої і нижньої фаз, що містили [^{14}С]фосфорілхолін і [^{14}С]СФМ відповідно, використовували для визначення радіоактивності. Активність ферменту виражали в нмоль продукту або субстрату на 1 мг білка за 1 год.

2. 9 Вивчення впливу високожирової дієти на вміст сфінголіпідів і активацію фосфоліпази Д

Двомісячні щури самці лінії Вістар були розділені на 2 групи: контрольну і дослідну, які утримувались на дієтах різної калорійності. Дієта для контрольної групи щурів, яких утримували на стандартному раціоні віварію, становила: білки – 12 %, жири – 14 % і вуглеводи – 75 % (по калорійності). Калорійність раціону дослідної групи була збільшена на 21 % за рахунок збільшення вмісту жирів шляхом

додавання до стандартної дієті яловичого жиру (в якості джерела насичених жирів, кількість насичених жирів становила близько 50,90 мг на 100 г яловичого жиру) [190]. З печінки, діафрагми і неокортексу цих тварин отримували препарати для вивчення змін вмісту ліпідів і активації інсуліном ФЛД, викликаних високожировою дієтою.

2. 10 Екстракція ліпідів

Ліпіди гомогенатів печінки, діафрагми і неокортексу (приготованих на 0,9 % NaCl) екстарагувалі за методом Bligh, Dyer протягом 60 хв в суміші хлороформ: метанол (1: 2, за обємом) при постійному струшуванні [191]. Отриманий екстракт центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Верхню фазу відбирали і доливали 1 мл хлороформу і 1 мл dist H_2O. Проби центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Верхню фазу відкидали, а нижню випарювали під вакуумом при температурі 37 °С. Осад розчиняли в суміші хлороформ: метанол (2: 1, за об'ємом) і використовували для тонкошарової хроматографії.

2. 11 Поділ ліпідів за допомогою тонкошарової хроматографії

Поділ ліпідів на фракції проводили методом тонкошарової хроматографії на сілікагелевих пластинках Sorbfil в висхідному струмі розчинників. в системах розчинників – етилацетат: ізооктан: оцтова кислота: H_2O (130: 20: 30: 100, за об’ємом) для ФЕТ, ФБУТ; гексан: діетиловий ефір: оцтова кислота (73: 25: 2, за обємом) для діацілгліцерола (ДАГ), вільних жирних кислот (ВЖК) і триацилгліцеролів (ТАГ). Для поділу фосфоліпідів (ФХ і фосфатидилетаноламін (ФЕА)) і сфінголіпідів (церамід і СФМ) використовували системи: діетиловий ефір (система 1) і хлороформ: етанол: H_2O (40: 10: 1, за об'ємом) (система 2). Плями ліпідів проявляли в парах йоду і ідентифікували, порівнюючи зі стандартами.

2. 12 Елююування ліпідних фракцій

Плями ліпідів зіскоблювали з хроматографічних пластинок в пробірки заливали 2 мл суміші хлороформ: метанол (3: 2, за обсягом) для ДАГ, ТАГ, ВЖК і церамідів, хлороформ: метанол: 14 N NH_4OH (56: 42: 2, за обсягом) для СФМ, ФХ, ФЕА і ФЕТ, і інкубували на водяній бані при + 55 °С протягом 15 хв з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 3000 об/хв. Елюат збирали в хімічні пробірки, операцію повторювали двічі.

2. 13 Кількісне визначення ліпідних фракцій

Кількісне визначення ліпідних фракцій вмісту фосфоліпідів в пробах проводили за методом Bartlett [192]. Елюат випарювали, до пробірки додавали по 0,6 мл суміші 10 N H_2SO_4: 70 % HCl: H_2O (9: 1: 40, за обємом) і поміщали в блоки для спалювання на 8 год при + 160 °С. Після охолодження в зразки додавали по 0,9 мл dist. H_2O, 0,5 мл 0,9 % $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ і 0,2 мл 9 % аскорбінової кислоти. Вміст перемішували і інкубували 30 хв на водяній бані при + 45 °С. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 820 нм на спектрофотометрі СФ-26.

Кількісне визначення вмісту нейтральних ліпідів у пробах проводили за методом Marsh, Weinstein [193]. Елюат випарювали, в пробірки додавали по 2 мл концентрованої H_2SO_4 і поміщали в блоки для спалювання на 15 хв при + 200 °С. Після охолодження в пробірки додавали по 2 мл dist. H_2O, вміст перемішували і знову охолоджували. Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 375 нм на спектрофотометрі СФ-26.

2. 14 Визначення білка в досліджуваних тканинах

Вміст білку в лізатах гепатоцитів (приготованих на живильному середовищі 199), гомогенатах печінки, діафрагми і неокортексу (приготованих на буферах Кребс-Рингеру або Кребс-Хенселейту) визначали за методом Lowry et al [194]. Для визначення кількості білку брали 0,1 мл необхідного матеріалу.

2.15 Статистична обробка даних

Статистичний аналіз даних проведено за допомогою методів варіаційної статистики. Перевірку нормальності розподілу даних було здійснено за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Порівняння груп із нормальним розподілом даних було здійснено за допомогою t-критерію Стьюдента. Для множинних порівнянь було використано однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA критерій Ньюмена-Кейлса, критерій Даннета). Результати подано у вигляді $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (середнє арифметичне ($\bar{x}$), стандартна похибка середнього арифметичного ($s_{\bar{x}}$)). Вміст значущості (p) для визначення відмінностей між групами такими, що є статистично значущими був прийнятий $p \leq 0{,}05$.

Висновки до розділу 2

Дослідження здійсненно за допомогою методів клітинної біології (виділення та ізолювання гепатоцитів за методом Петренка і співавторів, визначення цілісності клітинних мембран гепатоцитів – тест з трипановим синім); біохімічними методами (визначення активності ФЛД та СФМаз, екстракція ліпідів за методом Bligh, Dyer, визначення білку за методом Lowry, кількісне визначення ліпідів за методами Bartlett та March, Weinstein), хроматографічні (розподіл ліпідних фракцій за допомогою тонкошарової хроматографії), радіоізотопні (включення мічених попередників до ліпідів та глікогена, поглинання міченої глюкози клітинами та тканинами), статистичні методи (аналіз отриманих даних).

Результати власних досліджень наведено в публікаціях [167, 168, 169, 170, 195, 196, 197, 198, 199, 200].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3. 1 Роль та регулювання фосфоліпази Д в сигнальному каскаді інсуліна

3. 1. 1 Регуляція фосфоліпази Д в сигнальному каскаді інсуліна в клітинах печінки

Біологічні ефекти інсуліна в клітинах-мішенях реалізуються шляхом активації каскаду сигнальних молекул, важливе місце серед яких займають ФІ3-кіназа, Akt/ПКВ, ФФК2 [201]. Встановлено, що інсулін також активує ФЛД в тканинах-мішенях. Так, Voss і співавторами на ембріональних клітинах нирок людини HEK293 було показано, що дія ростових факторів, таких як EGF, PDGF і інсулін, підвищує ендогенну активність ФЛД [77]. Індукована інсуліном активація ФХ-специфічної ФЛД в плазматичній мембрані спостерігається в клітинах ендотелію людини [77], в адипоцитах щурів [81], L6 і ВСЗН-1 міоцитах [78-80], гепатоцитах щурів [14], а також синаптосомах кори головного мозку щурів [15]. ФЛД і продукт її реакції гідролізу ФХ, ФК, відіграють важливу роль в здійсненні везикулярного транспорту, ендо- та екзоцитозу, реорганізації цитоскелету, проліферації і виживання клітин [75]. Зокрема показано, що поряд з атиповими формами ПКС ζ/λ і Akt/ПКВ сама ФЛД та її продукт – ФК беруть участь в регуляції інсуліном трафіку транспортерів глюкози ГЛЮТ з внутрішньоклітинних депо в плазматичну мембрану та у зворотньому напрямку і, відповідно, можуть займати важливе місце в регуляції обміну глюкози в стимульованих гормоном клітинах [101]. Інсулін стимулює ПКС- і ФЛС-залежну активність ФЛД в гепатоцитах щурів і клітинах НЕК 293 [11, 14]. В адипоцитах щурів, індукована інсуліном активація ФІ3-кінази викликає продукцію поліфосфоінозітидів в плазматичній мембрані з подальшою транслокацією Rho і активацією ФЛД [81]. Однак механізми регуляції активності ФЛД при дії інсуліна та місце фермента в сигнальному каскаді відносно

добре вивчених сигнальних молекул ФІ3-кінази і Akt/ПКВ залишаються нез'ясованими.

На першому етапі цього дослідження було вивчено дію інсуліна на активність ФЛД в різних тканинах щурів. Для визначення стимульованої інсуліном активації ендогенної ФЛД в тканинах щурів використовували метод, заснований на утворенні ФЕТ або ФБУТ, які продукуються тільки ФЛД, у реакції трансфосфатидилювання в присутності первинних спиртів (етанолу або бутанола) [75, 202-205]. Встановлено, що внесення інсуліна в середовище інкубації клітин печінки, м'язової тканини або тканини неокортексу статистично значимо збільшує активність ФЛД. Інсулін стимулює продукцію [^{14}C]ФЕТ (Рис 3.1 А) і зниження вмісту субстрату ФЛД, [^{14}C]ФХ (Рис 3.1 Б), у всіх вивчених тканинах, мічених [^{14}C]пальмітиновою кислотою.

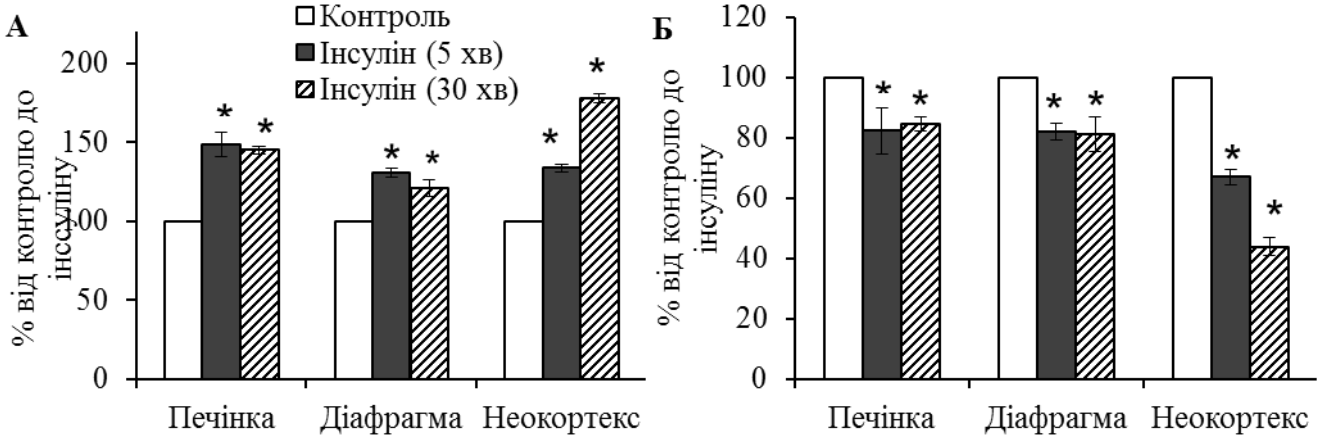

Рис. 3.1 Індукована інсуліном активація фосфатидилхолін-специфічної фосфоліпази Д в клітинах печінки, м'язовій тканині та неокортексі щурів 3-місячного віку

Примітки:

1. А - вміст [^{14}C]ФЕТ; Б - вміст [^{14}C]ФХ

2. * – статистично значимо в порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p < 0,05$

Ці результати вказують на те, що інсулін швидко активує ФХ-специфічну ФЛД як в класичних інсулін-чутливих тканинах (печінка і м'язи), так і в мозку.

Встановлено, що інсулін поряд з активацією ФЛД в м'язах, неокортексі і гепатоцитах стимулює поглинання глюкози і синтез глікогена (Рис. 3.2).

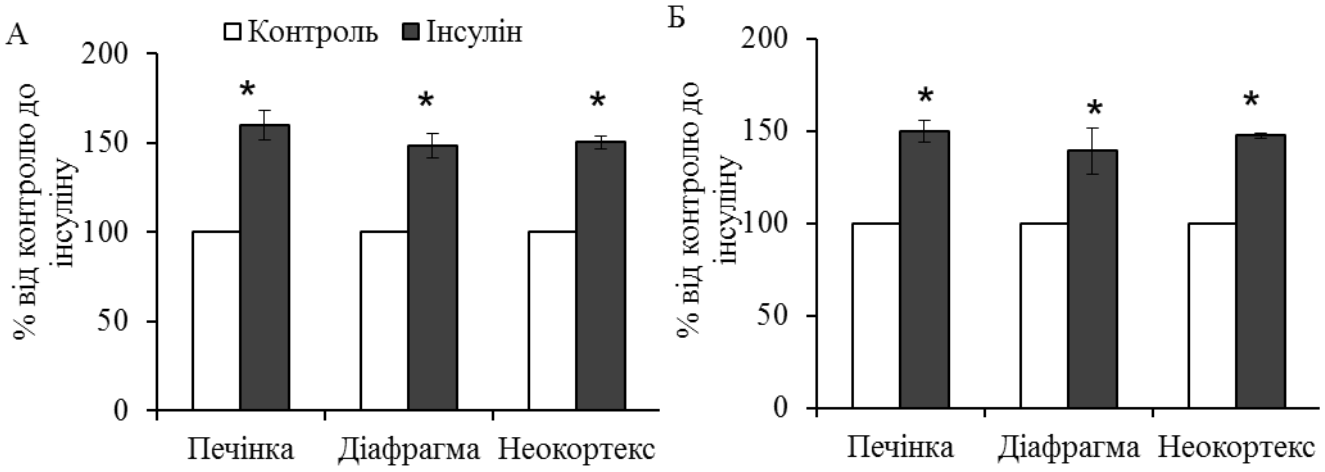

Рис. 3.2 Вплив інсуліна на поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози (А) і синтез [^{14}C]глікогена (Б) в клітинах печінки, м'язової тканини і неокортексі щурів 3-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо у порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p < 0,05$

У даній роботі показано, що інсулін стимулює активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в класичних тканинах-мішенях (м'язова тканина, клітини печінки), а також в неокортексі (Рис. 3.1). Але роль ФЛД в регуляції інсуліном поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах залишається не цілком зрозумілою.

PIns3,4,5P_3, продукт реакції, що каталізує ФІ3-кіназа, є головним вторинним посередником в сигнальному каскаді інсуліна і опосередковує більшість його метаболічних процесів в тканинах-мішенях. Групою дослідників було показано, що пригнічення ФІ3-кінази за допомогою специфічного інгібітора вортманіна блокує стимульований інсуліном гідроліз фосфатидилхоліну ФЛД в адипоцитах [78]. У той же час нещодавно з'явилися дані про те, що інсулін також може активувати консервативні ПКС і нові ПКС, головним чином в печінці і жировій тканині,

шляхом активації синтеза ФК *de novo* і незалежно від ФІ3-кінази [206]. Для того, щоб з'ясувати чи опосередковує ФІ3-кіназа дію інсуліна на активність ФЛД в гепатоцитах, на даному етапі дослідження були використані 2 різних специфічних інгібітори ФІ3-кінази, вортманін і LY294002.

Вортманін та LY294002 пригнічують ФІ3-киназу ковалентно незворотньо зв'язуючись з АТФ-зв'язуючим сайтом каталітичної субодиниці фермента [207, 208].

З огляду на той факт що спирти і інгібітори, необхідні для визначення активності ФЛД, можуть бути токсичними для клітин, також була вивчена життєздатність клітин печінки з використанням трипанового синього. Короткочасний вплив етанолу або бутанолу, вортманіна і LY294002 на ізольовані гепатоцити не мав статистично значущого ефекту на виживаність клітин (Рис. 3.3).

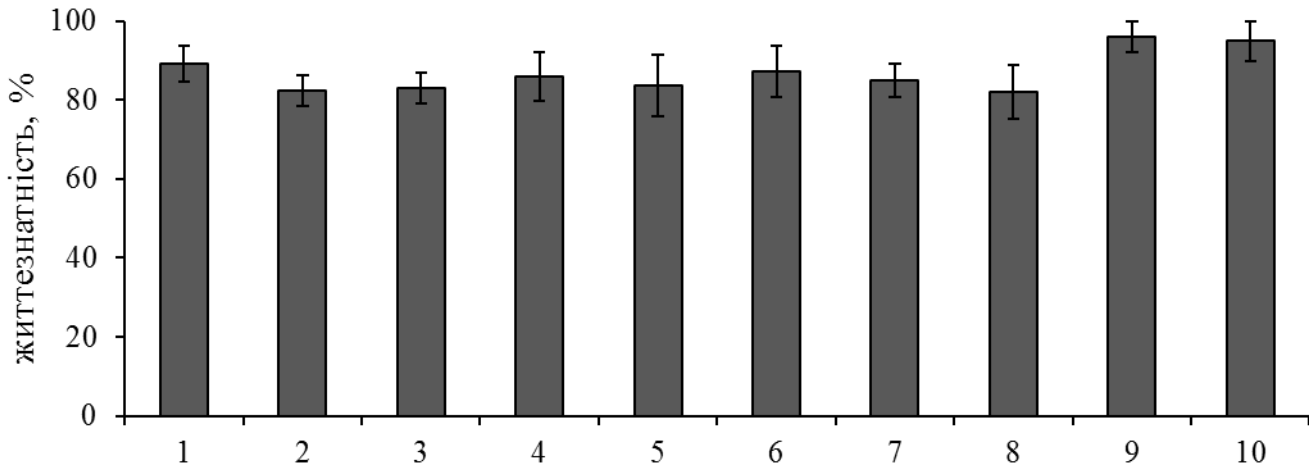

Рис. 3.3 Дія етанолу, бутанолу та інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази, фосфатази фосфатидної кислоти і фосфоліпази Д на життєздатність гепатоцитів

Примітка. 1 – інтактні клітини; 2 – етанол; 3 – бутанол; 4 – вортманін; 5 – LY294002; 6 – пропранолол; 7 – галопемід; 8 – N-гексаноіл-D-сфінгозин (С6-церамід); 9 – апігенін-7-глюкозид; 10 – лютеолін-7-глюкозид

Встановлено, що внесення вортманіна або LY294002 в середовище інкубація гепатоцитів скасовує стимулюючий ефект інсуліна на продукцію [^{14}C]ФЕТ (Рис. 3.4 А), а також на поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і синтез [^{14}C]глікогена (Рис. 3.4 Б).

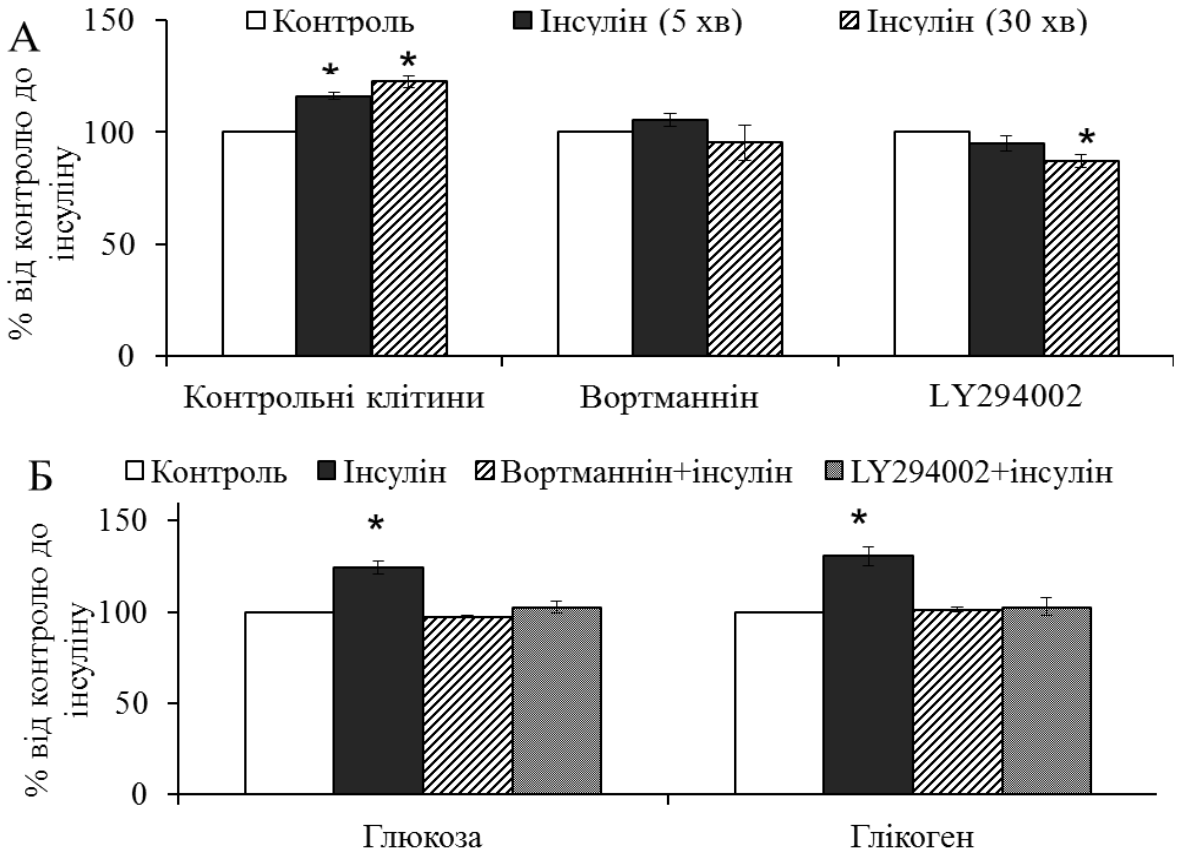

Рис. 3.4 Вплив інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази (вортманіна і LY294002) на активацію інсуліном фосфоліпази Д (А), поглинання [^{3}H]глюкози (Б) і синтез [^{14}C]глікогена (Б)

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$

Оскільки передбачається, що гальмування ФЛД може змінювати сигналінг інсуліна, на даному етапі цієї роботи було вивчено, чи може гостре пригнічення ФЛД за допомогою загального антагоніста (1-бутанолу) впливати на індуковані інсуліном поглинання глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах. Встановлено, що додавання 1-бутанолу в середовище інкубації призводить до збільшення утворення [^{14}C]ФБУТ в клітинах, стимульованих інсуліном. У той же час, внесення 2-бутанолу (контроль) у середовище інкубації гепатоцитів, попередньо мічених [^{14}C]пальмітиновою кислотою, практично не супроводжується накопиченням міченого [^{14}C]ФБУТ в стимульованих інсуліном і не стимульованих клітинах (Рис. 3.5 А).

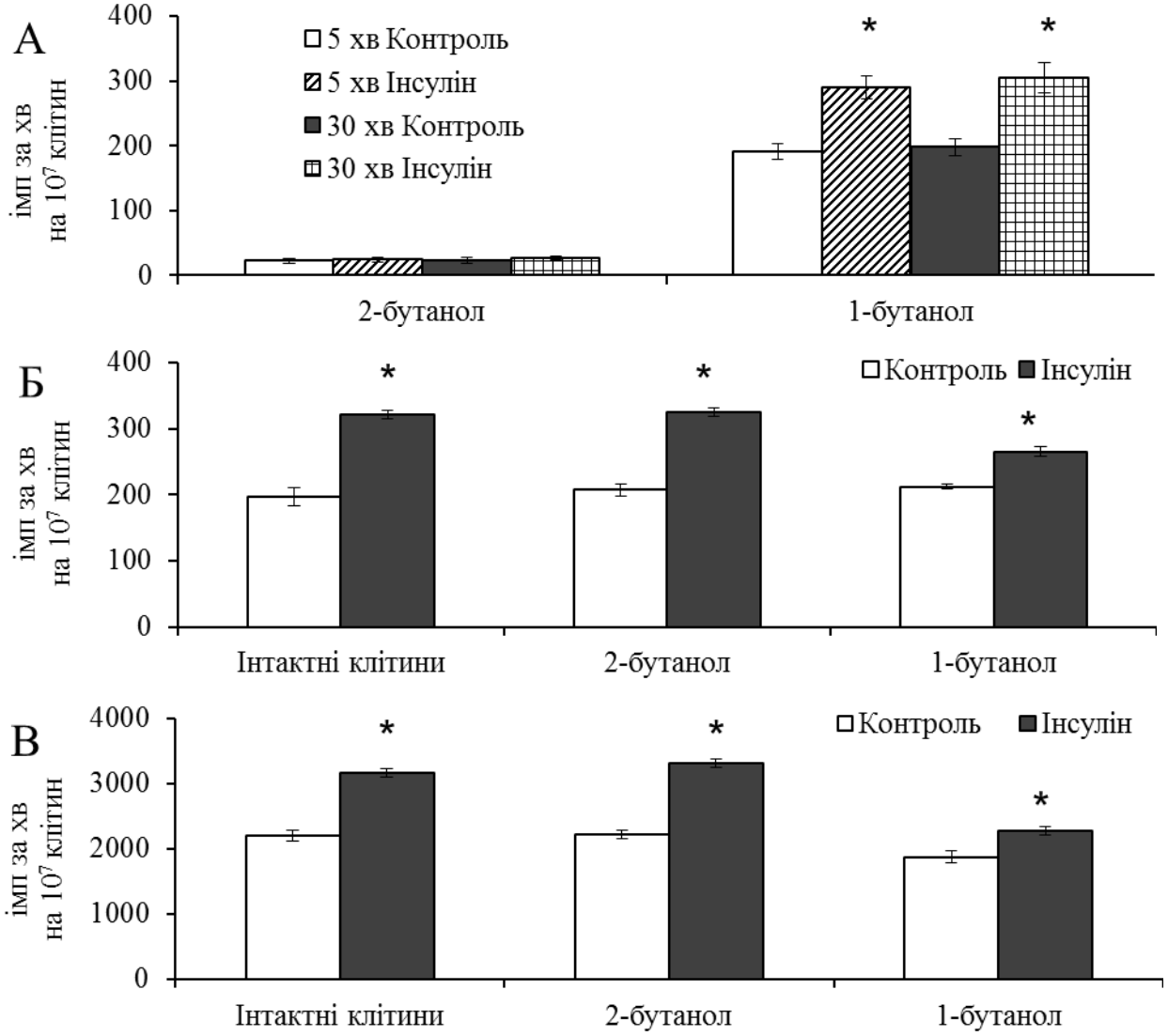

Рис. 3.5 Вплив 2-бутанолу та 1-бутанолу на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д (вміст міченого продукту реакції - [^{14}C]фосфатидилбутанола) (А), поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози (Б) і синтез [^{14}C]глікогена (В) в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$

Також, 2-бутанол не впливає на стимулюючу дію інсуліна відносно поглинання [^{3}H]глюкози (Рис. 3.5 Б) і синтеза [^{14}C]глікогена (Рис. 3.5 В).

У той же час 1-бутанол редукує активацію метаболізму глюкози інсуліном в гепатоцитах (Рис. 3.5 Б і В). Ці дані підтверджують участь системи ФЛД/ФК в

регуляції поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах молодих статевозрілих щурів 3-місячного віку.

У культурі гепатоцитів групою під керівництвом Donchenko було показано, що стимуляція клітин інсуліном призводить до утворення ДАГ і ФК [14]. ФК утворюється в результаті дії ФХ-специфічної ФЛД. У той час як ДАГ може бути утворений з ФХ в результаті дії ФЛС, або в результаті гідролізу ФК фосфатазою фосфатидної кислоти (ФФК). ФФК є важливим ферментом, що визначає баланс між двома сигнальними молекулами ФК і ДАГ і, відповідно, грає важливу роль в регуляції функціонування сигнального каскаду інсуліна. Є дані, що стосуються утворення ФК і ДАГ в синаптосомах кори головного мозку щурів, де інсулін поряд з ФЛД також активує ФФК і індукує утворення сигнальних молекул ФК і ДАГ [211].

Пропранолол є антагоністом бета-адренергічного рецептора. Крім того, він блокує утворення ДАГ шляхом пригнічення ФФК. Пропранолол є зручним інструментом для з'ясування ролі ФЛД/ФК в сигнальних шляхах гормонів.

Встановлено, що внесення пропранололу в середовище інкубації перед інсуліном не змінює життєздатність гепатоцитів (Рис. 3.3), але достовірно знижує утворення як [^{14}C]ФЕТ, так і [^{14}C]ДАГ в клітинах печінки.

Вміст [^{14}C]ФЕТ в клітинах печінки, стимульованих інсуліном або інсуліном і пропранололом, склало 9537 ± 625 і 5504 ± 327 * імп за хв на 10^7 клітин (* p<0,05, інсулін + пропранолол в порівнянні з інсуліном), відповідно. Вміст [^{14}C]ДАГ в гепатоцитах, стимульованих інсуліном або інсуліном і пропранололом, склало 3925 ± 642 і 1936 ± 178 * імп за хв на 10^7 клітин (* p<0,05, інсулін + пропранолол в порівнянні з інсуліном), відповідно. Крім того, пропранолол скасовував стимулюючу дію інсуліна на поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D -глюкози гепатоцитами (Рис. 3.6).

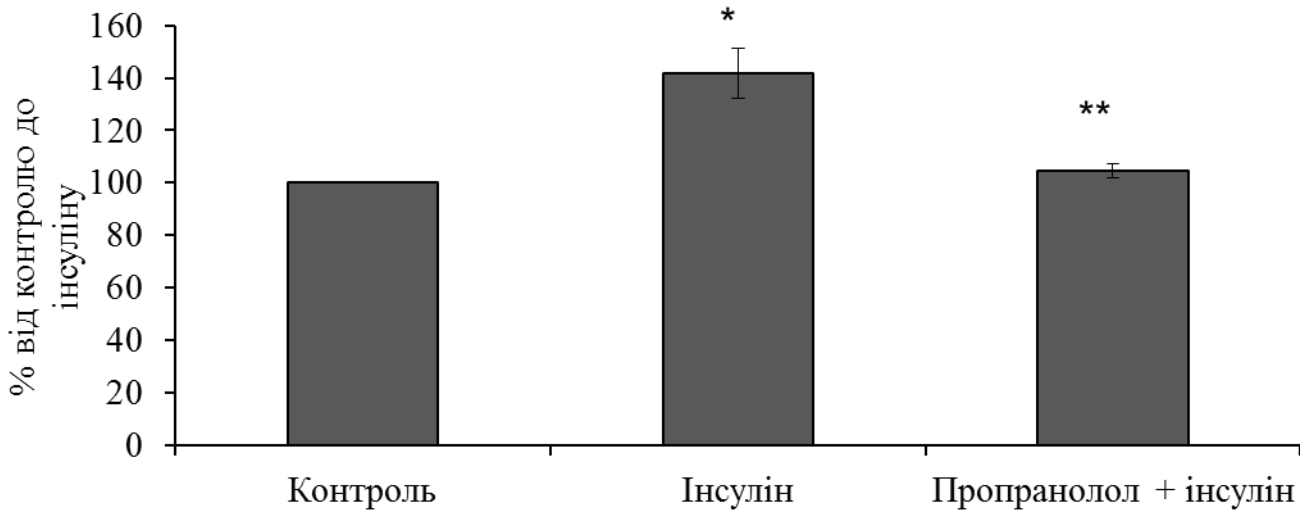

Рис. 3.6. Вплив пропранололу на стимульоване поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо 0,9 % NaCl до інсуліна, $p \leq 0,05$; ** – статистично значимо в порівнянні з інсуліном, $p \leq 0,05$

Показано, що ізоформи ФЛД1 і ФЛД2 експресуються в широкому спектрі видів клітин. Обидві ФЛД можуть активуватися інсуліном в тканинах-мішенях [11, 12, 90, 206, 209]. Для подальшого вивчення участі ФЛД в сигналінгу інсуліна в клітинах печінки, ми використовували специфічний інгібітор ФЛД, галопемід [13, 210], а також, добре відомий інгібітор, антагонист стимульованої активності ФЛД, церамід [211, 212]. Галопемід і все аналоги галопеміда описані в літературі як прямі подвійні інгібітори активності ФЛД1/2 [213]. Механізм дії цих інгібіторів полягає у блокуванні каталітичного центру ФЛД і сайту зв'язування кофактору $PIns(4,5)P_2$ [214, 215]. Попередня обробка гепатоцитів галопемідом в концентраціях 200 і 300 нМ скасовувала стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД (Рис. 3.7 А) і значимо редукувала індукцію поглинання глюкози (Рис. 3.7 Б) і синтеза глікогена (Рис. 3.7 В) інсуліном. Однак інкубація гепатоцитів щурів в присутності галопеміда не вплинуло на життєздатність клітин (Рис. 3.3) та на базальну активність ФЛД в клітинах печінки (Рис. 3.7 А).

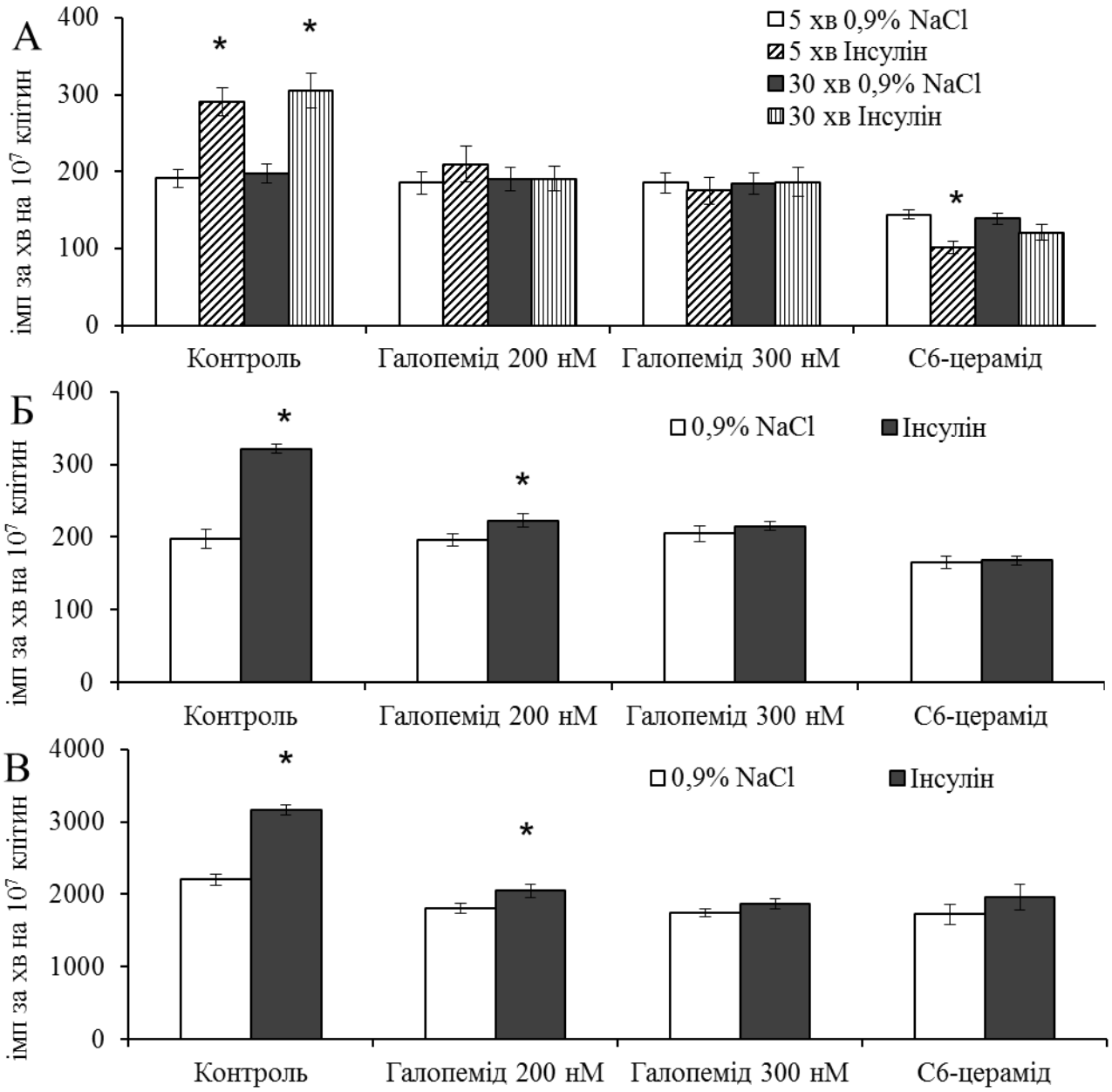

Рис. 3.7 Вплив галопеміда і С6-цераміда на стимульовану інсуліном активацію ФЛД (А), поглинання глюкози (Б) і синтез глікогена (В)

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з контролем до інсуліна (0,9% NaCl), $p \leq 0,05$

Галопемід не вплинув на поглинання глюкози (Рис. 3.7 Б) і синтез глікогена (Рис. 3.7 В) в клітинах печінки, стимульованих інсуліном. І навпаки, встановлено, що внесення в середовище інкубації екзогенного С6-цераміда, який вибірково знижує активність і експресію ФЛД1 [182, 183], редукувало базальну активність ФЛД (Рис. 3.7 А), поглинання глюкози (Рис. 3.7 Б) і синтез глікогена в гепатоцитах

(Рис. 3.7 В). С6-церамід скасовував стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД (Рис. 3.7 А), поглинання глюкози (Рис. 3.7 Б) і синтез глікогена в гепатоцитах (Рис. 3.7 В). Короткочасна обробка гепатоцитів С6-церамідом не вплинула на життєздатність клітин печінки (Рис. 3.3).

На наступному етапі цього дослідження було вивчено вплив флавонів, лютеоліна і апігеніна, на ФЛД-залежний сигналінг інсуліна в первинній культурі гепатоцитів. Показано, що лютеолін і апігенін та їх глікозильовані форми є добре відомими модуляторами сигнальних шляхів інсуліна в клітинах-мішенях. Обидва флавони інгібують стимульовані інсуліном фосфорилювання/активацію Akt/ПКВ, транслокацию ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану і поглинання глюкози [216, 217].

У цій роботі ми вивчили вплив лютеоліна-7-глюкозида (ЛЮ7Гл) і апігеніна-7-глюкозида (АП7Гл) на активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах щурів, стимульованих інсуліном. Беручи до уваги той факт, що лютеолін пригнічує стимульоване інсуліном фосфорилювання β-субодиниці рецептора інсуліна, а апігенін має тільки тенденцію до пригнічення фосфорилювання інсулінового рецептора [21], в цьому дослідженні ми проводили експерименти двох типів: (1) флавони додавали до інкубаційного середовища перед інсуліном; (2) флавони додавали після внесення інсуліна. Фарбування трипановим синім не показало порушення проникності мембран гепатоцитів при дії ЛЮ7Гл або АП7Гл. Ці результати узгоджуються з роботами раніше проведеними на гепатоцитах, оброблених ЛЮ7Гл або АП7Гл [217, 218]. Внесення флавонів в середовище інкубації гепатоцитів попередньо інсуліна (Рис. 3.8 А, Б і В) або після нього (Рис. 3.8 Г, Д і Е), супроводжувалося значним зниженням стимульованої інсуліном активності ФЛД, а також поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах щурів, в той час як флавони не змінювали активність ФЛД і метаболізм глюкози в нестимулюваних клітинах.

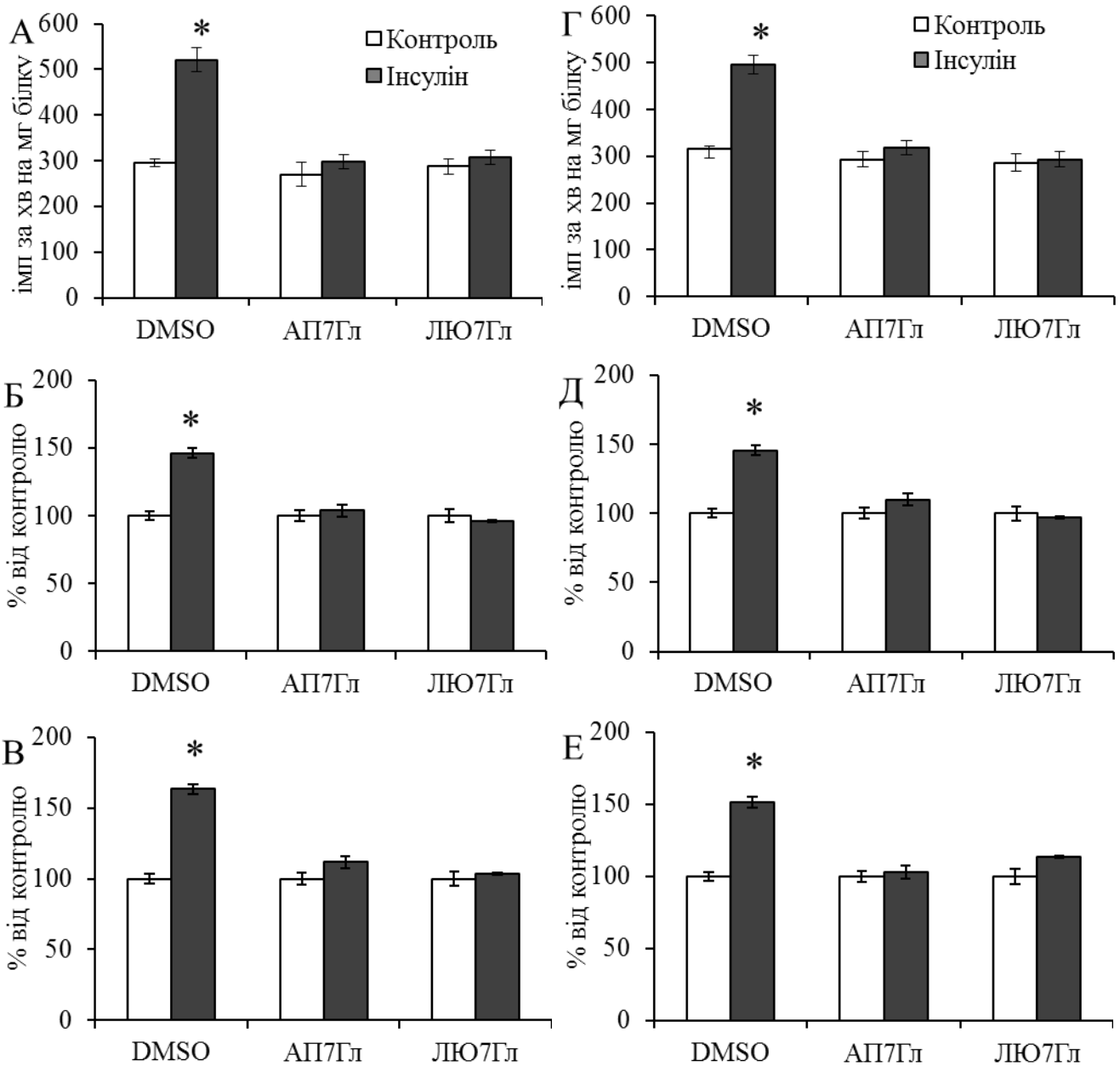

Рис. 3.8 Вплив апігеніна-7-глюкозида і лютеоліна-7-глюкозида на стимульовану інсуліном активацію фосфоліпази Д (А, Г), поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози (Б, Д) і синтеза [^{14}C]глікогена (В, Е) в ізольованих гепатоцитах

Примітки:

1. Флавоноїди додавали в середовище інкубації перед (А, Б, В) або після (Г, Д, Е) внесення інсуліна (див. розділ 2)

2. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, $p<0,05$

Між двома типами експериментів не було виявлено відмінностей. Отримані дані дозволяють припустити, що обидва препарати, ЛЮ7Гл і АП7Гл, діють переважно після рецептора інсуліна і є потужними супрессорами стимульованої інсуліном активності ФЛД і метаболізму глюкози в клітинах печінки.

Відомо, що печінка є мішенню дії інсуліна і відіграє надзвичайно важливу роль в регуляції гомеостазу глюкози в організмі. На мишах, нокаутних по рецептору інсуліна (LIRKO), в якості моделі прямої інсулінорезистентності печінки було показано, що інсулінорезистентність печінки сама по собі може призводити до дисліпідемії і посилювати ризик розвитку атеросклерозу, асоційований з метаболічним синдромом [219]. У мишей нокаутних по рецептору інсуліна розвивалася гіперінсулінемія і резистентність печінки до дії гормону. Інактивація гена рецептора інсуліна тільки в гепатоцитах LIRKO мишей призводила до повної втрати ранніх подій сигналінгу інсуліна, таких як фосфорилювання IRS1/2, запасання глікогена і пригнічення продукції глюкози [220]. Більш того, інсулінорезистентність печінки може викликати гіперплазію β-клітин підшлункової залози, що спостерігається при діабеті 2 типу.

В гепатоцитах, інсулін в нормі діє через рецептори на клітинній поверхні пригнічуючи глікогеноліз та глюконеогенез і активуючи синтез глікогена і ліпогенез. Цей сигнальний шлях включає в себе рецептор інсуліна, білки IRS, ФІ3-кіназу, Akt/ПКВ, FOXO1 та інші медіатори і вивчений досить добре. Також добре вивчена важлива роль концентрацій інсуліна в плазмі та чутливості клітин до інсуліна в контролі метаболізму глюкози в печінці [204, 221]. Однак, роль ФЛД в регуляції інсуліном поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах залишається не цілком ясною. Ми показали що інсулін стимулює активність ФЛД в класичних мішенях (м'язова тканина, клітини печінки), а також в неокортексі. Індукована інсуліном активація ФЛД в м'язовій тканині, гепатоцитах і неокортексі супроводжується посиленням поглинання глюкози і синтеза глікогена [199, 222, 223].

Стимуляція інсуліном рецепторів на поверхні клітин-мішеней вмикає транслокацию білків АДФ-рибозилюючого фактора (ARF) в плазматичну мембрану і наступну активацію ФЛД [221, 224]. На клітинах HIRcB, клітинної лінії фібробластів Rat-1, які експресують людські рецептори інсуліна, було встановлено, що активація ARF може регулюватися специфічними факторами обміну нуклеотидів, членами родини цитохезін/ARF (ARNO). Інсулін, зв'язуючись зі своїм рецептором, не тільки запускає фосфорилювання IRS1 і активацію ФІ3-кінази, але також запускає вбудовування в плазматичну мембрану ARNO або AFR-специфічних чинників які обмінюють нуклеотиди (GEFs). Вбудовування ARF-GEFs в плазматичну мембрану в стимульованих інсуліном клітинах стабілізується шляхом взаємодії їх РН-доменів з поліфосфоінозітидами, утвореними ФІ3-кіназою, і потім слідує активація ФЛД. Отримані в даній роботі результати про те, що специфічні інгібітори ФІ3-кінази, вортманін і LY294002, скасовують стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в клітинах печінки, дозволяють припустити, що ФІ3-кіназа відіграє важливу роль в активації ФЛД інсуліном. Крім того, ФІ3-кіназа-залежна активація ФЛД може брати участь в регуляції інсуліном метаболізму глюкози в первинних гепатоцитах. Для того, щоб прояснити внесок ФЛД в регуляцію метаболізму глюкози в гепатоцитах, стимульованих інсуліном, клітини печінки попередньо були оброблені різними інгібіторами ФЛД/ФК.

Щоб запобігти ФЛД-залежному утворенню та накопиченню ФК в гепатоцитах, стимульованих інсуліном, в даній роботі використовували 1-бутанол або 2-бутанол (в якості контролю). Інкубування клітин печінки в присутності 1-бутанолу перед внесенням інсуліна не змінювало стимулюючий ефект гормону на активність ФЛД і достовірно знижувало, але не скасовувало індукцію поглинання глюкози і синтеза глікогена інсуліном в гепатоцитах. У той же час 2-бутанол практично не використовувався в реакції трансфосфатидилювання, яку каталізує ФЛД і, таким чином, не міг запобігти накопиченню ФК і стимуляції метаболізму глюкози в клітинах печінки, стимульованих інсуліном. Крім того, виявлено, що

гальмування ФФК і перетворення ФК в інший сигнальний медіатор інсуліна, ДАГ, за допомогою пропранололу скасовувало стимулюючий вплив інсуліна на активність ФЛД і поглинання глюкози в гепатоцитах. Отримані результати показують, що активація ФФК і продукція ДАГ відіграють важливу роль в регуляції метаболізму глюкози в гепатоцитах. Однак пропранолол може впливати не тільки на метаболізм ФК, а й на інші компоненти сигнальних шляхів інсуліна, що ускладнює інтерпретацію результатів при використанні цього препарату в дослідженнях сигнальної трансдукції. Беручи до уваги той факт, що пропранолол пригнічує не тільки ФФК, але також ПКС [220] і ПКС залежну активність ФЛД [202, 225, 226], не можна виключати, що цей препарат, пригнічуючи ПКС, може редукувати стимуляцію ФЛД інсуліном в гепатоцитах щурів.

На гепатоцитах мишей, що експресують ключові ферменти, які каталізують продукцію ФК (діацилгліцеролкіназа-θ, ФЛД 1/2, і т.д.) було показано, що ФК, накопичення якої інгібує сигналінг інсуліна, має інше походження [226]. Зазвичай ФК накопичується в клітинах оброблених пропранололом в результаті інгібування ФФК. Більш того, пропранолол, як було показано в нашій роботі, блокує метаболізм глюкози, індукований інсуліном. Ці результати, об'єднані разом, дозволяють припустити, що саме надмірне накопичення ФК є головною причиною порушення регуляції метаболізму глюкози пропранололом, але не збільшення продукції ДАГ.

Низкою дослідників було показано, що поряд з пропранололом етанол і бутанол можуть впливати не тільки на ФЛД і метаболізм ФК, але й на інші компоненти сигнальних шляхів інсуліна, зокрема, ПКС і рецептор інсуліна [222-224]. 1-бутанол, також як інгібітор ФІ3-кінази, LY294002, значно знижує фосфорилювання Akt/ПКВ по серину 473 і стимульовану ФЛД транслокацію ГЛЮТ1 в чутливих до інсуліна міобластах С2С12 [226]. 1-бутанол значимо редукує поглинання глюкози і активність аРКС (РКСξ/λ) під час стимуляції транспорту глюкози і ФЛД в м'язових клітинах [227].

Встановлено, що 1-бутанол блокує стимульоване глюкозою вивільнення інсуліна, однак при цьому не пригнічує продукцію ФК, в той час як інгібітор

ФЛД 1/2 FIPI, блокує утворення ФК, але має слабку дію на вивільнення інсуліна [13]. Ці дані вказують на те, що ФБУТ не є інертним ліпідом, але може бути потужним інгібітором секреторних шляхів. Зв'язок між ФЛД і фізіологічним станом клітини може визначатися і іншими підходами, такими як RNAi-опосередкована даунрегуляція окремих ізоформ ФЛД [228]. Хоча RNAi-опосередковані ефекти проявляються через години і дні, збільшуючи ймовірність вторинної дії нокауту ФЛД, тоді як використання специфічних інгібіторів дозволяє проаналізувати гостре пригнічення активності ФЛД.

В даному дослідженні вперше було показано, що галопемід скасовує стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД і достовірно редукує індукцію інсуліном поглинання глюкози і синтез глікогена в первинній культурі гепатоцитів. Галопемід і його аналоги є подвійними ФЛД1/2 інгібіторами [213]. Галопемід, аналог FIPI, широко використовується для пригнічення ФЛД, не є токсичним для клітин і не змінює фосфорилювання Akt/ПКВ і ERK як в нестимульований клітинах, так і в клітинах стимульованих сироваткою і, тих, які експресують дикий тип ФЛД1 і ФЛД2 [13]. Крім того, інгібітор ФЛД FIPI не змінює розподіл ФЛД в клітинах і доступність $PIns4,5P_2$ в плазматичній мембрані в клітинах, що експресуються ФЛД1 і ФЛД2. Таким чином, очевидно, що крім механізму прямого інгібування каталітичної активності ФЛД не встановлено інших механізмів дії інгібітора похідного галопеміда. У клітинах HepG2, також як і в первинній культурі гепатоцитів людини пригнічення ФЛД2 за допомогою siPLD2 або аналога галопеміда FIPI асоціюється з достовірним пригніченням активності атипової PKCξ [229]. Більш того було показано, що ФК може активувати PKCξ в скелетних м'язах [227]. Тому не виключено, що активація інсуліном ФЛД в гепатоцитах щурів може призводити до накопичення ФК і подальшої активації аПКС. Хоча слід зазначити, що надмірна активація аПКС може викликати інсулінорезистентність. На відміну від патофізіологічних умов, індукована інсуліном продукція ФК ФЛД в нормальних клітинах надалі піддається перетворенню в лізоФК, ДАГ або фосфоліпіди. Це запобігає перевантаженню клітин ФК і подальшій надлишковій актвації аПКС.

ФЛД1 і ФЛД2 беруть участь в сигнальній трансдукції інсуліна [11, 12, 90, 206]. Експресія каталітично неактивних форм ФЛД2 в клітинах HIRcB блокує індуковану інсуліном активацію ФЛД і фосфорилювання МАРК, тоді як каталітично неактивна ФЛД1 не чинить такого впливу [206]. Ці дані дозволяють припустити, що ФЛД2 є головним типом фосфоліпаз, що бере участь в інсулін-залежному сигналінгу ФЛД. В ембріональних клітинах нирок-293 людини інсулін індукує активність ФЛД1 і ФЛД2 [11]. Більш того, встановлена спільна локалізація ФЛД1, але не ФЛД2, з ГЛЮТ4 у внутрішньоклітинних мембранах 3T3-L1 адипоцитів [92]. Було показано посилення транслокації ГЛЮТ4 при мікроін'єкції очищеної ФЛД в культивованих адипоцитах при дії інсуліна. Активація ФЛД1 є швидкість-лімітуючим кроком в процесі стимульованого інсуліном злиття везикул, що містять ГЛЮТ4, з плазматичною мембраною і посилення поглинання глюкози в адипоцитах [101]. Різні типи ГЛЮТ [230] і ГЛЮТ4, серед них [102, 120], експресуються в печінці і гепатоцитах. З огляду на всі ці дані і отримані результати можна припустити, що ФЛД бере участь в ГЛЮТ-залежній регуляції метаболізму глюкози в стимульованих інсуліном гепатоцитах.

Сфінголіпід церамід є добре відомим інгібітором сигналінгу інсуліна в гормон-чутливих клітинах. Церамід пригнічує синтез глікогена, індукуючи дефосфорилювання і інгібування Akt/ПКВ і запобігаючи транслокації протеїнкінази в плазматичну мембрану. Було показано, що церамід підсилює фосфорилювання Thr-563/560-PKCξ/λ, тим самим імітуючи дію інсуліна і PIns3,4,5P_3 (продукту ФІ3-кінази) на аПКС в печінці мишей [231]. Більш того, С6-церамід (але не його неактивний аналог, дигідро-С6-церамід) індукує активність PKCξ і також викликає вибіркове посилення асоціювання між Akt і PKCξ [232]. С6-церамід, також як С2-церамід, не змінює фосфорилювання Akt в нестимулюваних клітинах і в клітинах, що експресують домінантну негативну PKCξ і знижує фосфорилювання Akt в клітинах стимульованих фактором росту тромбоцитів [233]. Ці дані наводять на думку, що опосередкована церамідами надлишкова активація PKCξ призводить до зниження фосфорилювання Akt.

ФЛД є важливою мішенню цераміда в клітинах. Церамід пригнічує ФЛД, конкуруючи з $PIns4,5P_2$ за каталітичний центр ферменту [24] і блокуючи траслокацію білка ARF і ПКС в клітинні мембрани [26]. Крім того, церамід може порушувати структуру ліпідних рафтів і таким чином пригнічувати активність ФЛД [25] і знижувати експресію ФЛД в стимульованих клітинах [234]. С6-церамід, як було показано в даному дослідженні, редукує базальну активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах і скасовує стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД і метаболізм глюкози в клітинах печінки [235, 236]. Ці результати підтверджують і розширюють уявлення про значущу роль ФЛД в регуляції метаболізму глюкози в первинній культурі гепатоцитів, стимульованих інсуліном.

Раніше було показано, що флавони є потужними модуляторами як обміну сфінгомієліна, так і сигналінгу інсуліна в клітинах печінки. Апігенін, АП7Гл, і інші флавоноїди з Chamomilla recutita пригнічують нейтральну сфінгомієліназу, запобігаючи продукції і накопиченню цераміда в клітинах молодих щурів оброблених CCl_4- і етанолом [217]. АП7Гл, також як ЛЮ7Гл, скасовує збільшення рівня цераміду в гепатоцитах старих щурів, шляхом пригнічення нейтральної СФМази [21]. Хоча обидва препарати, АП7Гл і ЛЮ7Гл, не змінюють вміст цераміда і обмін сфінгомієліна в гепатоцитах 3-місячних щурів [21, 217]. На клітинах гепатоми людини (HepG2), адипоцитах і епітеліальних клітинах було показано, що флавони, апігенін і лютеолін, відповідальні за інгібування активації і фосфорилювання Akt і Akt-залежного сигнального шляху [216, 217, 237]. ЛЮ7Гл, діє подібно лютеоліну [238]. Апігенін і лютеолін також інгібують стимульовану інсуліном активацію даунстрім ефектора ФІ3-кінази, Akt, і пригнічують стимульовану інсуліном транслокацию ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану і поглинання 2-деокси-D-[1-^{3}H]-глюкози адипоцитами мишей [216]. Апігенін і лютеолін, внесені через 15 хв після інсуліна, скасовують фосфорилювання Akt в наступні 30 хв і редукують базальне фосфорилювання Akt в клітинах HepG2 [216]. Ми з'ясували, що АП7Гл і ЛЮ7Гл є потужними супрессорами активації ФЛД і метаболізму глюкози в клітинах печінки стимульованих інсуліном. Інгібіторна дія

АП7Гл і ЛЮ7Гл на активність ФЛД і обмін глюкози не залежить від дії флавонів на рецептори інсуліна. Більш того, дія флавонів на сигналінг інсуліна не залежить від накопичення церамідів в гепатоцитах [21, 217]. Разом узяті ці результати дозволяють зробити висновок про те, що активація ФЛД в стимульованих інсуліном гепатоцитах, знаходиться після Akt/ПКВ.

Таким чином, в цьому дослідженні встановлено, що інсулін активує ФХ-специфічну ФЛД як в класичних тканинах-мішенях інсуліна (печінці і м'язах), так і в корі мозку. Активація ФЛД в первинних гепатоцитах, стимульованих інсуліном, асоціюється з посиленням поглинання глюкози і синтеза глікогена. Блокування накопичення ФК, утвореної ФЛД, 1-бутанолом запобігає стимулювання метаболізму глюкози інсуліном в клітинах печінки, тоді як перетворення ФК в інший сигнальний медіатор, ДАГ, пропранололом скасовує стимулюючий ефект інсуліна на активність ФЛД і поглинання глюкози гепатоцитами. Крім того, той факт, що індукована інсуліном активація сигнального шляху ФЛД/ФК блокується специфічними інгібіторами ФІ3-кінази доводить те, що ФЛД активується інсуліном в сигнальному каскаді після ФІ3-кінази. Зміни в інсулін-стимульованій активності ФЛД індуковані АП7Гл/ЛЮ7Гл дозволяють припустити, що ФЛД активується в сигнальному каскаді після Akt/ПКВ. Регуляція ФЛД і метаболізму глюкози інсуліном в первинних гепатоцитах є чутливою до антагоніста ФІ3-кіназа/Akt/ПКВ-сигнальних шляхів, цераміда. Активація ФЛД, також як і метаболізм глюкози, в стимульованих інсуліном клітинах може бути значно скорочена за допомогою екзогенного С6-цераміду. Беручи до уваги той факт, що церамід, також як 1-бутанол і пропранолол, може діяти не тільки на сигнальний шлях ФЛД/ФК, але також і на інших учасників сигнальних шляхів інсуліна, використання специфічного інгібітора ФЛД галопеміда прояснює роль ФЛД в регуляції метаболізму глюкози інсуліном. Галопемід пригнічує активність ФЛД і значно редукує стимуляцію поглинання глюкози і синтез глікогена інсуліном в гепатоцитах. Таким чином, очевидно, що ФЛД грає важливу роль в сигналінгу інсуліна. ФЛД, що активується після ФІ3-кінази/Akt/ПКВ, є дуже чутливою до вмісту цераміду в первинних гепатоцитах.

Модуляція активності ФЛД в клітинах за допомогою специфічних інгібіторів може бути зручним інструментом для зміни чутливості гепатоцитів до дії інсуліна.

3. 1. 2 Фосфатидилінозіт-3-кіназо- і фосфоліпазо Д-залежна сигналізація інсуліна в мозку

ФЛД є важливим учасником різних сигнальних шляхів і бере участь в зростанні і розвитку клітин мозку. Активація ФЛД є необхідною умовою проліферації астроглії, процесів синапто- і мієлогенеза в мозку при формуванні аксонів [71, 72], а також процесів ендоцитозу рецепторів і екзоцитозу нейротрансмітерів [63-65]. Крім того, при активації ФЛД утворюється вільний холін, необхідний для синтеза ацетилхоліну [239]. Мітогенні фактори, нейротрансмітери, фактори росту і гормони активують ФЛД в нейронах і астроцитах. Однак, існують лише поодинокі дані про активацію ФЛД в мозку у відповідь на дію інсуліна [15]. Крім того, функціональне значення індукованої інсуліном активності ФЛД в мозку залишається невивченим.

Дія інсуліна на периферичні тканини-мішені полягає в стимуляції поглинання, окислення і запасання глюкози. В ЦНС інсулін модулює зростання нейронів і гліальних клітин, їх виживання, диференціювання, міграцію, експресію генів, синтез білка, складання цитоскелета і формування синапсів [127, 240]. Поглинання і утилізація глюкози в мозку опосередковується транспортними білками ГЛЮТ, експресія та функціонування яких регулюється інсуліном. ГЛЮТ4, поряд з рецепторами інсуліна, широко експресуються в структурах мозку [240] 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, глюкоза необхідна для збереження гомеостазу нейротрансмітерів під час синаптичної активності клітин [150, 241]. Показано, що порушення утилізації глюкози в мозку, пов'язане з інсулінорезистентністю мозку, опосередковується порушенням трафіку ГЛЮТ4 між цитозолем і плазматичною мембраною [242, 243].

У периферійних тканинах-мішенях інсуліна, таких як м'язова і жирова тканини, ФЛД, стимульована інсуліном, є важливим учасником процесу транслокації транспортерів ГЛЮТ4 в плазматичну мембрану з їх внутрішньоклітинних депо [10, 12]. Показано, що в гепатоцитах ФЛД регулюється ФІ3-кіназою і Akt/ПКВ [197]. Пригнічення інсулін-залежної ФЛД за допомогою специфічних інгібіторів супроводжується пригніченням процесів метаболізму глюкози. Регуляція ФЛД і метаболізму глюкози інсуліном в гепатоцитах чутлива до відомого антагоніста сигнальних шляхів інсуліна цераміда. Так, активація інсуліном ФЛД, процесів поглинання глюкози і синтеза глікогена пригнічується екзогенним С6-церамідом і ендогенними церамідами, накопичення яких індукується фармакологічним препаратом доксорубіцином. Чутливість гепатоцитів відновлюється за допомогою різних специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ, які знижують вміст церамідів в клітинах печінки. [150].

У даній роботі за допомогою специфічних інгібіторів ФІ3-кінази і ФЛД вивчали ФЛД-залежну регуляцію інсуліном метаболізму глюкози в неокортексі дорослих тварин. Встановлено, що активація інсуліном транспорту глюкози в мозку багато в чому визначена послідовною активацією ФІ3-кінази і ФЛД. Інсулін-залежна регуляція ФЛД в мозку чутлива до дії ендогенного модулятора сигналінгу інсуліна – цераміду. Порушенню сигналінгу інсуліна, що викликане накопиченням цераміду в неокортексі, можна запобігти за допомогою пригнічення синтеза цераміду *de novo.*

Інсулін стимулює активність ФЛД, поглинання глюкози і синтез глікогена в класичних тканинах-мішенях (м'язи, клітини печінки). Раніше, роботами нашої лабораторії було показано, що інсулін також індукує активацію ФЛД в неокортексі 3-місячних щурів [167, 197]. Крім того, було встановлено, що інсулін стимулює поглинання глюкози в неокортексі молодих тварин [195]. Однак роль ФЛД в регуляції інсуліном метаболізму глюкози в неокортексі залишається не цілком ясною. У клітинах печінки ФЛД, яка індукується інсуліном, знаходиться під контролем ФІ3-кінази [197]. Даним дослідженням встановлено, що внесення

інгібіторів ФІ3-кінази, вортманіна або LY294002, до інкубаційного середовища тканини неокортексу скасовує стимулюючий ефект інсуліна на продукцію ФЛзой Д [^{14}C]ФЕТ (Рис. 3.9), а також на поглинання [^{3}H]глюкози (Рис. 3.10).

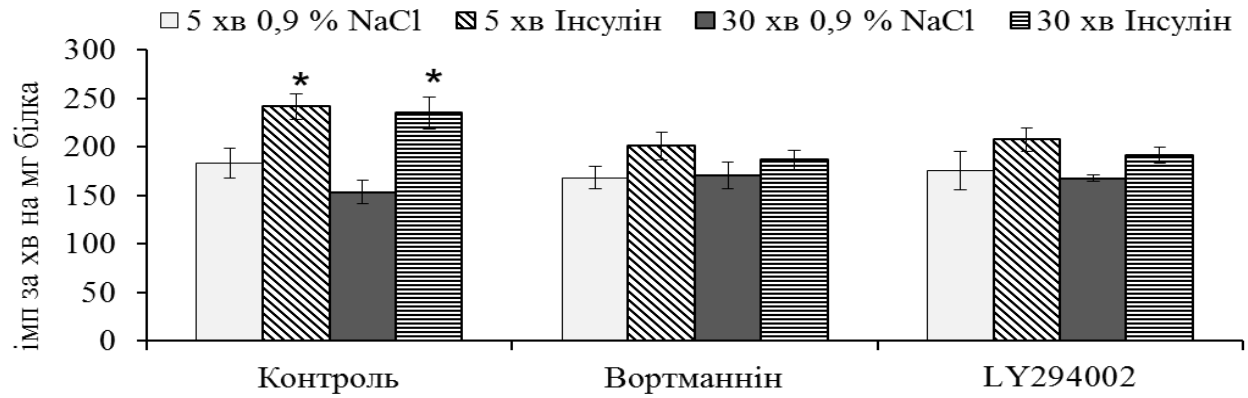

Рис. 3.9 Вплив інгібіторів фосфатидилінозітол-3-кінази, вортманіна і LY294002, на активацію інсуліном фосфоліпази Д

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9% NaCl), $p \leq 0,05$

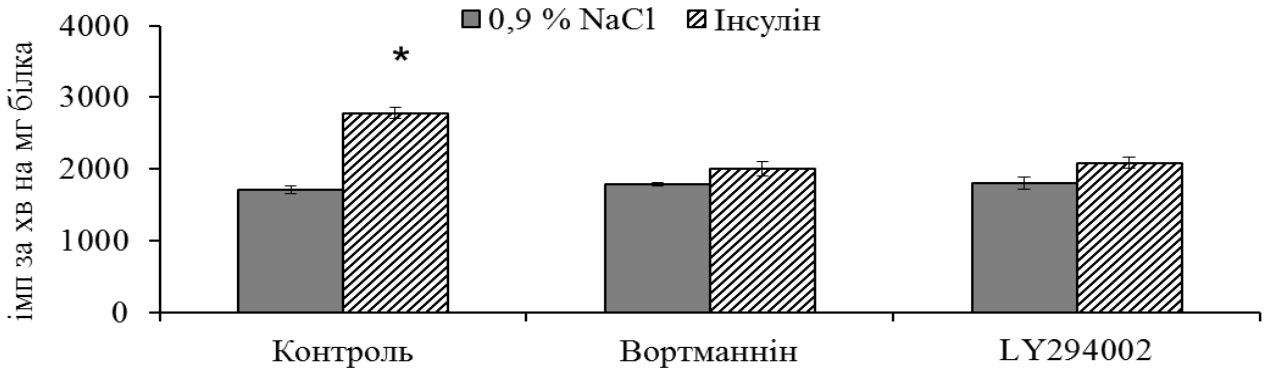

Рис. 3.10 Вплив інгібіторів фосфатидилінозітол 3-кінази, вортманіна і LY294002, на активацію інсуліном поглинання глюкози

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Для того щоб з'ясувати чи впливає інгібування ФЛД на реалізацію сигнала інсуліна в процесі поглинання глюкози тканиною неокортексу на наступному етапі цього дослідження був використаний специфічний інгібітор ФЛД – галопемід. Встановлено, що внесення галопеміда в середовище інкубації неокортексу молодих

щурів, попередньо міченого ^{14}С-пальмітиновою кислотою, запобігає накопиченню [^{14}С]ФЕТ при стимулюванні нервової тканини інсуліном (Рис. 3.11).

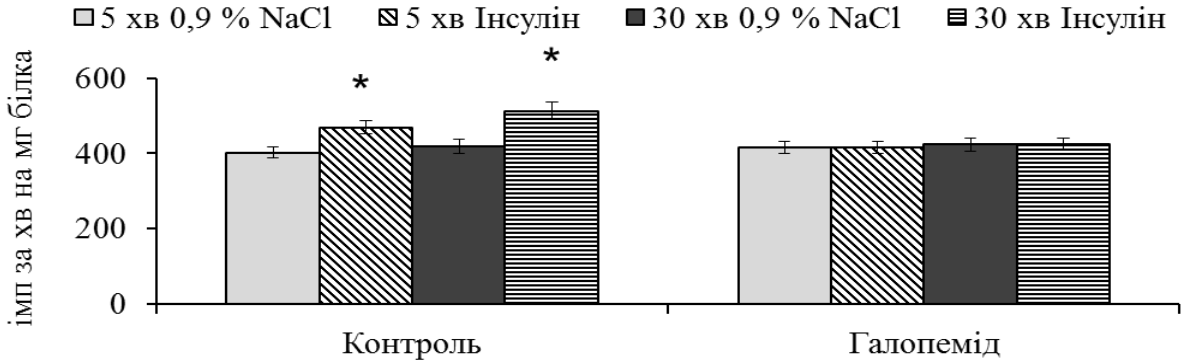

Рис. 3.11 Вплив галопеміда на активацію фосфоліпази Д інсуліном в неокортексі щурів 3-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Крім того, галопемід також редукує стимульоване інсуліном поглинання глюкози тканиною неокортексу (Рис. 3.12).

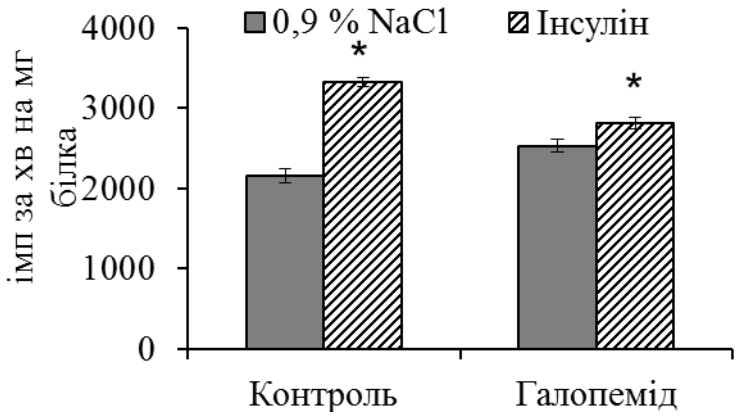

Рис. 3.12 Вплив галопеміда на індукцію інсуліном поглинання глюкози в неокортексі 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Церамід, з одного боку, є відомим інгібітором ФЛД, а з іншого – пригнічує цілий ряд ключових молекул сигнального каскаду інсуліна в периферичних тканинах. У даній роботі встановлено, що в неокортексі молодих щурів синтетичний

С6-цераміd не впливає на базальний вміст активності ФЛД (Рис. 3.13), але запобігає стимульованню інсуліном активності ФЛД (Рис. 3.13) і поглинання глюкози (Рис. 3.14).

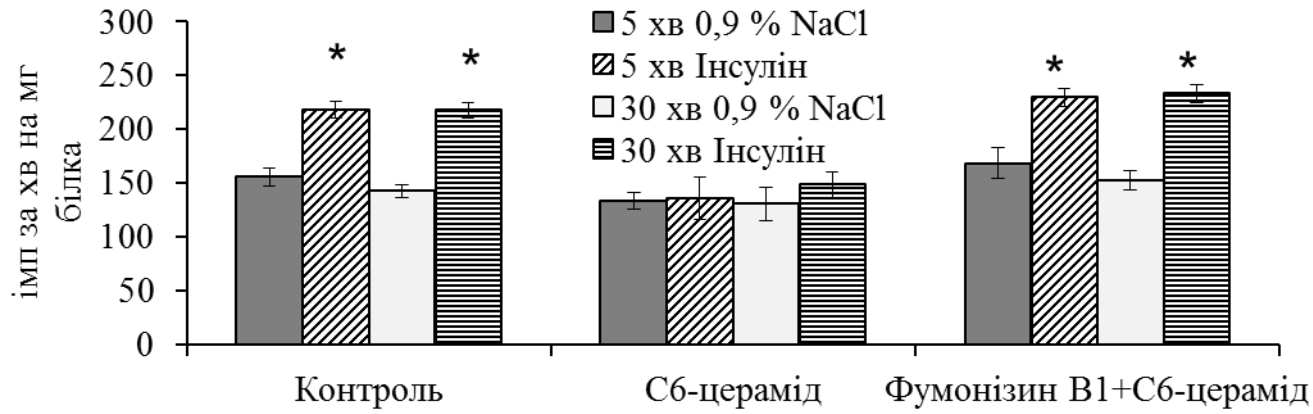

Рис. 3.13 Вплив екзогенного С6-цераміду і фумонізина В1 на активацію інсуліном ФЛД в неокортексі 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з 0,9 % NaCl, $p \leq 0,05$

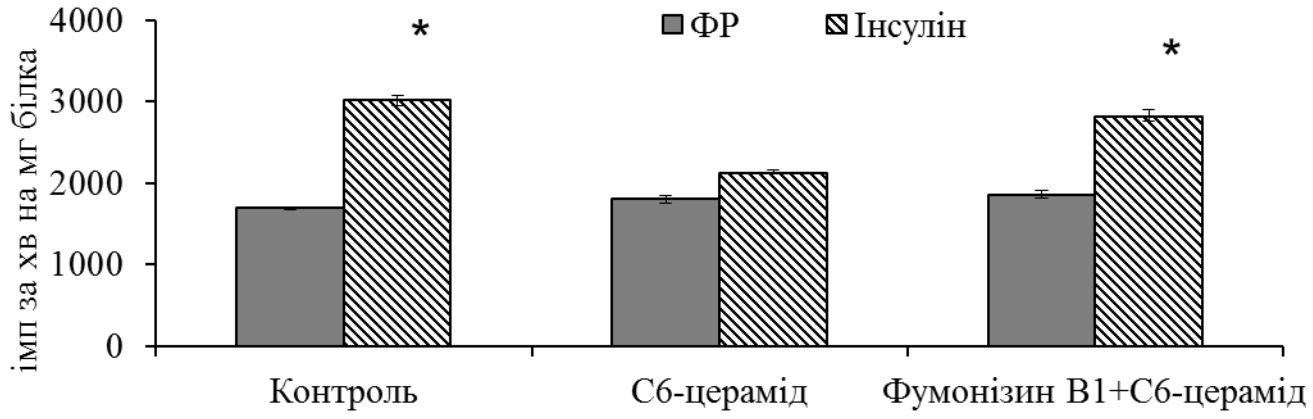

Рис. 3.14 Вплив екзогенного С6-цераміду і фумонізина В1 на індукцію інсуліном поглинання глюкозы в неокортексі 3-місячних щурів.

Примітка. * – статистично значимо у порівнянні з 0,9 % NaCl, $p \leq 0,05$.

Інкубація тканини неокортексу щурів в присутності фумонізина В1 – специфічного інгібітору синтеза цераміду *de novo* – скасовує інгібуючу дію екзогенного С6-цераміду на агоніст-стимульовану активацію ФЛД (Рис. 3.13) і поглинання глюкози (Рис. 3.14).

На наступному етапі цієї роботи було вивчено вплив екзогенного С6-цераміду на вміст ендогенних церамідів. Встановлено, що С6-церамід посилює включення міченої ^{14}С-пальмітинової кислоти в ендогенні цераміди неокортексу щурів, про що свідчить підвищення вмісту ^{14}С-цераміду (Рис. 3.15). У той же час попередня інкубація тканини неокортексу в присутності інгібітора синтеза церамідів *de novo* – фумонізина В1 – запобігає індукції С6-церамідом накопичення мічених ендогенних церамідів (Рис.3.15).

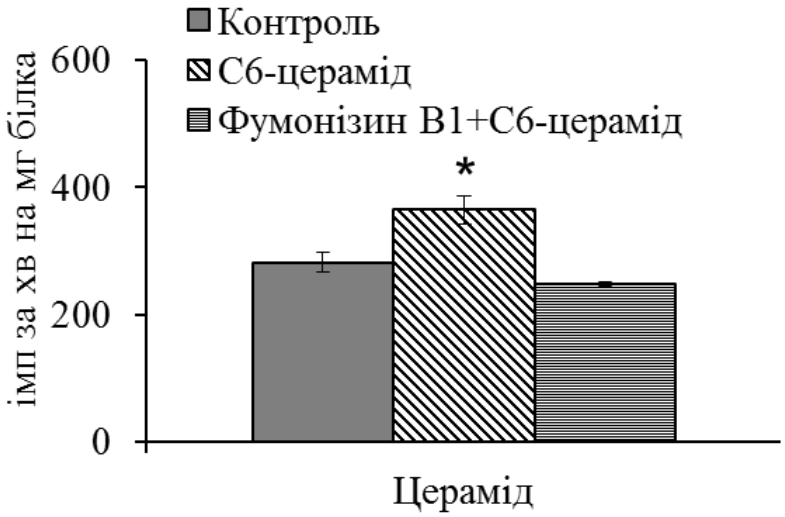

Рис. 3.15 Вплив екзогенного С6-цераміду і фумонізина В1 на вміст мічених церамідів в неокортексі 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем, $p \leq 0,05$

Нещодавно було встановлено, що мозок є тканиною чутливої до інсуліна і сигнальний каскад гормону має структуру подібну до такої в периферичних тканинах [127, 240]. Центральною регуляторною ланкою сигнального каскаду інсуліна в периферичних тканинах (м'язовій, жировій та клітинах печінки) є ФІ3-кіназа. Активація інсуліном сигнального шляху ФІ3-кінази викликає транслокацію інсулін-чутливих транспортерів глюкози на клітинну поверхню і посилення поглинання глюкози клітинами. Раніше вважалося, що метаболізм глюкози в мозку є процесом, який не залежить від інсуліна [244]. Однак недавніми дослідженнями було встановлено, що нейрони гіпокампу, які експресують високий вміст рецепторів інсуліна [245], інсулін-чутливих транспортерів глюкози ГЛЮТ4

[246] і ФІ3-кінази [247], можуть бути чутливі до дії інсуліна. Крім того, інсулін викликає транслокацію ГЛЮТ4 в мембрани гіпокампальних нейронів за механізмом схожим з дією гормону на периферичні тканини-мішені [245]. У той же час показано, що в кортикальних астроцитах метаболізм глюкози може контролюватися як сигнальним шляхом, залежним від ФІ3-кінази/Akt/ПКВ [247], так і незалежно від Akt/ПКВ, через ПКС і ФЛД [248]. Для того, щоб з'ясувати чи опосередковує ФІ3-кіназа дію інсуліна на активацію ФЛД і метаболізм глюкози в неокортексі були використані специфічні інгібітори ФІ3-кінази – вортманін і LY294002. Встановлено, що інгібітори ФІ3-кінази пригнічують як стимульовану інсуліном активацію ФЛД, так і індуковане гормоном поглинання глюкози тканиною неокортексу 3-місячних щурів. Отримані дані свідчать про те, що активація ФЛД інсуліном і поглинання глюкози в нервовій тканині знаходяться під контролем ФІ3-кінази.

Для того щоб з'ясувати внесок ФЛД в регуляцію метаболізму глюкози інсуліном в неокортексі, на наступному етапі роботи тканину мозку попередньо інкубували в присутності специфічного інгібітору ФЛД – галопеміда. Галопемід і його аналоги є інгібіторами ФЛД1/ФЛД2 [213] не токсичні для клітин і не впливають на ключові молекули інсулінового сигнального шляху (Akt/ПКВ і ERK) і не чинять впливу на внутрішньоклітинний розподіл ФЛД [13]. Дія інгібітора направлена безпосередньо на пригнічення каталітичної активності ФЛД. У літературі немає даних щодо впливу галопеміда на ФЛД мозку. У цьому дослідженні вперше було показано, що галопемід скасовує стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД і достовірно редукує поглинання [^{3}H]глюкози в неокортексі 3-місячних щурів.

Церамід є відомим інгібітором сигналінгу інсуліна в клітинах чутливих до дії гормону. Церамід шляхом дефосфорилювання, пригнічує активацію і транслокацию Akt/ПКВ в клітинну мембрану, тим самим пригнічуючи синтез глікогена в клітинах [221]. ФЛД є мішенню дії цераміду в клітинах [24, 213, 232, 249]. Церамід пригнічує активність ФЛД різними шляхами: пригнічуючи активність ПКС і мономерних G-білків [232], шляхом даунрегуляції транскрипції гена ФЛД [233] або

безпосередньо впливаючи на каталітичне ядро ферменту [24]. Коротколанцюгові екзогенні С2 і С6-цераміди пригнічують мітогенні ефекти ФЛД в фібробластах [251]. У попередніх роботах нашої лабораторії було встановлено, що внесення в середовище інкубації гепатоцитів екзогенного С6-цераміду, вибірково знижує активність і експресію ФЛД1 [174], редукує базальну і стимульовану інсуліном активність ФЛД і метаболізм глюкози в клітинах печінки [199, 200]. Показано, що в клітинах коротколанцюгові екзогенні цераміди можуть піддаватися гідролізу до сфінгозина і включатися в синтез довголанцюгових церамідів, тим самим викликаючи підвищення рівня ендогенних довголанцюгових церамідів [249]. Внесення в середовище інкубації тканини неокортексу молодих щурів синтетичного С6-цераміду викликало підвищення вмісту мічених ^{14}С-пальмітинової кислотою ендогенних церамідів. Крім того, збільшення рівня ендогенних церамідів супроводжувалося пригніченням інсулін-залежної ФЛД і поглинання глюкози в нервовій тканині [250]. У той же час запобігання накопиченню ендогенних церамідів за допомогою специфічного інгібітору синтеза сфінголіпідів, фумонізина В1, скасовувало інгібуючу дію С6-цераміду на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози. Таким чином, внесення в середовище інкубації тканини неокортексу щурів екзогенних церамідов призводить до індукції накопичення довголанцюгових ендогенних церамідів, які, ймовірно, опосередковують дію синтетичних сфінголіпідів на ФЛД-залежну ланка сигнального каскаду інсуліна.

У даній роботі встановлено, що в неокортексі щурів індукований інсуліном метаболізм глюкози залежить від регуляції активності ФЛД. Активація ФЛД інсуліном асоційована з посиленням поглинання глюкози нервовою тканиною. Крім того, індукована інсуліном активація ФЛД-залежного сигнального шляху може блокуватися специфічними інгібіторами ФІ3-кінази, що свідчить про те, що ФЛД в сигнальному каскаді інсуліна в неокортексі знаходиться після ФІ3-кінази. Пригнічення активації інсуліном ФЛД і поглинання глюкози за допомогою специфічного інгібітора галопеміда доводить участь ФЛД в процесі регуляції інсуліном метаболізму глюкози в неокортексі щурів. Крім того, ФЛД-залежний

сигнальний шлях інсуліна і метаболізм глюкози в неокортексу чутливі до зміни вмісту цераміду, антагоніста сигнальних шляхів гормону. Модуляція активності ФЛД за допомогою впливу на внутрішньоклітинний вміст церамідів є новою мішенню в подоланні порушення чутливості нервової тканини до дії гормонального стимулу.

3. 2 Моделювання вікових змін регулювання інсуліном фосфоліпази Д в клітинах- і тканинах мішенях

3. 2. 1 Вікові та експериментально індуковані зміни активації фосфоліпази Д інсуліном

Старіння є фактором ризику виникнення порушень, пов'язаних з проведенням фізіологічних сигналів гормонів, факторів росту, нейротрансмітерів і інших біологічно активних речовин [249, 251]. У старості відбувається порушення передавання сигнала інсуліна в клітину, причому ці процеси стосуються різних учасників каскаду гормону [252, 253], таких як IRS білки, Akt/ПКВ, ФІ3-кіназа. У той же час існують поодинокі дані, що стосуються зниження активації інсуліном ФЛД в старості [15]. З огляду на те, що ФЛД відіграє важливу роль в проведенні та реалізації сигнала інсуліна, а також той факт, що практично немає даних щодо вікових змін інсулін-залежної активації ферменту в досліджуваних тканинах-мішенях, наступним етапом нашої роботи стало вивчення активації ФЛД-залежного інсулінового сигнала в досліджуваних тканинах-мішенях гормону в старості. З цією метою були обрані класичні тканини – печінка і м'язова (діафрагма), а також некласична тканина-мішень – неокортексі, яка раніше вважалася нечутливою до дії інсуліна.

У попередньому розділі (див. розділ 3.1) було показано, що в класичних (тканині печінки і м'язовій тканині) і некласичній тканині (неокортексі) 3-місячних щурів інсулін індукує активацію ФХ-специфічної ФЛД.

Встановлено, що в клітинах печінки старих 24-місячних щурів при короткостроковій стимуляції клітин інсуліном відбувається зміна вмісту ФЕТ і ФХ відмінне від молодих 3-місячних тварин (Рис. 3.16). Відзначено статистично значуще зниження вмісту ФЕТ на 5ій хвилині інкубації з інсуліном. Після 30 хв впливу гормону вміст ФЕТ не змінився до статистично значущих значень. Також не виявлено статистично значущих змін у вмісті субстрату ФЛД – ФХ – ні в один з вивчених проміжків часу впливу гормону.

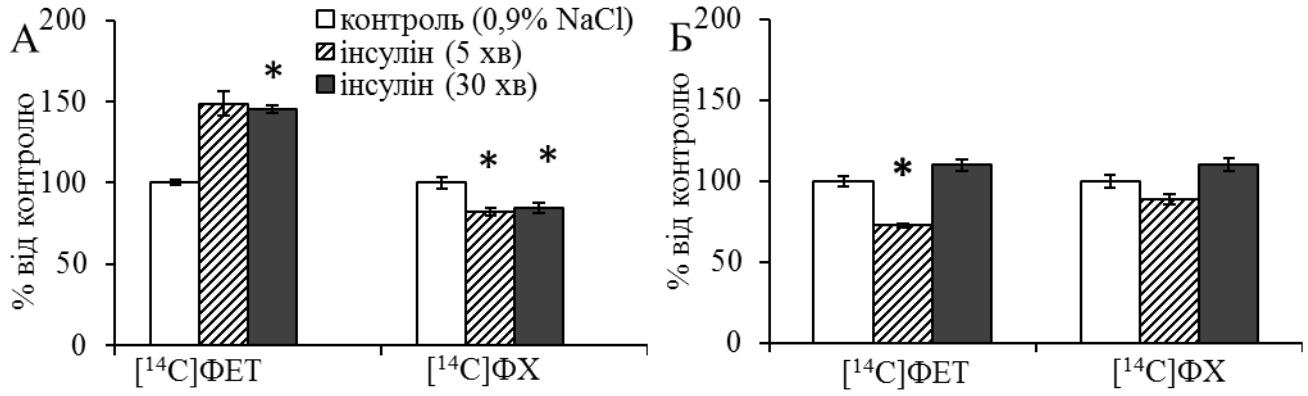

Рис. 3.16 Вплив інсуліна на активацію фосфоліпази Д в клітинах печінки 3-місячних (А) і 24-місячних (Б) щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Наступною мішенню дії інсуліна, в якій була вивчена інсулін-залежна активація ФЛД, є діафрагма. Встановлено, що в діафрагмі 24-місячних щурів, проінкубованої в присутності гормону протягом 5 хв, вміст ФЕТ складав 102,3±4,25 % порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl) (Рис. 3.17).

Після 30 хв інкубації з інсуліном вміст продукту реакції ФЕТ збільшився до 116,1±8,1 %. У той же час, вміст субстрату ФЛД – ФХ – після 5 хв інкубації складав 103,4±8,07 % порівняно з контролем до інсуліна, і 86,8±7,8 % після 30 хв інкубації, відповідно (Рис. 3.17). Зазначені зміни не є статистично значущими.

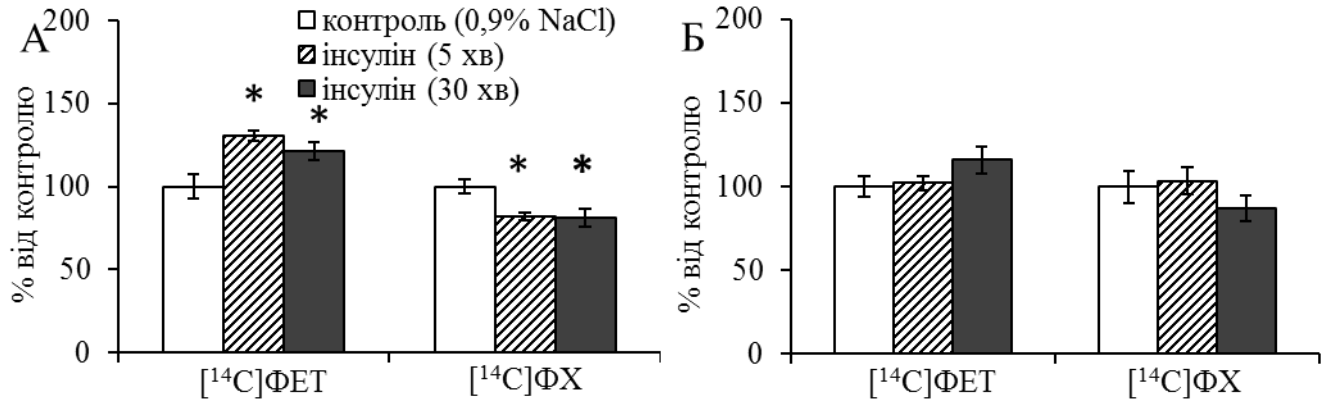

Рис. 3.17 Вплив інсуліна на активацію фосфоліпази Д в тканині діафрагми 3-місячних (А) і 24-місячних (Б) щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Недавніми дослідженнями показано, що інсулін, індукує активацію ФЛД не тільки в класичних тканинах-мішенях, таких як м'язова тканина і печінка [11, 14, 69, 80, 81], але також і в, здавалося б, такий нетиповій тканині для дії інсуліна, як нервова тканина [15]. Роботами Salvador і співавторів раніше було встановлено, що в синаптосомах кори головного мозку 4-місячних щурів інсулін активує ФЛД [15]. Існують дані про те, що нормальне функціонування клітин мозку, особливо нейронів, залежить від активності ФЛД під час формування синапсів, екзоцитозу нейротрансмітерів і ендоцитозу їх рецепторів [29].

Наступним етапом було вивчення активації ФЛД в неокортексі 24-місячних щурів. Встановлено, що інкубація тканині неокортексу старих тварин в присутності інсуліна протягом 5 і 30 хв не супроводжується статистично значущими змінами у вмісті продукту – ФЕТ і субстрату – ФХ (Рис. 3.18). Інсулін не чинить стимулюючого впливу на активацію ФЛД в тканині неокортексу 24-місячних тварин.

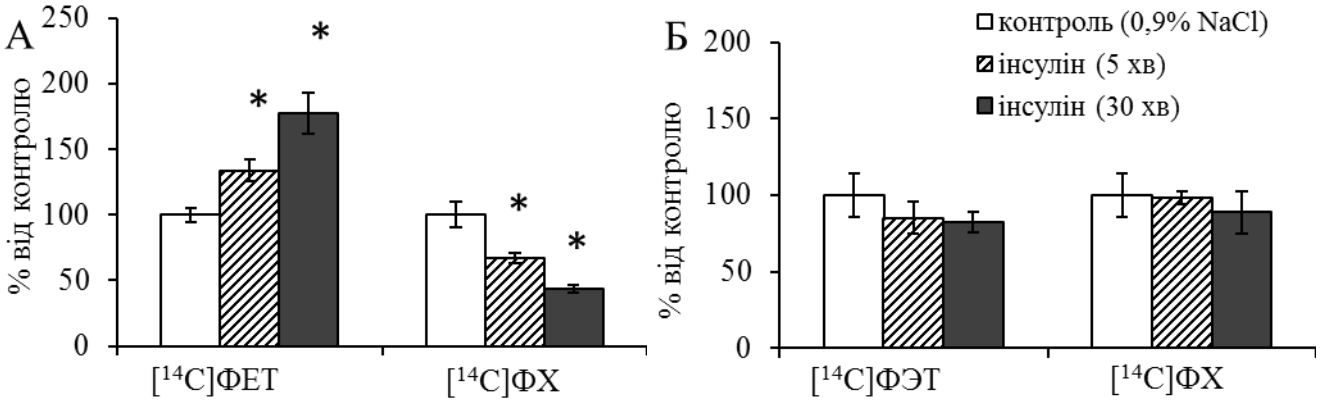

Рис. 3.18 Вплив інсуліна на активацію фосфоліпази Д у тканині неокортексу 3-місячних (А) і 24-місячних (Б) щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Вікові особливості регуляції інсуліном активності ФЛД в неокортексі подібні до тих змін, які виявлені в класичній мішені дії гормону – м'язовій тканині [254, 254]. Наші результати також узгоджуються з даними досліджень Salvadore і співавторів, проведених на синаптосомах кори головного мозку щурів 4- і 28-місячного віку [15]. Ці дослідники за допомогою міченого [^{14}C]ФХ показали, що внесення інсуліна в середовище інкубації синаптосом кори головного мозку щурів сприяє утворенню [^{14}C]ФЕТ у 4-місячних тварин, що свідчить про активацію ФЛД у молодих тварин. У той час як подібний ефект відсутній в синаптосомах старих 28-місячних тварин [15].

Таким чином, отримані у даній роботі результати свідчать про те, що в старості відбувається порушення активації ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна в клітинах печінки, м'язовій тканині (діафрагмі) і тканині неокортексу.

На наступному етапі цієї роботи з метою моделювання стану тканин-мішеней дії інсуліна за ліпідним складом близьке до старих тканин і визначення зміни в ФЛД-залежному сигналінгу інсуліна, вивчали вплив високожирової дієти на вміст гліцеросфінголіпідів і активацію інсуліном ФЛД.

ФЛД є важливим учасником процесів транспорту і метаболізму глюкози в тканинах-мішенях дії інсуліна [90, 202], а також бере участь в стимульованому гормоном формуванні ліпідних крапель в клітинах [256, 257]. Ліпідні краплі складаються з ядра, що містить нейтральні ліпіди, оточеного пов'язаними з білками фосфоліпідами [258, 259]. Надмірне накопичення триацилгліцеролів (ТАГ) в ліпідних краплях в клітинах печінки і м'язової тканини пов'язують з метаболічними захворюваннями, такими як інсулінорезистентність і діабет 2 типу [260, 261]. Крім того, численними дослідженнями останніх років показано, що порушення передавання сигнала інсуліна з віком і подальший розвиток інсулінорезистентності, що відбувається в умовах порушення метаболізму ліпідів, пов'язане також з накопиченням токсичних продуктів обміну ліпідів, таких як вільні жирні кислоти (ЖК), церамід і діацилгліцерол (ДАГ) [177]. Показано, що довголанцюгові насичені вільні ЖК індукують синтез *de novo* і накопичення цераміду і ДАГ в м'язовій тканині і печінці щурів, хворих на діабет [167]. Крім того, дослідженнями, проведеними раніше, було показано підвищення вмісту ДАГ [22] і церамідів [21] в клітинах печінки, а також мозку щурів [20] в старості. Ці біологічно активні ліпіди можуть пригнічувати цілий ряд молекул, що беруть участь у передаванні сигнала інсуліна в клітинах, в тому числі і ФЛД.

Тому, беручи до уваги важливу роль зміни складу і співвідношення ліпідів при розвитку різних патологій і в процесі старіння, а також те, що подібні зміни супроводжуються порушенням активації центральних компонентів сигнального шляху інсуліна, актуальним є вивчення експериментально індукованих змін ліпідного складу клітин- і тканин-мішеней дії інсуліна і впливу модельних змін ліпідного складу на активацію ФЛД під дією гормону. Наступним етапом цього дослідження стало вивчення впливу високожирової дієти на вміст гліцеро- і сфінголіпідів та інсулін-залежну активацію ФЛД в клітинах печінки, діафрагми, і неокортексі молодих статевозрілих 3-місячних щурів лінії Вістар (Рис. 3.19).

На даному етапі дослідницької роботи було встановлено, що високий вміст насичених ЖК в раціоні молодих щурів призвів до підвищення в клітинах печінки

молодих тварин вмісту [^{14}C]ДАГ на 25 %, [^{14}C]ТАГ на 11 %, [^{14}C]ВЖК на 24 % і [^{14}C]цераміду на 35 %. Крім того, в печінці спостерігається зниження вмісту міченого [^{14}C]СФМ на 20 %. (Рис. 3.19).

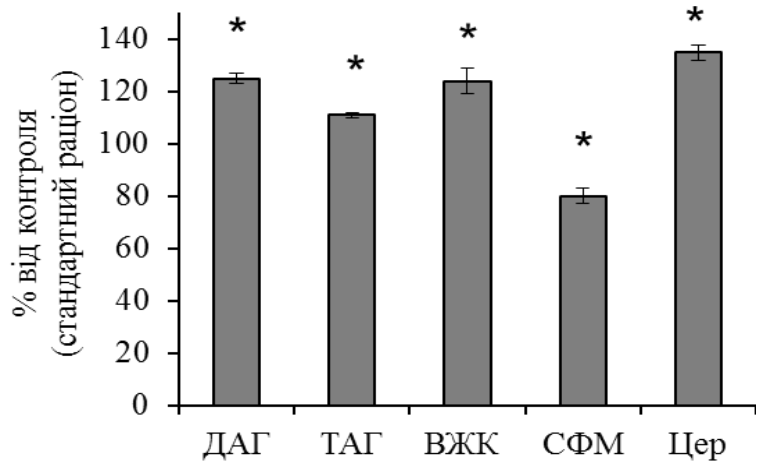

Рис. 3.19 Вміст нейтральних ліпідів (диацилгліцерола, триацилгліцеролів, вільних жирних кислот) і сфінголіпідів (сфінгомієліна і цераміду) в печінці 3-місячних щурів в умовах дієти з високим вмістом насичених жирних кислот

Примітка. * – статистично значимо порівняно з 3-місячними щурами, яких утримували на стандартному раціоні, p <0,05

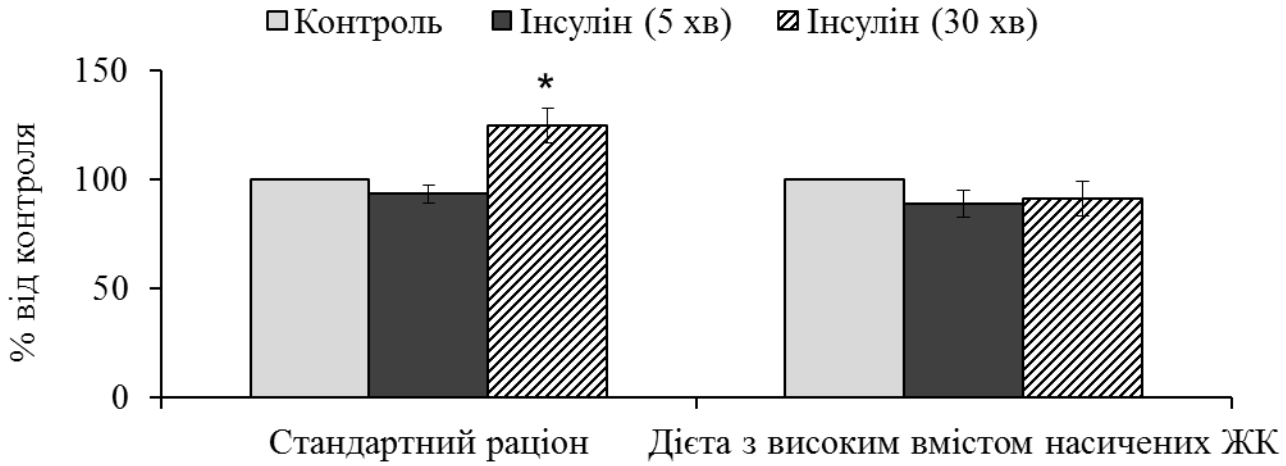

Рис. 3.20 Вплив інсуліна на активацію фосфоліпази Д в печінці 3-місячних щурів, яких утримували на дієті з високим вмістом насичених жирних кислот

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, p<0,05

Підвищення вмісту зазначених ліпідів в клітинах печінки молодих тварин в умовах високожирової дієти супроводжується порушенням активації інсуліном

ФЛД у відповідь на короткочасний вплив інсуліна (Рис. 3.20). Це проявляється у відсутності підвищення вмісту міченого ФЕТ в печінці тварин (Рис. 3.20), утримувалися на високожирової дієті.

В умовах висококалорійного раціону, печінку та інші тканині запасають надлишок енергії у вигляді ТАГ. Запасання надлишку енергетичних субстратів в такій формі захищає клітини від накопичення цитотоксичних ЖК, таких як пальмітинова кислота. У той же час, інсулінорезистентність печінки асоційована з надлишковим накопиченням ТАГ і метаболітів ЖК (жирнокислотних ацил-СоА, ДАГ, цераміду).

Короткочасний захист, який досягається шляхом депонування ЖК, може призводити до довгострокових ускладнень з подальшим розвитком інсулінорезистентності, яка призводить до діабету 2 типу та порушення функцій печінки [261, 262, 263]. Припускають, що інсуліноразістентность може виникати в результаті ослаблення фосфорилювання тирозину рецептора інсуліна і порушення фосфорилювання залишків серину IRS-1, а також учасників сигнального шляху інсуліна, що діють нижче. Так, ДАГ є активатором ПКС, яка може фосфорилювати IRS-1 по залишку серину 307, тим самим пригнічуючи її і знижуючи активацію наступного ефектора – ФІ3-кінази [264, 265]. Також, дієта з високим вмістом насичених ЖК викликає посилення експресії процерамідних генів, перекисного окиснення [266], індукує системний запальний процес [267]. Підвищення продукції TNF-α макрофагами супроводжується активацією NF-κB в гепатоцитах, підвищенням вмісту церамідів, посиленням СФМазной активності [265, 268] і периферичною інсулінорезистентністю і інсулінорезистентністю печінки [269, 270]. Показано, що інгібування синтеза сфінголіпідів в умовах великого вмісту насичених ЖК в дієті скасовує індуковану церамідами інсулінорезистентність [271, 272]. Особливий інтерес представляє церамід, який є інгібітором важливого учасника сигнального шляху інсуліна – ФЛД [182]. В умовах даної дослідницької роботи на тлі підвищення вмісту міченого цераміду відбувається порушення активації ФЛД інсуліном, що може бути обумовлено пригніченням ферменту церамідом.

На наступному етапі дослідження було вивчено вплив дієти на ліпідний спектр тканин і індуковану інсуліном активацію ФЛД в інший класичної мішені інсуліна – діафрагмі.

Встановлено, що дієта з високим вмістом насичених жирних кислот підсилює в тканині діафрагми молодих 3-місячних щурів утворення мічених [^{14}C]пальмітиновою кислотою ліпідів. Це проявляється підвищенням вмісту [^{14}C]ДАГ на 34 %, [^{14}C]ТАГ на 210 %, [^{14}C]ВЖК на 123 % і [^{14}C]цераміду на 41 %, а також зниження [^{14}C]СФМ на 18 % (Рис. 3.21).

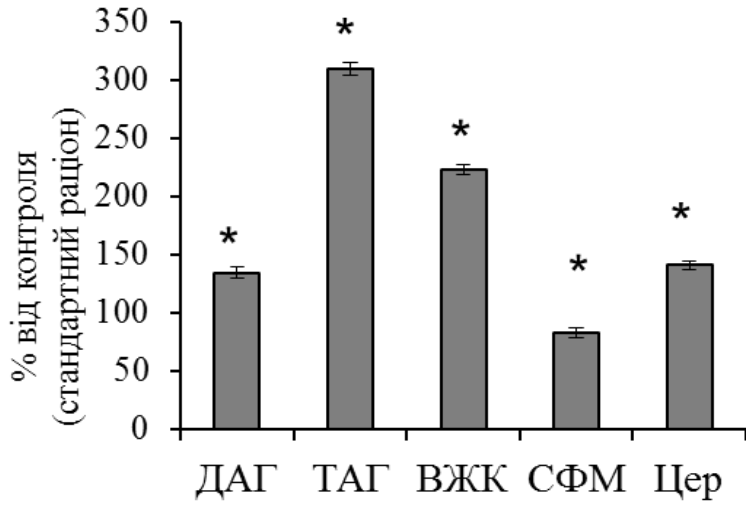

Рис. 3.21 Вміст нейтральних ліпідів (диацилгліцерола, триацилгліцеролів, вільних жирних кислот) і сфінголіпідів (сфінгомієліна і цераміда) в діафрагмі 3-місячних щурів в умовах дієти з високим вмістом насичених жирних кислот

Примітка. * – статистично значимо порівняно з 3-місячними щурами, яких утримували на стандартному раціоні, $p < 0,05$

Крім того, дані зміни ліпідного складу тканини діафрагми супроводжуються відсутністю утворення [^{14}C]ФЕТ під дією інсулін-стимульованої ФЛД у вивчені проміжки часу (Рис. 3.22).

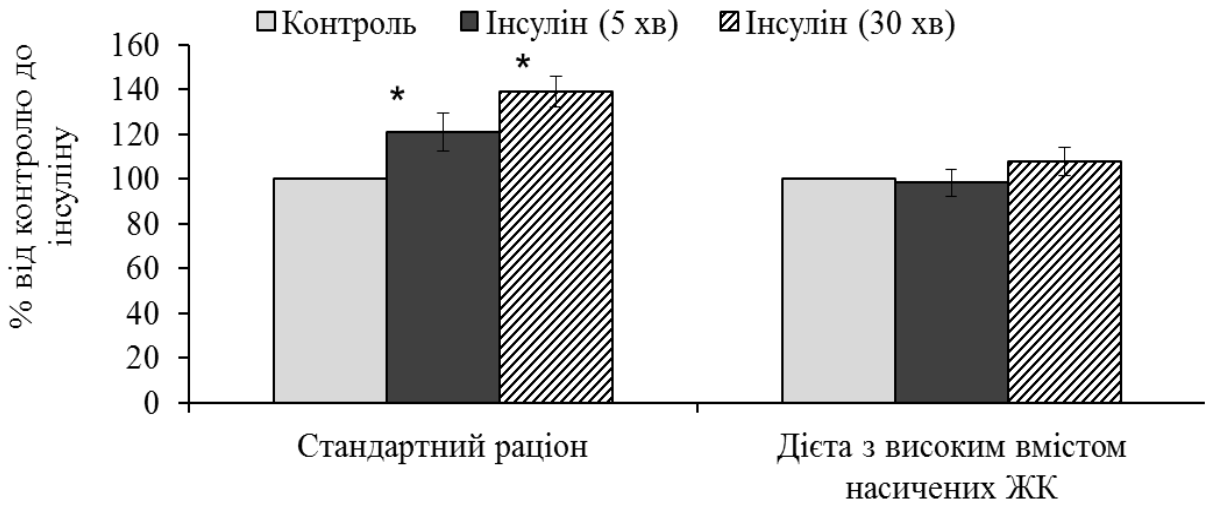

Рис. 3.22 Вплив інсуліна на активацію фосфоліпази Д в діафрагмі 3-місячних щурів, яких утримували на дієті з високим вмістом насичених жирних кислот

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, $p < 0,05$

Показано, що пальмітинова кислота є основною насиченою кислотою яловичого жиру [190] і попередником синтеза як гліцероліпідів, так і сфінголіпідів *de novo*. Жирні кислоти активуються в результаті взаємодії з коферментом-А і подальшим утворенням ацил-СоА. Два ацил-СоА взаємодіють з гліцерин-3-фосфатом, в результаті утворюється ФК, яка є попередником ДАГ, ТАГ і фосфоліпідів. Синтез сфінголіпідів здійснюється з активованої пальмітинової кислоти – пальмітоїл-СоА і серину з подальшим утворенням 3-кетосфінганіна, сфінганіна, сфінгозина і цераміду. Метаболічні шляхи синтеза сфінголіпідів, гліцерофосфоліпідів і ТАГ пов'язані між собою через СФМ-синтазу яка, з цераміду і ФХ, утворює СФМ і ДАГ. Як було розглянуто раніше, підвищення вмісту ТАГ в нежирових тканинах на фоні підвищення вмісту вільних ЖК може бути пов'язано з посиленням включення вільних ЖК в ТАГ і захистом клітин від ліпотоксічного впливу ЖК [49]. Зниження вмісту міченого СФМ може бути пов'язано з активацією СФМаз [268].

Групою дослідників Malaisse на щурах лінії Гото-Какізакі, що володіють генетичною схильністю до розвитку діабету, було показано, що в мозку цих тварин вміст нейтральних ліпідів в 7-8 разів вище, ніж у нормальних щурів [272]. Роботами

de la Monte [167, 172] показано, що в умовах висококалорійної дієти у щурів відбувається розвиток інсулінорезистентності печінки та периферичної інсулінорезистентності. Розвиток резистентності супроводжується посиленням експресії генів синтеза церамідів в печінці, підвищенням СФМазной активності, що проявляється в зниженні рівня СФМ, перекисному окисленню ліпідів, а також збільшенням вмісту церамідів в сироватці крові. Крім того, ці ж дослідники припускають, що цераміди, синтезовані в печінці, можуть викликати інсулінорезистентність мозку і розвиток нейродегенеративних змін при діабеті 2 типу [273].

Встановлено, що в діафрагмі і печінці 3-місячних щурів, яких утримували на дієті з високим вмістом насичених ЖК на тлі підвищення вмісту ТАГ, ДАГ, ВЖК і цераміду не відбувається накопичення [^{14}C]ФЕТ, специфічного маркера активації ФЛД під дією інсуліна, і не зазначено зниження вмісту субстрату ФЛД – [^{14}C]ФХ. Що може свідчити про порушення передачі сигнала інсуліна в умовах високожирової дієти. З огляду на те, що периферична інсулінорезистентність і інсулінорезистентність печінки корелює з інсулінорезистентністю мозку [167, 172, 273], наступним етапом дослідження стало вивчення змін ліпідного спектра тканини неокортексу в умовах високожирового раціону, а також вивчення відповіді тканини мозку на короткочасний вплив інсуліна.

У неокортексі молодих тварин, яких утримували на дієті з високим вмістом насичених жирів, інсулін не викликав статистично значущих змін у вмісті [^{14}C]ФЕТ при короткочасній стимуляції інсуліном тканині неокортексу (Рис. 3.23).

Це свідчить про порушення активації інсуліном ФЛД і отримані дані узгоджуються з підвищенням в тканині неокортексі вмісту ТАГ – на 47,3 %, ДАГ – на 30,6 %, ВЖК – на 49 % і цераміда – на 30 %, відповідно (Рис. 3.24).

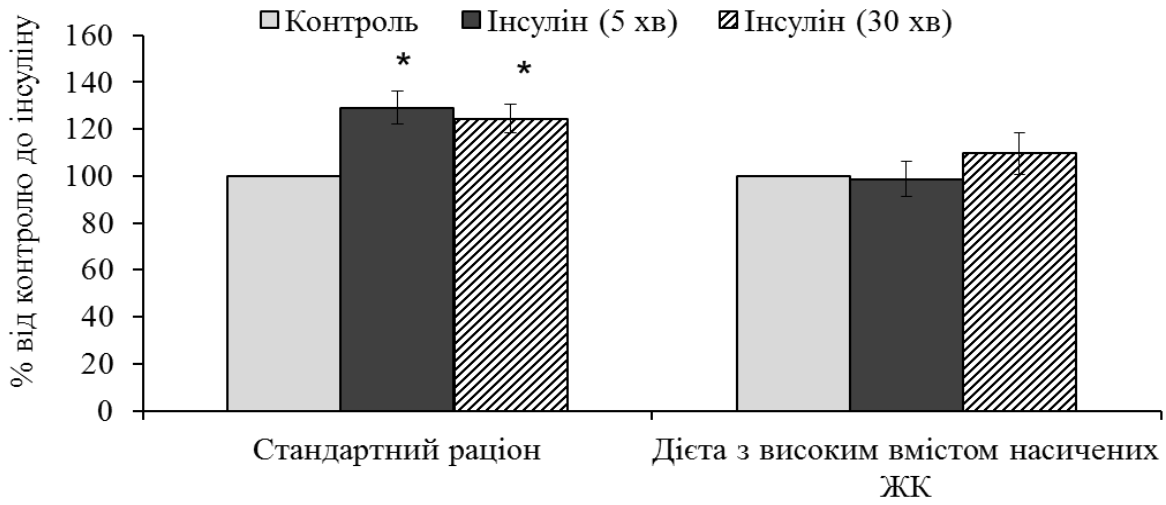

Рис. 3.23 Активація фосфоліпази Д інсуліном в неокортексі 3-місячних щурів в умовах дієти з високим вмістом насичених жирних кислот

Примітка. * – статистично значимо порівняно з 3-місячними щурами, яких утримували на стандартному раціоні, $p < 0,05$

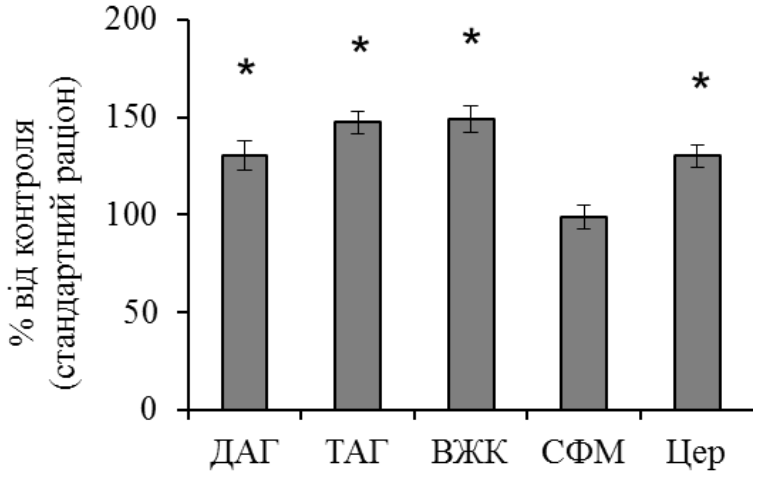

Рис. 3.24 Вміст нейтральних ліпідів та сфінголіпідів в неокортексі 3-місячних щурів, яких утримували на нормальному раціоні і дієті з високим вмістом насичених жирних кислот, % від контролю до інсуліна (0,9 % NaCl)

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$

Таким чином, на даному етапі дослідження встановлено, що в класичних і некласичних тканинах-мішенях дії інсуліна таких як, діафрагма, печінка і неокортекс 3-місячних щурів дієта з високим вмістом насичених ЖК індукує синтез

вільних ЖК і їх похідних ДАГ, ТАГ і цераміду [274]. Подібні зміни можуть бути пов'язані з надмірним надходженням насичених ЖК в організм і індукцією їх утилізації шляхом утворення гліцеро- і сфінголіпідів. Крім того, на тлі підвищення утворення досліджених ліпідів у молодих щурів відзначається відсутність активації ФЛД під дією інсуліна в умовах високожирової дієти, про що свідчить відсутність накопичення специфічного маркера активації ФЛД – ФЕТ при стимуляції інсуліном.

3. 2. 2 Вплив екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміда на накопичення цераміда і інсулін-залежну активацію фосфоліпази Д в клітинах- і тканинах-мішенях

Вікове підвищення продукції і накопичення цераміду може бути змодельоване в різних типах клітин за допомогою збільшення вмісту в середовищі інкубації попередника сфінголіпідів – пальмітинової кислоти. Так, внесення підвищеної концентрації насичених ЖК в дієту мишей статистично значимо збільшує вміст цераміду в печінці і камбаловидному м'язі, тоді як міріоцин, інгібітор активності СПТ1, введений тваринам в формі ін'єкцій, блокує продукцію цераміду в тканинах [275, 276]. Додавання пальмітинової кислоти в середовище інкубації гепатоцитів індукує значне накопичення цераміду в клітинах [277, 278]. Індукованому пальмітиновою кислотою накопиченню цераміду в клітинах печінки і астроцитах запобігає попереднє культивування клітин в присутності інгібіторів СПТ1 (L-циклосерина) або церамідсинтази (фумонізина В1), відповідно, але не інгібітору кислої СФМази [279].

Відомо, що насичені ЖК відіграють важливу роль у розвитку патологій, які супроводжують процесу старіння, таких як діабет 2 типу, ішемічна хвороба серця, нейродегенеративні патології [280-284]. Підвищена концентрація пальмітинової кислоти є токсичною для мітохондрій і ендоплазматичного ретикулуму і може індукувати апоптоз без участі активних форм кисню [283]. Це було показано на морфо-функціонально різних типах клітин, включаючи кардіоміоцити [280, 281], β-клітини підшлункової залози [282], гематопоетичні клітини [283] і астроцити [285].

Відносно невеликі коливання концентрації пальмітинової кислоти призводять до драматичних наслідків. Наприклад, інкубація лінії клітин BRIN-BD11 в присутності зростаючих концентрацій пальмітата (0.1-0.5 мМ) призводить до дозозалежного зниження життєздатності клітин [282]. Також показано, що метаболіти пальмітинової кислоти, що утворюються циклооксигеназою, ліпоксигеназою і цитохромом Р450 беруть участь в індукції апоптозу клітин [283].

Пальмітинова кислота в чистому вигляді є безпосереднім попередником синтеза цераміду. Показано, що ця ЖК залучена в синтез гліцерофосфоліпідів тільки в умовах її поєднаної дії з іншими насиченими або мононенасиченими ЖК (наприклад, олеїновою і пальмітолеїновою), якщо ж в середовищі інкубації клітин присутня тільки пальмітинова кислота, то перевага віддається її включенню в ендогенні цераміди [284, 285]. Інша речовина, що є зручним інструментом при моделюванні підвищеного вмісту ендогенних церамідів, це С2-церамід. Він є речовиною, що легко проникає всередину клітин та викликає підвищення вмісту ендогенних церамідів і використовується для моделювання стану резистентності і прискореного старіння клітин [286-293].

Важливим є те, що при старінні, а також в умовах дієти з високим вмістом насичених ЖК, а саме пальмітинової кислоти, відбувається зміна ліпідного спектра клітин і тканин-мішеней дії інсуліна [20]. Зокрема, відбувається підвищення вмісту вільних ЖК, ДАГ і цераміду, які призводять до резистентності клітин до дії гормону. Це супроводжується порушенням утворення ФЕТ (специфічного маркера активації ФЛД) при короткотерміновій стимуляції клітин інсуліном. Оскільки церамід в даний час визнаний основним «винуватцем» розвитку інсулінорезистентності клітин, крім того, він може викликати прискорене старіння клітин [162] і є інгібітором ключових молекул сигнального шляху інсуліна (Akt/ПКВ, ФІ3-кінази), а також з огляду на дані попереднього етапу дослідження, наступним етапом цієї роботи стало моделювання резистентності ФЛД до дії інсуліна за допомогою зміни ліпідного спектра клітин в умовах *in vitro* за

допомогою екзогенних попередників синтеза гліцеросфінголіпідів – пальмітинової кислоти і С2-цераміду.

Встановлено, що інкубація шматочків тканини діафрагми за наявності екзогенної пальмітинової кислоти призвела до підвищення вмісту [^{14}С]ДАГ на 118 %, [^{14}С]ТАГ – на 32 %, [^{14}С]цераміду – на 77 % і зниження вмісту [^{14}С]СФМ на 16 % (Рис. 3.2.10), порівнянно з контрольними зразками.

У той же час встановлено, що інкубація шматочків тканини діафрагми 3-місячних інтактних щурів з екзогенним С2-церамідом викликала підвищення вмісту [^{14}С]ДАГ на 36 % і [^{14}С]цераміду – на 74 % і зниження вмісту [^{14}С]СФМ (Рис. 3.25) на 34 %, в порівнянні з контролем.

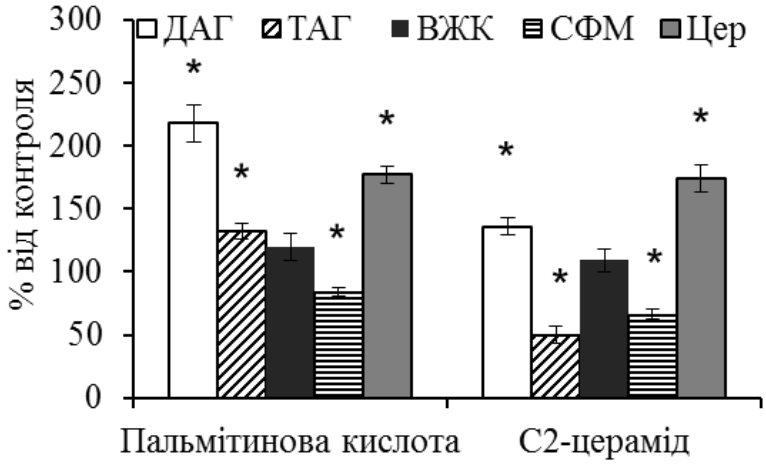

Рис. 3.25 Вміст нейтральних ліпідів і сфінголіпідів в діафрагмі 3-місячних щурів в умовах інкубації діафрагми інтактних молодих тварин з пальмітиновою кислотою і С2-церамідом

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю (етанол: додекан), $p < 0,05$

Синтез цераміду *de novo* починається з реакції конденсації пальмітоїл-СоА і серину, в результаті чого утворюється 3-кетосфінганін, який за допомогою декількох послідовних реакцій перетворюється в церамід. На культурі фібробластів показано, що коротколанцюгові екзогенні С2-, С6-цераміди збільшують в клітинах вміст знову синтезованих церамідів за допомогою активації ключового ферменту синтеза цераміду – СПТ [287, 289]. Однак, збільшення вмісту міченого цераміду в тканині діафрагми, яку інкубували в присутності коротколанцюгового С2-цераміду і

пальмітинової кислоти супроводжується зниженням вмісту міченого СФМ. Відомо, що церамід крім шляху синтеза *de novo* може утворюватися шляхом гідролізу СФМ сфінгомієліназами. Можна припустити, що в даних умовах експерименту зниження вмісту СФМ на тлі підвищення вмісту цераміду може бути пов'язано з активацією СФМаз. Надлишковий вміст ендогенних церамідів в клітинах-мішенях інсуліна може призводити до порушення чутливості клітин до дії гормонального стимулу, крім того церамід є інгібітором ФЛД.

На наступному етапі дослідження було встановлено, що при дії інсуліна на тканину діафрагми, яку попередньо інкубували в присутності пальмітинової кислоти відбувается зниження вмісту [^{14}C]ФХ на 25 %, однак, підвищення вмісту [^{14}C]ФЕТ в цих умовах експерименту не спостерігалося (Рис. 3.26).

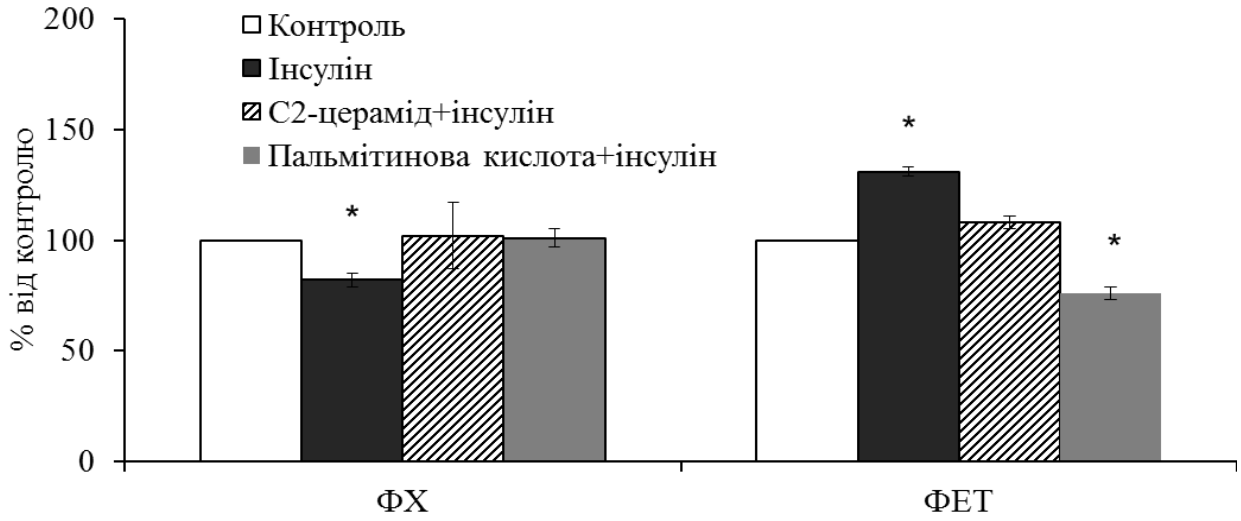

Рис. 3.26 Вплив С2-цераміду і пальмітинової кислоти на індуковані короткочасною дією інсуліна зміни вмісту [^{14}C]ФЕТ і [^{14}C]ФХ в тканині діафрагми 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Показано, що додавання екзогенного цераміду в культуральне середовище клітин, мічених [^{14}C]ацетатом або [^{14}C]пальмітат або [^{3}H]H_2O, істотно знижує вміст знову синтезованого [^{14}C]ФХ [287]. Можна припустити, що в даних умовах

експерименту відбувалося пригнічення синтеза ФХ церамідом, вміст якого збільшувався в діафрагмі в умовах попередньої інкубації з пальмітиновою кислотою. Крім того, в тканині діафрагми, після впливу на неї екзогенного С2-цераміду, інсулін не викликає підвищення вмісту [^{14}C]ФЕТ і зниження рівня [^{14}C]ФХ, що свідчить про пригнічення активності ФЛД.

Індукція церамідом резистентності клітин до дії інсуліна характерна для класичних тканин-мішеней дії гормону, а саме, для скелетних м'язів, жирової тканини і печінки [154]. Збільшення під дією насичених жирних кислот харчового раціону продукції ендогенного цераміду є однією з причин виникнення резистентності клітин до дії інсуліна і розвитку діабету 2 типу [268, 272]. Встановлено, що церамід може блокувати сигналінг інсуліна в чутливих до дії гормону клітинах, пригнічуючи Akt/ПКВ шляхом індукції дефосфорилювання протеїнкінази і блокуючи її транслокацію в плазматичну мембрану, таким чином, пригнічуючи синтез глікогена. У той же час важливою мішенню цераміду в клітинах є ФЛД, яка є позитивним модулятором транспорту глюкози в стимульованих під дією інсуліна клітинах [202, 288]. Раніше проведені дослідження показали, що церамід є інгібітором ФЛД [182, 289]. Встановлено, що при старінні фібробластів в культурі відбувається накопичення церамідів і зниження активності ФЛД [182]. Автори приходять до висновку, що накопичення церамідів в старих клітинах є важливою причиною пригнічення ФЛД.

Моделювання стану порушення чутливості до дії гормональногостимулу клітин печінки при культивуванні гепатоцитів молодих щурів в присутності підвищеної концентрації пальмітинової кислоти або екзогенного С2-цераміду показало, що інкубація гепатоцитів 3-місячних щурів в присутності С2-цераміду або пальмітинової кислоти призводить до підвищення вмісту в клітинах печінки ендогенних церамідів (Рис. 3.27). Слід зазначити, що вміст цераміду в клітинах, які інкубували в присутності пальмітинової кислоти і С2-цераміду, практично однаковий.

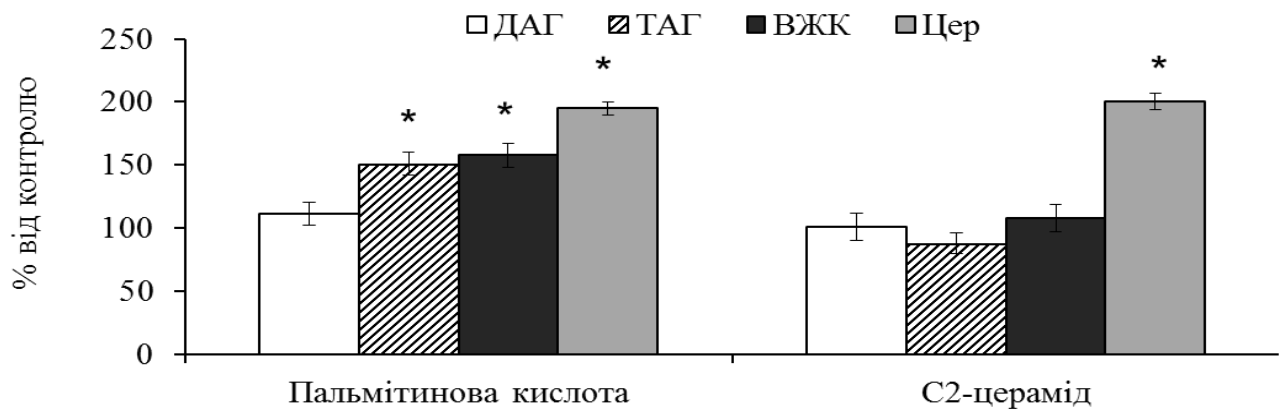

Рис. 3.27 Вміст нейтральних ліпідів і сфінголіпідів в клітинах печінки 3-місячних щурів в умовах інкубації з пальмітиновою кислотою і С2-церамідом

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю (етанол: додекан, 49: 1 за об'ємом), $p \leq 0,05$

Екзогенні пальмітинова кислота і С2-церамід пригнічують індукцію інсуліном утворення [^{14}C]ФЕТ (Рис. 3.28), що свідчить про пригнічення стимуляції гормоном ФЛД в даних умовах експерименту.

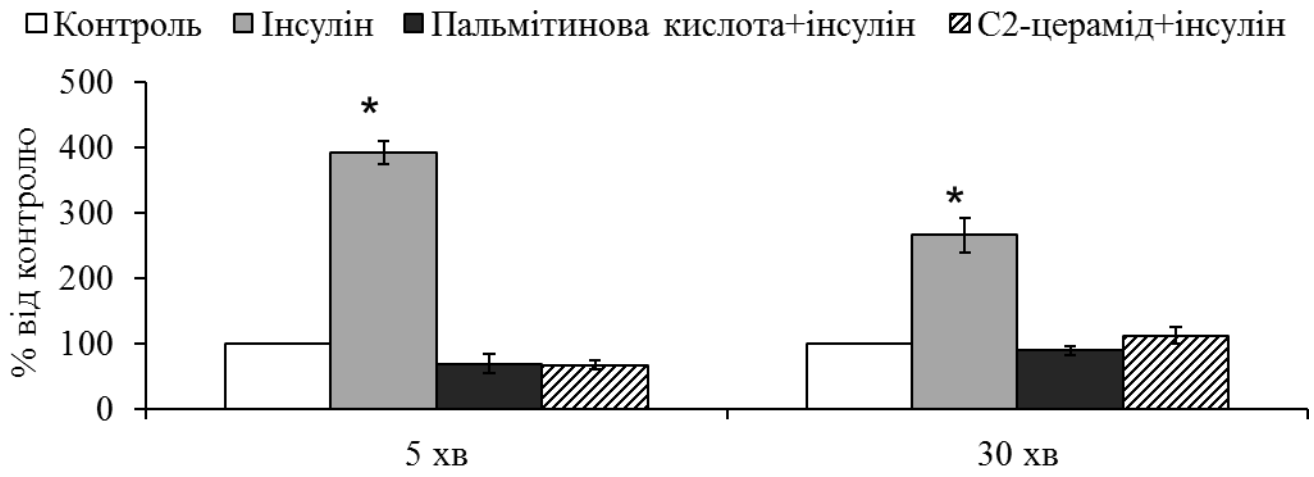

Рис. 3.28. Вплив С2-цераміду і пальмітинової кислоти на індуковані короткотривалою дією інсуліна зміни активації фосфоліпази Д в клітинах печінки 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо по відношенню до контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

У старості відбувається збільшення в клітинах печінки як попередників синтеза сфінголіпідів – вільних ЖК, так і церамідів. Різко знижується здатність ізольованих гепатоцитів старих тварин адекватно відповідати на дію інсуліна в порівнянні з клітинами молодих щурів. В гепатоцитах старих тварин інсулін практично не впливає на ФЛД-залежну ланку сигналінгу гормону на тлі значного накопичення ендогенного інгібітору ферменту – цераміду. Підвищення в клітинах рівня ендогенних церамідів в присутності С2-цераміду може відбуватися в результаті активації процесу деацилювання–реацилювання [287, 290, 291]. У той же час на культурі фібробластів встановлено, що як С2-церамід, так і С6-церамід збільшують в клітинах вміст знову синтезованих церамідів за допомогою активації ключового ферменту синтеза сфінголіпідів – СПТ [287].

Отримані дані свідчать про розвиток резистентності гепатоцитів молодих щурів до дії інсуліна в умовах внесення в середовище інкубації клітин печінки екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміду.

Для з'ясування ролі церамідів в віковому порушення активації інсуліном ФЛД в неокортексі щурів в даній роботі вивчали зміни утворення ФЕТ – продукту специфічної реакції, яка каталізується ФЛД – в неокортексі 3-місячних щурів в умовах підвищеного під дією пальмітинової кислоти або С2-цераміду вмісту ендогенних церамідів (Рис. 3.29).

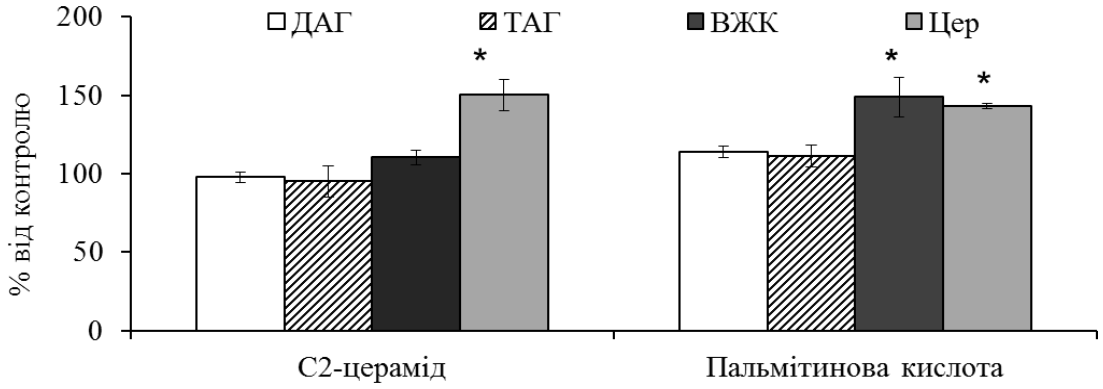

Рис. 3.29 Вміст нейтральних ліпідів і сфінголіпідів в неокортексі 3-місячних щурів в умовах інкубації тканині з пальмітинової кислотою і С2-церамідом

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з контролем (етанол: додекан, 49: 1, за об'ємом), $p < 0,05$

Пальмітинова кислота є попередником синтеза сфінголіпідів в різних тканинах, і доступність субстратів є лімітуючим фактором цього процесу. Введення в культуральне середовище астрогліальних клітин пальмітинової кислоти посилює процес синтеза сфінголіпідів і цераміду *de novo* [292]. У нашій роботі інкубація тканини неокортексу в присутності пальмітинової кислоти призводить до підвищення вмісту і ВЖК, і цераміду (Рис. 3.2.14). Можна вважати, що збільшення в клітинах рівня попередника сфінголіпідів – пальмітинової кислоти – є важливою причиною підвищення вмісту церамідів в неокортексі.

Екзогенний коротколанцюговий С2-церамід часто використовується в дослідженнях процесів опосередковуваних цераміди як аналог, який легко проникає в клітини і моделює дію ендогенних церамідів. Показано, що коротколанцюгові С2- і С6-цераміди можуть утилізуватися в клітинах шляхом утворення сфінгозина і сфінганіна і їх використання в синтезі довголанцюгових ендогенних церамідів і більш складних сфінголіпідів [291]. У нашій роботі екзогенний С2-церамід ми використовували як інструмент, який призводить до підвищення вмісту ендогенних церамідів в тканині неокортексу молодих щурів подібне до рівня церамідів у старих тварин. Ці дані узгоджуються з результатами, отриманими нами на гепатоцитах і діафрагмі молодих щурів при модуляції у них вмісту СФМ і цераміду за допомогою попередників.

В даний час вважають, що церамід може безпосередньо впливати на ФЛД, пригнічуючи даний фермент. Церамід може конкурувати з кофакторами ФЛД за зв'язування з каталітичним ядром ферменту і пригнічувати активацію ФЛД ФК і лізоФК [26]. Він також частково блокує транслокацію активаторів ФЛД білка ARF і ПКС [25]. Церамід може пригнічувати транскрипцію ФЛД [182]. Крім того, його дія може бути опосередкованим. Накопичення церамідів в ліпідних рафтах мембран може призводити до порушення фізичних властивостей цих структур і пригнічення сигнальних молекул пов'язаних з ними, в тому числі і ФЛД [24].

Встановлено, що в умовах інкубації неокортексу 3-місячних щурів за наявності пальмітинової кислоти або С2-цераміду відбувається пригнічення

утворення ФЕТ у відповідь на короткочасну стимуляцію тканині неокортексу інсуліном (Рис. 3.30).

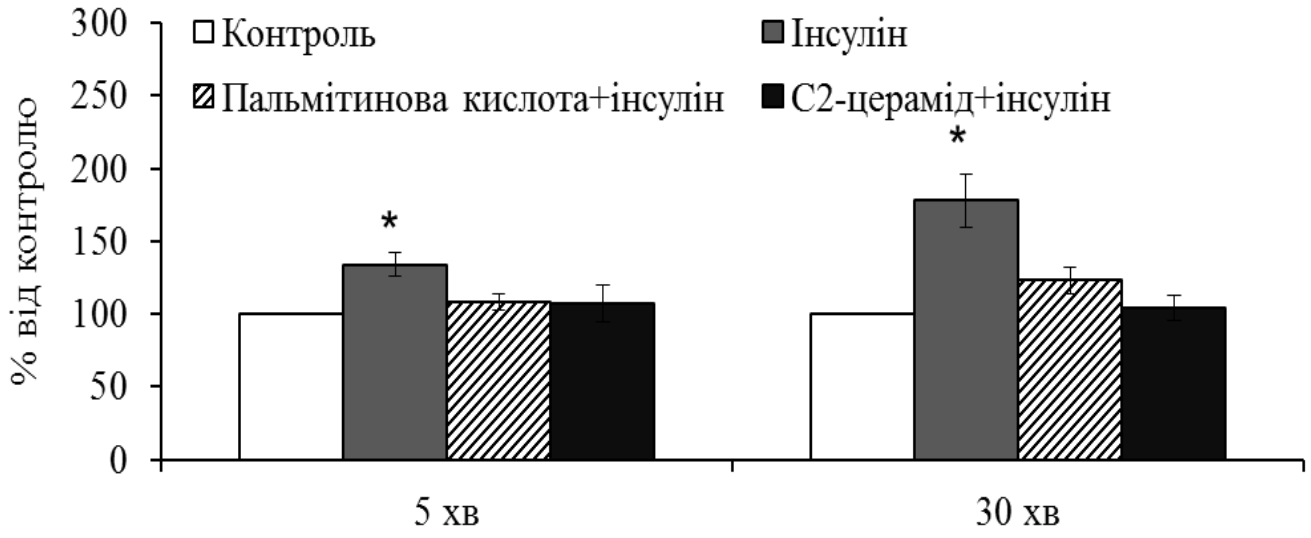

Рис. 3.30 Вплив пальмітинової кислоти і екзогенного С2-цераміду на активацію фосфоліпази Д в неокортексі 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$

Відомо, що ФЛД в клітинах локалізується як у внутрішніх компартментах клітини, таких як апарат Гольджі і ендоплазматичний ретикулум, так і в ліпідних рафтах плазматичної мембрани [49]. При стимуляції агоністами ФЛД, завдяки своєму PH-домену, може вбудовуватися у рафти плазматичної мембрани [54]. Рафти представляють собою мембранні домени збагачені холестеролом і сфінголіпідами. Дані структури є платформою, що забезпечує білок-ліпідні і білок-білкові взаємодії необхідні для процесів сигнальної трансдукції [292]. При старінні, а також при нейродегенеративних захворюваннях відбувається зміна ліпідного спектра мембран, в тому числі і рафтів. Так, Han і співавторами було показано [173], що при хворобі Альцгеймера в мозку знижується вміст СФМ і збільшується вміст цераміду, що може призводити до змін в структурі ліпідних рафтів і, як наслідок, порушенню функціонування пов'язаних з ними молекул.

Враховуючи ці дані та результати даної роботи, можна припустити, що накопичення знову синтезованого цераміду в неокортексі під впливом екзогенних попередників (пальмітинової кислоти і С2-цераміда) у молодых щурів є важливаою причиною розвитку стану резистентності тканин до дії інсуліна.

Таким чином, встановлено, що в тканині діафрагми, клітинах печінки і неокортексі молодих тварин інсулін активує ФЛД. У старості відбувається різке зниження чутливості тканини неокортексу до дії гормону. Велике значення в розвитку вікової резистентності тканин-мішеней інсуліна до дії гормону відіграє зміна ліпідного спектра мембран клітин, зокрема, підвищення вмісту церамідів, яке спостерігається при старінні. Церамід, будучи інгібітором ключових учасників сигнальних шляхів інсуліна, таких як Akt/ПКВ, ARF, ПКС і ФЛД, може призводити до порушення функціонування сигнального каскаду і формування фізіологічної відповіді. При моделюванні стану резистентності до дії інсуліна за допомогою екзогенних С2-цераміду і пальмітинової кислоти відбувається зміна ліпідного спектра тканин-мішеней інсуліна. У діафрагмі під дією С2-цераміду і пальмітинової кислоти відбувається підвищення вмісту цераміду. У клітинах печінки екзогенний С2-церамід підвищує вміст ендогенних церамідів, водночас пальмітинова кислота збільшує вміст цераміду. У неокортексі молодих тварин, при інкубації з С2-церамідом підвищується вміст цераміду, а пальмітинова кислота збільшує вміст вільних ЖК і цераміду. Зміни вмісту сфінголіпідів супроводжується скасуванням утворення ФЕТ при короткочасному впливі інсуліна у всіх вивчених тканинах- і клітинах-мішенях гормону. З огляду на те, що ФЛД відіграє важливу роль у функціонуванні сигнального каскаду інсуліна у всіх вивчених тканинах і є мішенню дії церамідів можна припустити, що індуковане сфінголіпідами пригнічення ФЛД-залежного сигналінгу інсуліна може бути важливою причиною порушення функціонування м'язової, нервової тканини і печінки в старості і передувати розвитку різних патологій.

3. 2. 3 Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміду і інгібіторів обміну сфінголіпідів на стимуляцію інсуліном ФЛД в клітинах- і тканинах-мішенях

У попередніх розділах цього дослідження було показано, що накопичення ендогенних церамідів в різних тканинах і клітинах-мішенях дії інсуліна є характерною рисою старіння і супроводжується розвитком стану резистентності ФЛД-залежного ланки сигнального каскаду інсуліна до дії гормонального стимулу. Однак важливим є з'ясування особливостей механізмів і шляхів утворення ендогенних церамідів в клітинах молодих і старих щурів. Для того, щоб змоделювати підвищений вміст церамідів, подібний до того, який виникає в старості, в умовах *in vitro* в якості моделі були обрані гепатоцити 3-місячних щурів, які піддавалися впливу різних індукторів утворення цераміду. Так, в середовище інкубації клітин печінки молодих статевозрілих тварин вносили попередника синтеза ендогенних сфінголіпідів – пальмітинову кислоту, а також екзогенні С2-церамід. Пальмітинова кислота є попередником синтеза сфінголіпідів в різних тканинах, і доступність субстрату є лімітуючим фактором цього процесу. С2-церамід часто використовується в дослідженнях процесів опосередковуваних церамідом як аналог, який легко проникає в клітини і моделює дію ендогенних церамідів [287, 289, 293]. Показано, що коротколанцюгові С2- і С6-цераміди можуть утилізуватися в клітинах шляхом перетворення на сфінгозин/сфінганін і їх використання в синтезі довголанцюгових церамідів, а також більш складних сфінголіпідів [294].

У модельних експериментах показано, що пальмітинова кислота індукує в різних типах клітин (в гепатоцитах щурів [277], в клітинах скелетної мускулатури [179, 187] і астроцитах [295]) синтез сфінголіпідів *de novo*. Пригнічення утворення і накопичення цераміду в клітинах за допомогою різних інгібіторів синтеза і обміну сфінголіпідів (наприклад, міріоцина і фумонізина В1) запобігає загибель клітин і може відновлювати чутливість клітин до дії біологічно активних речовин [296].

Для того, щоб з'ясувати, чи є знову синтезовані цераміди причиною порушення ФЛД-залежного сигналінгу інсуліна, перед внесенням в середовище інкубації пальмітинової кислоти або С2-цераміду гепатоцити піддавали дії міріоцина. Міріоцин – антибіотик із грибів Mycelia sterilia, інгібітор серинпальмітоїлтрансферази, ковалентно зв’язуючи її активний центр призводить до деградації фермента [297].

Показано, що в гепатоцитах 3-місячних щурів, попередньо інкубірованних з міріоцином і пальмітинової кислотою (або С2-церамідом), вміст цераміду знижується в порівнянні з гепатоцитами, в середовище інкубації яких вносили тільки пальмітинову кислоту або С2-церамід (Рис. 3.31).

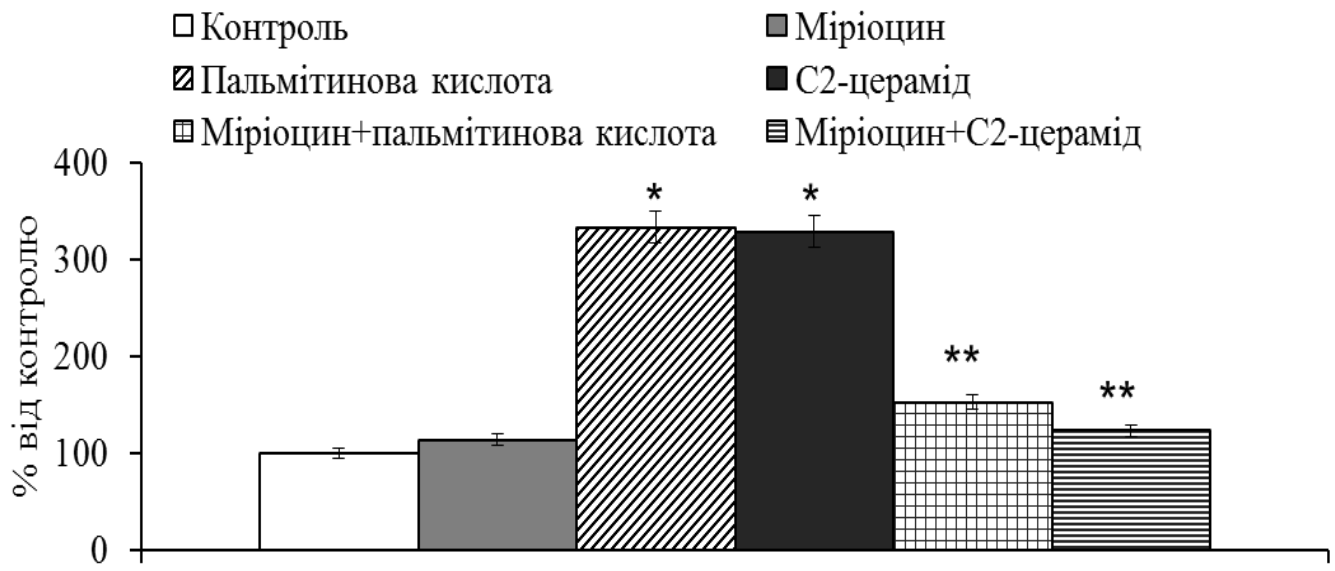

Рис. 3.31 Вплив С2-цераміду, пальмітинової кислоти і міріоцина на вміст ендогенного цераміду в клітинах печінки 3-місячних щурів

Примітка. *. – статистично значимо в порівнянні з контролем (етанол: додекан, 49: 1, за об'ємом)

Встановлено, що міріоцин вимикає ефект пальмітинової кислоти або С2-цераміду на активацію ФЛД інсуліном (Рис. 3.32).

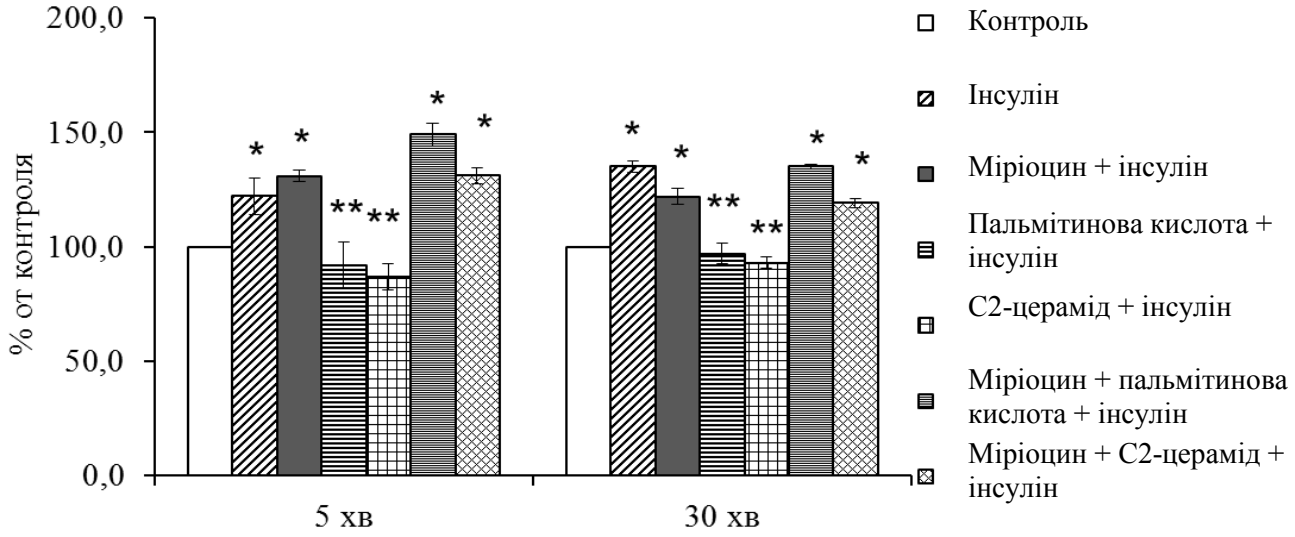

Рис. 3.32 Вплив С2-цераміду, пальмітинової кислоти і міріоцина на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$; ** – статистично значимо щодо інсуліна, $p<0,05$

Є дані про те, що основним джерелом цераміду в умовах розвитку інсулінорезистентності є шлях синтеза *de novo* [177]. Інгібування ключових ферментів біосинтетичного шляху утворення сфінголіпідів, СПТ, церамідсинтази і дигідроцераміддесатурази, підвищує чутливість клітин до інсуліна [177, 269, 297]. При інгібуванні синтеза цераміду *de novo* міріоцином на моделі інсулінорезистентності мишей, які страждають ожирінням, показано відновлення чутливості тканин мішеней до дії інсуліна [269, 297]. З огляду на дані літератури та результати, отримані в даній роботі, можна припустити, що за допомогою пригнічення синтеза цераміду в клітинах в умовах моделювання стану резистентності у молодих статевозрілих щурів лінії Вістар 3-місячного віку можна збільшувати їх чутливість до дії інсуліна.

Для підтвердження цього припущення, а також для з'ясування ролі ФЛД в сигналінгу інсуліна проведені експерименти на ізольованих гепатоцитах молодих тварин з індукованим станом резистентності клітин до дії гормону. Інкубація клітин печінки в присутності екзогенного С2-цераміду або попередника синтеза сфінголіпідів – пальмітинової кислоти – призводить до накопичення в гепатоцитах

ендогенних церамідів. Підвищення в клітинах рівня ендогенних церамідів в присутності С2-цераміду може відбуватися в результаті активації процесу деацилювання-реацилювання [289]. У той же час на культурі фібробластів встановлено, що як С2-церамід, так і С6-церамід збільшує в клітинах вміст знову синтезованих церамідів за допомогою активації ключового ферменту синтеза сфінголіпідів – СПТ [287]. Введення в середовище інкубації інгібітора СПТ – міріоцина – запобігає індукції коротколанцюговими церамідами накопичення ендогенних церамідів. Результати даної роботи також показують, що міріоцин нормалізує вміст ендогенних церамідів в гепатоцитах старих щурів і молодих гепатоцитах, культивованих за наявності С2-цераміду або пальмітинової кислоти, що свідчить про те, що активація синтеза цераміду *de novo* є важливою причиною його накопичення в клітинах печінки [298]. Ендогенні С2-церамід і пальмітинова кислота повністю пригнічують активуючу дію інсуліна на ФЛД. За рахунок своїх поверхнево активних властивостей пальмітинова кислота і С2-церамід можуть впливати на доступність субстрату ферменту і призводити до сорбції ФЛД на міцелах і зниженню ефективної концентрації ферменту в ділянках трансфосфатидилювання. Однак нормалізація рівня церамідів за допомогою інгібітору синтеза сфінголіпідів міріоцина повністю відновлює активуючу дію інсуліна на ФЛД в клітинах молодих щурів, що свідчить про те, що пальмітинова кислота і С2-церамід переважно діють на ФЛД в стимульованих гормоном клітинах, збільшуючи вміст ендогенних знову синтезованих церамідів . Отримані дані можуть свідчити про те, що знову синтезовані цераміди пригнічують ФЛД-залежну ланку сигналінгу інсуліна в гепатоцитах 3-місячних щурів і не впливають на інші шляхи сигнальної трансдукції інсуліна.

Ще одним етапом цього дослідження стало моделювання підвищеного вмісту цераміду за допомогою цитотоксичного препарату паклітакселу. Паклітаксел є алкалоїдом рослинного походження. Основний механізм його дії спрямований на стимуляцію збірки і пригнічення деполімеризації мікротрубочок в процесі мітозу, що викликає утворення аномальних скупчень мікротрубочок і перешкоджає поділу

клітин. Однак дія паклітакселу на клітини полягає не тільки в його дії на цитоскелет, але також і в індукції обміну сфінголіпідів. Низкою робіт на пухлинних клітинах показано, що паклітаксел в клітинах MDA-MB-468 і MCF-7 індукує утворення [^{3}H]цераміду з попередника [^{3}H]пальмітинової кислоти [299-302].

Крім того, є дані про дозозалежні ефекті паклітакселу на утворення цераміду. Так, групою Asakuma показано, що паклітаксел в концентрації 5 нМ індукує утворення цераміду шляхом активації кислої СФМази в SKRC-49 клітинах [301]. Високі концентрації паклітакселу (100 нМ) ініціюють в клітинах синтез цераміду *de novo* [301] шляхом активації СПТ [302]. Оскільки в старості підвищення вмісту церамідів може бути пов'язано з різними шляхами його утворення, а саме синтеза *de novo* або гідролізу СФМ сфінгомієліназами, то для моделювання вікових змін вмісту сфінголіпідів гепатоцити інкубували в присутності паклітакселу. Паклітаксел може індукувати як шлях синтеза цераміду, так і підвищувати в клітинах сфінгомієліназну активність [301]. Встановлено, що в результаті дії паклітакселу в клітинах печінки відбувається підвищення вмісту цераміду в 4,7 рази в порівнянні з контрольними клітинами (Рис. 3.33).

Для модулювання підвищеного під дією паклітакселу вмісту цераміду в гепатоцитах і з'ясування джерел підвищення сфінголіпідів, клітини печінки інкубували в присутності інгібітора синтеза сфінголіпідів міріоцина і інгібіторів сфінгомієліназ – іміпраміна і GW4869, а також в присутності суміші всіх інгібіторів. Іміпрамін – трициклічний антидепресант, що блокує поглинання адренергічних нейромедіаторів в ЦНС. Він викликає деградацію кислої сфінгомієлінази шляхом порушення зв’язку фермента з негативно зарядженими ліпідами лізосомальних мембран та індукуючи протеоліз сфінгомієлінази [303]. GW4869 неконкуруючий інгібітор нейтральної сфінгомієлінази, який не впливає на активність кислої сфінгомієлінази. Механізм дії інгібітора пов’язано з втручанням в активацію фермента аніонними фосфоліпідами [304]. Встановлено, що міріоцин частково пригнічує індуковане паклитакселом утворення цераміду на 44 % (Рис. 3.33).

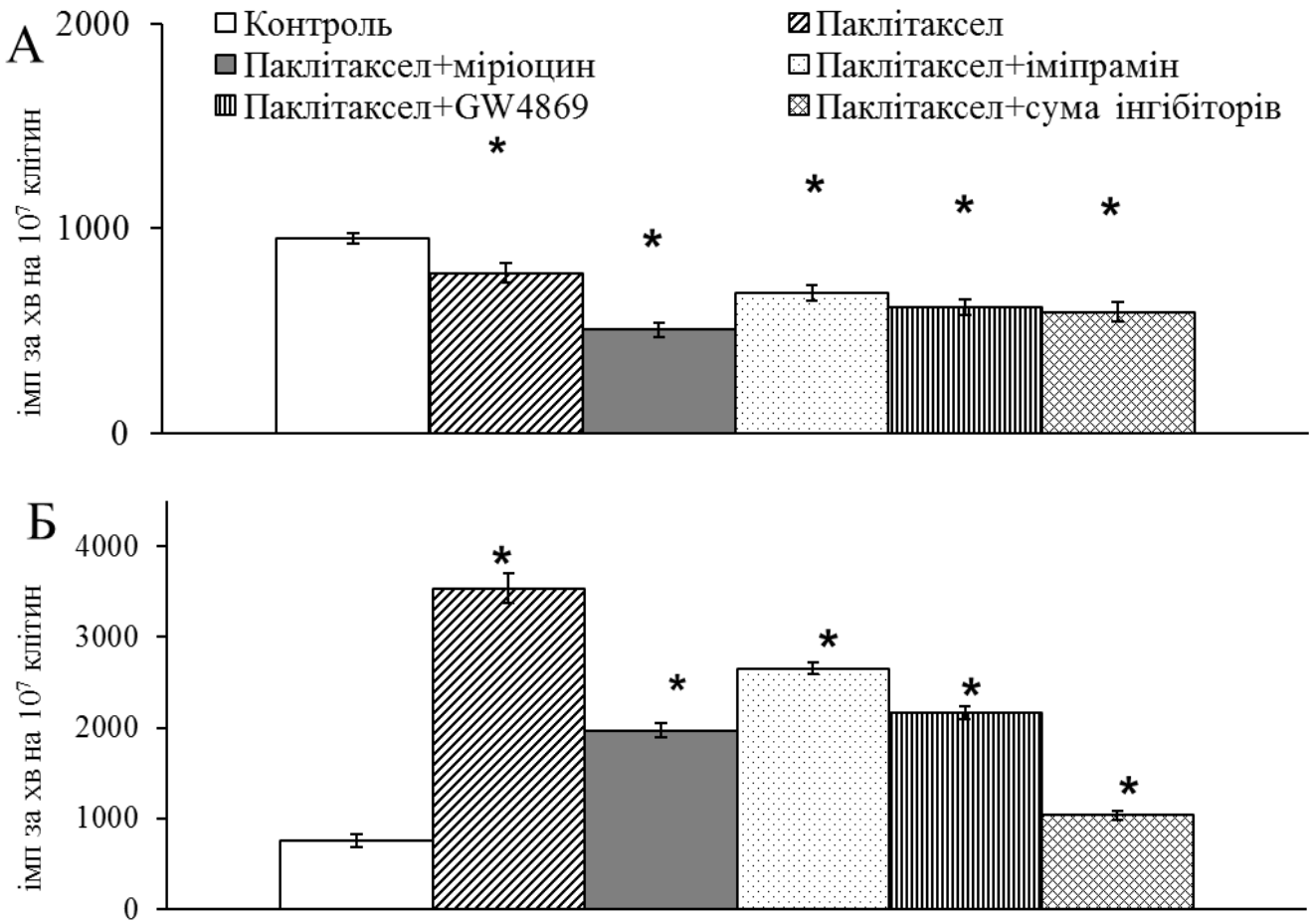

Рис. 3.33 Вплив паклітакселу і інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ на вміст СФМ (А) і цераміду (Б) в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо в порівнянні з контролем, $p \leq 0,05$

Підвищення вмісту цераміду в гепатоцитах 3-місячних щурів після інкубації клітин за наявності паклітакселу супроводжується порушенням індукованого інсуліном утворення [^{14}C]ФЕТ (Рис. 3.34), продукту реакції, яка каталізується ФЛД в присутності етанолу, що свідчить про пригнічення активації ФЛД.

Іміпрамін знижує вміст міченого цераміду на 24% порівняно з клітинами, які інкубувати тільки в присутності паклітакселу, GW4869 – на 38 %, відповідно. Сума інгібіторів пригнічує утворення цераміду на 71 % в порівнянні з паклітакселом і знижує його вміст практично до рівня контрольних клітин (Рис. 3.33). Отримані результати можуть свідчити про те, що паклітаксел в вивченій концентрації індукує накопичення цераміду як в результаті активації синтеза *de novo*, так і шляхом активації гідролізу СФМ сфінгомієліназами [305].

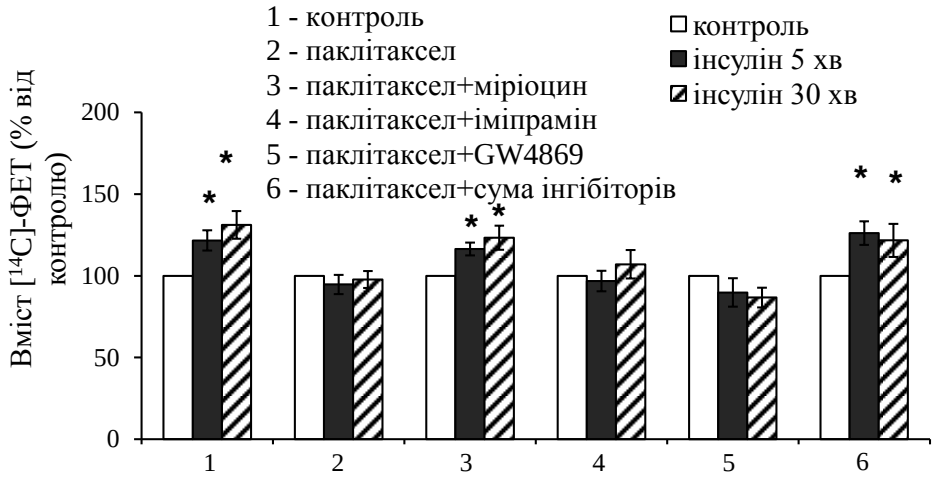

Рис. 3.34 Вплив паклітакселу і інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназної активності на індуковану інсуліном активацію фосфоліпази Д

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, ≤ 0,05

Крім того, встановлено, що в клітинах печінки, які інкубували в присутності паклітакселу і міріоцина або суми інгібіторів, інсулін стимулює утворення [^{14}C]ФЕТ в вивчені проміжки часу (Рис. 3.34). У той час як інгібітори сфінгомієліназ не викликають статистично значущих змін вмісту [^{14}C]ФЕТ. Міріоцин пригнічує синтез *de novo* церамідів шляхом пригнічення ключового ферменту СПТ. Це свідчить про те, що знову синтезовані цераміди надають інгібуючий вплив на ФЛД-залежну ланку сигналінгу інсуліна при моделюванні стану резистентності до дії гормону за допомогою протипухлинного препарату паклітакселу.

Ще одним індуктором обміну сфінголіпідів є інший цитотоксичний препарат – доксорубіцин. Доксорубіцин індукує накопичення цераміду в гепатоцитах щурів [306] та інших типах клітин [307, 308]. Більш того, доксорубіцин може знижувати експресію генів (IRS1, Glut4, AMPK, і GSK3b) які беруть участь в сигналінгу інсуліна в м'язових тканинах і таким чином викликати системну інсулінорезистентність , призводячи до розвитку стану подібного до діабету 2 типу [309, 310].

Для вивчення ефектів ендогенного цераміду на стимуляцію ФЛД інсуліном, гепатоцити були оброблені доксорубіцином перед внесенням інсуліна в культуральне середовище ((Рис. 3.35).

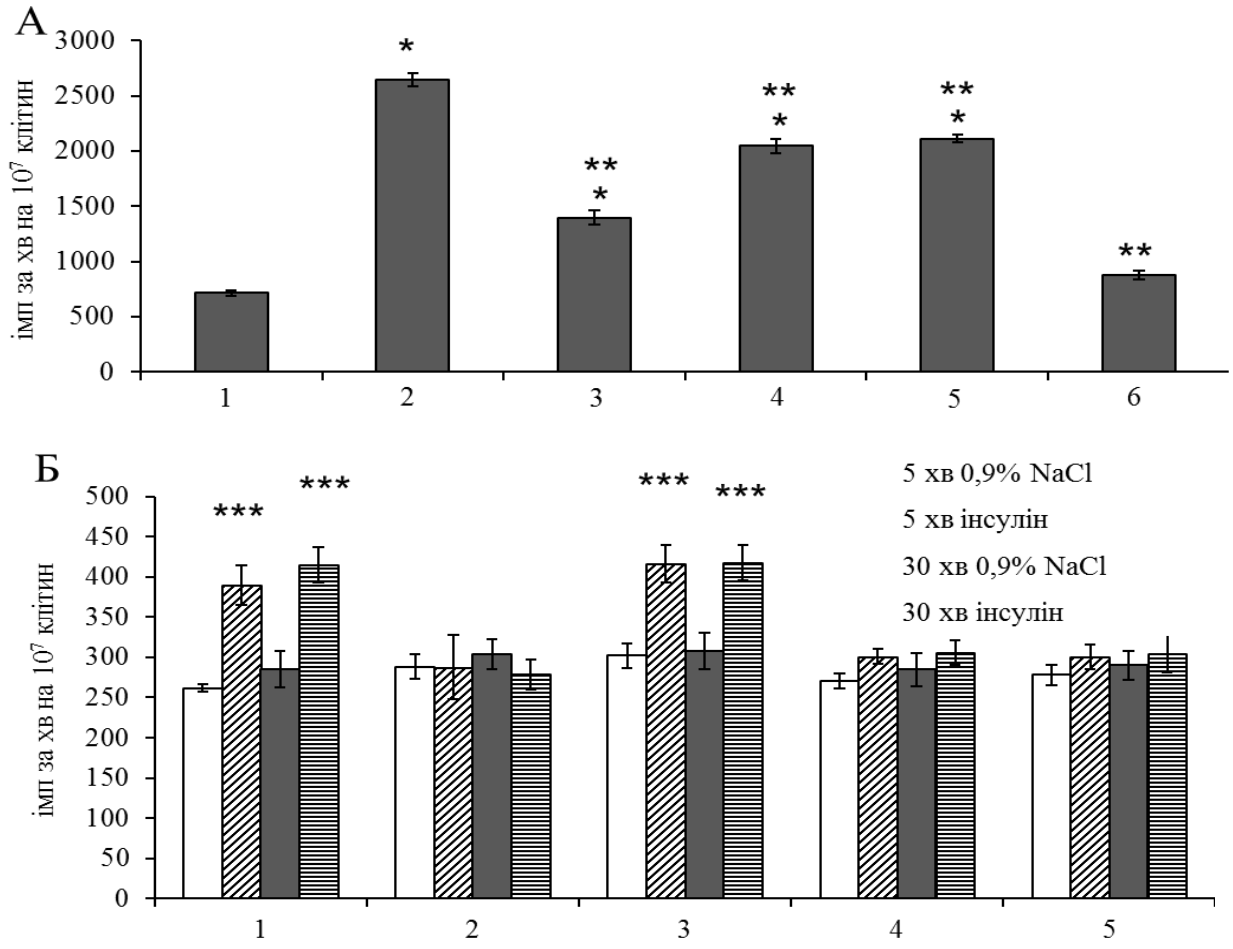

Рис. 3.35 Вплив доксорубіцину і інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназной активності на вміст цераміду (А) і активацію інсуліном фосфоліпази Д (Б) в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітки:

1. * – статистично значимо щодо контролю до доксорубіцину (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$; ** – статистично значимо щодо доксорубіцину, $p \leq 0,05$; *** – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, $p \leq 0,05$

2. (А): 1 – Контроль; 2 – Доксорубіцин; 3 – Доксорубіцин+міріоцин; 4 – Доксорубіцин + GW4869; 5 – Доксорубіцин + іміпрамін; 6 - Доксорубіцин + сума інгібіторів; (Б): 1 – Контроль; 2 – Доксорубіцин; 3 – Доксорубіцин + сума інгібіторів; 4 – Доксорубіцин + сума інгібіторів + галопемід 200 нМ; 5 – Доксорубіцин + сума інгібіторів + галопемід 300 нМ

Доксорубіцин достовірно збільшує вміст цераміду в не стимулюваних клітинах (Рис. 3.35 А) і скасовує стимулюючу дію інсуліна на активність ФЛД

(Рис. 3.35 Б). Беручи до уваги той факт, що доксорубіцин стимулює різні шляхи обміну сфінголіпідів в наступній серії експериментів ми використовували різні інгібітори метаболізму сфінголіпідів для пригнічення індукованого препаратом накопичення цераміду в гепатоцитах (Рис. 3.35).

Інгібування ключових ферментів синтеза сфінголіпідів (СПТ) і деградації сфінгомієліна (нейтральної і кислої сфінгомієлінази) при дії специфічних інгібіторів, міріоцина [297], GW4869 [304], і іміпраміна [303], частково запобігає накопиченню церамідів в гепатоцитах оброблених доксорубіцином (Рис. 3.35 А). Однак, вміст церамідів може бути покращено при використанні всіх інгібіторів обміну сфінголіпідів на гепатоцитах, як було зроблено в даній роботі. Нормалізація рівня церамідів в доксорубіцин-оброблених клітинах за допомогою "коктейлю" інгібіторів відновлювала відповідь гепатоцитів на дію інсуліна. Додавання всіх інгібіторів ключових ферментів синтеза цераміду (міріоцина) і продукції цераміду з сфінгомієліна (GW4869, іміпраміна) в середовище інкубації посилювало активацію ФЛД.

Отримані результати демонструють те, що відповідь гепатоцитів на дію інсуліна може бути змінено при модуляції рівня ендогенних церамідів шляхом стимуляції або пригнічення обміну сфінголіпідів. Більш того, внесення інгібітора активності ФЛД, галопеміда, в середовище інкубації перед «коктейлем» інгібіторів обміну сфінголіпідів редукує стимульовану інсуліном активацію ФЛД, відновлену на тлі суми інгібіторів.

Таким чином, встановлено що, пальмітинова кислота і С2-церамід підвищують в клітинах вміст цераміду за рахунок активації його синтеза *de novo*. Паклітаксел і доксорубіцин індукують утворення цераміду як по шляху синтеза, так і за рахунок активації СФМази. Вивчені індуктори утворення цераміду призводять до пригнічення ФЛД-залежної ланки сигнального шляху інсуліна за рахунок підвищення концентрації сфінголіпідів в клітинах. Використання інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз показало, що саме знову синтезований церамід пригнічує ФЛД-залежну ланку сигнального шляху інсуліна при моделюванні стану

резистентності в клітинах печінки молодих щурів за допомогою попередників церамідів (пальмітинової кислоти і С2-цераміду) і індукторів накопичення церамідів цитотоксичних препаратів – паклітакселу і доксорубіцину.

3. 3 Моделювання вікових змін регулювання інсуліном метаболізма глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях

3. 3. 1 Вікові особливості стимульованого інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях

У попередніх розділах були описані етапи дослідницької роботи, в яких встановлено, що в старості в головних тканинах-мішенях інсуліна відбувається зміна ліпідного спектра, що виявляється у збільшенні вмісту сфінголіпіда цераміда. Крім того, в старості порушується активація ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна, що проявляється в порушенні стимуляції інсуліном утворення специфічного продукту реакції трансфосфатидилювання – ФЕТ. При моделюванні підвищеного вмісту цераміда за допомогою експериментів *in vitro* (з використанням індукторів синтеза цераміда – пальмітинової кислоти, С2-цераміда і цитотоксичних препаратів – паклітакселу та доксорубіцину) або за допомогою аліментарних насичених жирів в умовах *in vivo*, було встановлено підвищення вмісту цераміда, що також супроводжувалося порушенням накопичення ФЕТ при короткочасному впливі інсуліна. В результаті наданих експериментальних впливів, а також в старості підвищення цераміду може відбуватися в результаті активації як шляху синтеза *de novo*, так і в результаті гідролізу СФМ різними СФМзами. Для того, щоб з'ясувати джерела походження цераміду в старості та при експериментальних впливах на наступному етапі цього дослідження клітини старих тварин, а також клітини молодих тварин, які піддавалися впливу індукторів синтеза цераміду, культивували в присутності специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів (міріоцина і фумонізина В1), з інгібіторами кислої і нейтральної СФМаз (іміпраміна і GW4869), а також сумою цих інгібіторів. В результаті було встановлено зниження

вмісту цераміду в клітинах 3- і 24-місячних щурів в результаті дії інгібіторів. У молодих тварин максимальний вплив на вміст сфінголіпідв надав міріоцин і сума всіх інгібіторів, при цьому повністю відновлювалась ФЛД-залежнв відповідь клітин на дію інсуліна. У старих тварин міріоцин відновлював інсулін-залежну активацію ФЛД тільки частково. З огляду на те, що інсулін є головним регулятором процесів обміну глюкози, а також той факт, що накопичення цераміду в старості і в умовах моделювання стану резистентності тканин-мішеней до дії гормону призводить до порушення сигналінгу інсуліна, важливим є вивчення вікових змін регульованого інсуліном обміну глюкози.

Встановлено, що в клітинах печінки 3-місячних щурів інсулін стимулює поглинання глюкози з 236,9±7,9 в контролі до 381,9±10,1 (імп за хв на 10^7 клітин) після стимулювання клітин інсуліном (Рис. 3.36 А). Крім того, інсулін підсилює утворення глікогена гепатоцитами молодих тварин з 1166,23±111,5 до 2086±269,7 (імп за хв на 10^7 клітин) (Рис. 3.36 Б).

У той же час, у старих 24-місячних щурів інкубація клітин з інсуліном не супроводжується стимуляцією процесів поглинання глюкози і утворення глікогена (Рис. 3.36).

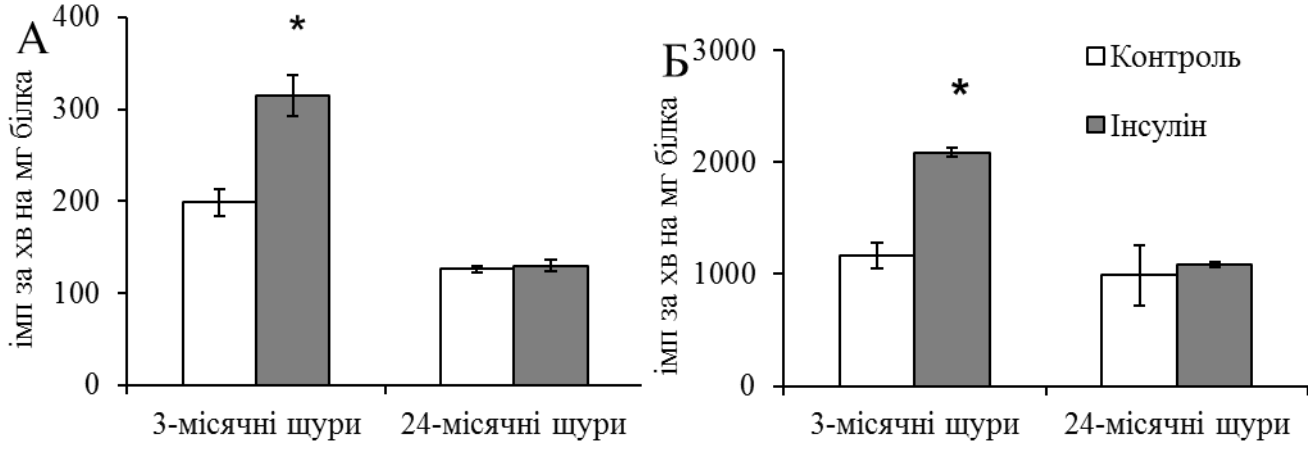

Рис. 3.36 Вплив інсуліна на поглинання глюкози (А) і утворення глікогена (Б) у клітинах печінки щурів 3- і 24-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Глюкоза є основним джерелом енергії для всіх клітин ссавців, а інсулін у свою чергу є головним регулятором процесів обміну глюкози. Основними функціями інсуліна у м'язовій і жировій тканинах є посилення поглинання глюкози клітинами. У печінці інсулін підсилює вхід глюкози у клітини включення її у глікоген, а також пригнічує глюконеогенез.

Провідну роль в сполученні активованих рецепторів інсуліна з внутрішньоклітинними шляхами передачі сигнала виконують адапторні білки – інсулінрецепторні субстрати IRS. Ці білки за рахунок сайтів тирозинового фосфорилювання взаємодіють з src-гомологічним-2 доменсодержащими білками, такими як р85-регуляторна суб'одиниця ФІ-3-кінази, протеїн-2, що зв'язує рецептор фактора росту (Grb2); і протеїн-тирозинфосфатаза (Syp) [311]. ФІ3-кіназний сигнальний шлях, що зв'язує IRS з Akt/ПКВ, є одним з основних в реалізації метаболічних ефектів інсуліна в периферичних тканинах.

Відомо, що накопичення цераміду в клітинах скелетної мускулатури, адипоцитах є однією з основних причин розвитку резистентності клітин до дії інсуліна [165, 179, 312-315]. Так, на інсулінорезистентних щурах лінії Zuker встановлено, що при стимуляції різних типів м'язів відбувається зниження вмісту ДАГ і церамідів, що супроводжується відновленням чутливості м'язових клітин до дії інсуліна [304]. На м'язових трубочках L6 було показано, що короткочасне (2 ч) і довгострокове (18 год) інгібування СПТ міріоцином запобігає накопиченню цераміду і одночасно з цим відновлює індуковане пальмітиновою кислотою блокування стимульованого інсуліном поглинання глюкози [316].

Встановлено, що в діафрагмі 3-місячних щурів інсулін стимулює поглинання глюкози з 1622,1±120,1 до 2441,6±187,1 (імп за хв на мг білка) (Рис. 3.37 А). Тоді як у 24-місячних щурів у тканині діафрагми не відзначено статистично значущих змін вмісту міченої глюкози (Рис. 3.37 А). Крім того, в тканині діафрагми 3-місячних щурів під дією інсуліна посилюється утворення глікогена з 3022,1±180,8 до 4262,2±178,4 (імп за хв на мг білка) (Рис. 3.37 Б). У 24-місячних тварин інсулін не

викликає статистично значущих змін вмісту міченого [^{14}C]глікогена в тканині діафрагми (Рис. 3.37 Б).

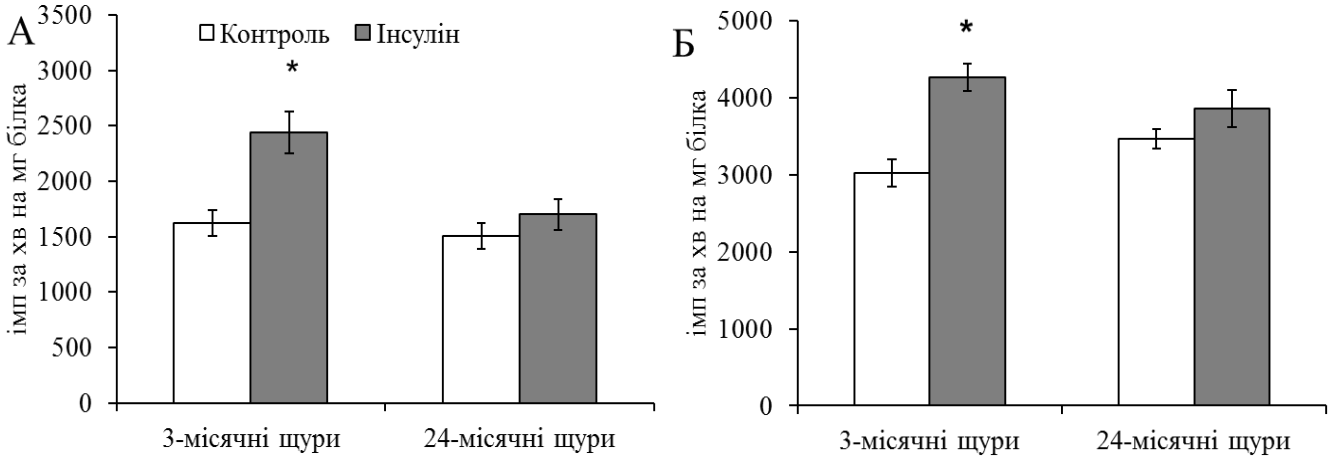

Рис. 3.37 Вплив інсуліна на поглинання глюкози (А) і утворення глікогена (Б) в діафрагмі щурів 3- і 24-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

Раніше було показано, що в старості підвищується вміст церамідів і їх попередників вільних жирних кислот як у класичних тканинах-мішенях дії інсуліна – скелетній мускулатурі і клітинах печінки [219, 316], так і в неокортексі, і гіпокампі [20, 219]. Зниження рівня церамідів в старих клітинах за допомогою інгібітору його синтеза *de novo* – міріоцина викликало активацію індукованого інсуліном поглинання глюкози [219]. Автори приходять до висновку, що спонтанна резистентність старих клітин печінки до дії гормону пов'язана з віковим накопиченням цераміду.

Інсулінозалежне поглинання глюкози клітинами-мішенями здійснюється через особливі транспортери чутливі до дії гормону – ГЛЮТ4. Ці транспортери глюкози ідентифіковані в неокортексі, мозочку, ядерних структурах і спинному мозку [317]. ГЛЮТ4 поза стимуляції інсуліном знаходяться в мембранах ендоплазматичного ретикулуму. При стимуляції клітин інсуліном відбувається активація сигнального каскаду і запуск ланцюга подій, які викликають екстерналізацію більше 50 % транспортерів ГЛЮТ4 в клітинну мембрану і посилення поглинання глюкози.

У даній роботі встановлено, що в неокортексі 3-місячних щурів інсулін стимулює процеси обміну глюкози. Так, при інкубації ізольованих шматочків тканині неокортексу в присутності інсуліна відзначено посилення поглинання міченої [^{3}H]глюкози на 41 % і підвищення вмісту [^{14}C]глікогена на 50 % (Рис. 3.38).

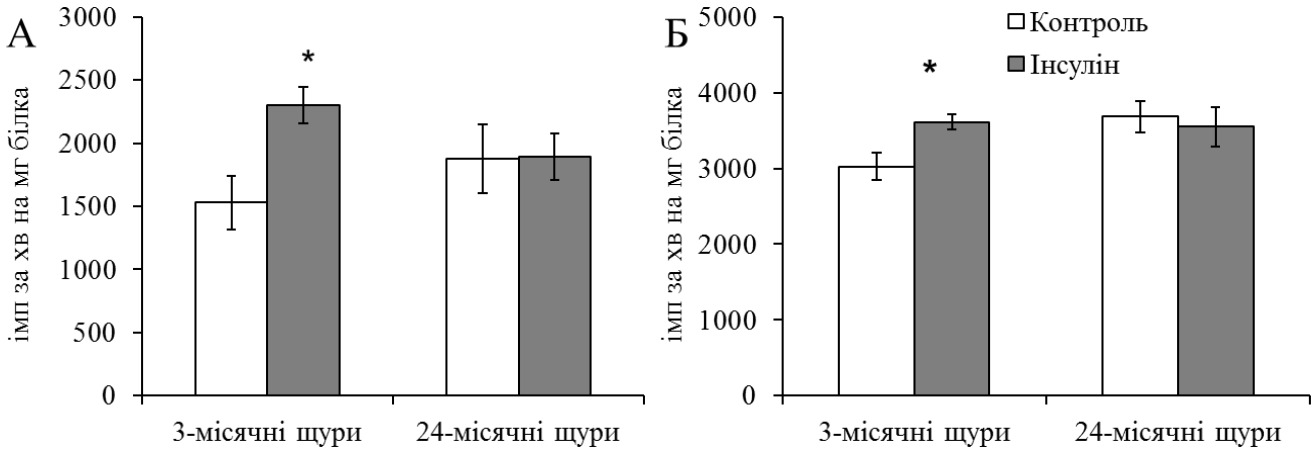

Рис. 3.38 Вплив інсуліна на поглинання глюкози (А) і утворення глікогена (Б) в неокортексі щурів 3- і 24-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9 % NaCl), $p \leq 0,05$

У старих 24-місячних тварин в шматочках тканини неокортексу у відповідь на дію інсуліна не було відзначено статистично значущих змін в рівні поглинання [^{3}H]глюкози і вмісті [^{14}C]глікогена (Рис. 3.38).

Роботами нашої лабораторії, проведеними раніше на класичних мішенях інсуліна, м'язовій тканини і гепатоцитах [165, 169] було показано, що стимулювання поглинання глюкози і утворення глікогена клітинами пов'язане з активацією інсуліном ФЛД. Крім того, раніше було встановлено, що в тканині неокортексу молодих щурів інсулін стимулює активацію ФЛД [15, 199]. Активована ФЛД гидролізує ФХ, в результаті цієї реакції утворюється холін і ФК. ФЛД і ФК беруть участь в процесах сигнальної трансдукції і мембранного транспорту. В роботі Xu і співавторів було показано, що гальмування ФЛД специфічним (FIPI) і неспецифічним (1-бутанол) інгібіторами знижує частоту злиття везикул, які містять

ГЛЮТ4, з мембраною і перешкоджає поглинанню глюкози клітинами [13]. У старості спостерігається порушення інсулін-залежної активації ФЛД і процесів обміну глюкози в діафрагмі і клітинах печінки і це пов'язано з підвищенням вмісту цераміду і його попередників – ВЖК [15, 199, 318]. В даний час вважають, що церамід може безпосередньо впливати на ФЛД, пригнічуючи даний фермент. Церамід може конкурувати з кофакторами ФЛД за зв'язування з каталітичним ядром ферменту і пригнічувати активацію ФЛД фосфатидною кислотою і лізофосфатідною кислотою [24]. Він також частково блокує транслокацию активаторів ФЛД білка ARF і ПКС [26]. Церамід може пригнічувати транскрипцію ФЛД [182]. Крім того, його дія може бути опосередкована. Накопичення церамідів в ліпідних рафтах мембран може призводити до порушення фізичних властивостей цих структур і пригніченню сигнальних молекул пов'язаних з ними, в тому числі і ФЛД [25]. Крім того, церамід пригнічує активність Akt/ПКВ, яка є важливим учасником регуляції метаболізму глюкози інсуліном.

Раніше було встановлено підвищення вмісту вільних ЖК і церамідів в тканині неокортексу старих 24-місячних щурів у порівнянні з дорослими тваринами [20]. Крім того, при моделюванні стану резистентності клітин печінки, діафрагми і неокортексі молодих 3-місячних щурів за допомогою екзогенного С2-цераміду, а також попередника синтеза ендогенних церамідів – пальмітинової кислоти відзначено підвищення вмісту ендогенних церамідів і гальмування інсулін-залежної активації ФЛД [165, 198, 170]. У класичних тканинах-мішенях інсуліна, м'язової тканини і печінки, пригнічення активації інсуліном ФЛД супроводжувалося блокуванням інсулін-залежного поглинання глюкози і утворення глікогена [165, 170]. З огляду на ці дані і результати дослідницької роботи можна припустити, що вікове підвищення вмісту церамідів супроводжується порушенням регуляції інсуліном активності ФЛД і є однією з причин інгібування індукції гормоном метаболізму глюкози в діафрагмі, клітинах печінки і неокортексі в старості.

3. 3. 2 Вплив екзогенних пальмітинової кислоти і С2-цераміда на стимульований інсуліном метаболізм глюкози в клітинах- і тканинах-мішенях

У розділі 3.3 цього дослідження було встановлено, що інкубація клітин печінки, тканини діафрагми і неокортексу молодих статевозрілих щурів самців лінії Вістар в присутності екзогенних індукторів синтеза сфінголіпідів – пальмітинової кислоти і С2-цераміда – супроводжувалося підвищенням вмісту знову синтезованого ендогенного цераміда і порушенням активації інсуліном ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду гормону.

Показано, що сфінголіпіди грають важливу роль в регуляції гомеостазу глюкози в різних типах клітин [319]. Так в модельних експериментах *in vitro* підвищення вмісту цераміду передує розвитку інсулінорезистентності клітин. Легко проникаючи у клітину аналоги цераміду пригнічують сигналінг інсуліна в м'язових трубочках [178, 316] і адипоцитах [320]. Механізм цієї дії цераміду полягає в пригніченні Akt-1/ПКВ, ключового учасника сигнального каскаду інсуліна [321]. Церамід блокує транслокацию Akt-1 в плазматичну мембрану [321] в м'язових клітинах [178, 182], в адипоцитах [320] і в клітинах судинної мережі [230, 322]. Підвищення вмісту цераміда в клітинах індукує дефосфорилювання Akt в м'язових трубочках лінії С2С12 [177], адипоцитах [320], і культурі клітин РС12 [323] шляхом активації протеїнфосфатази 2А.

Міріоцин, циклосерин або фумонізин В1, специфічні інгібітори синтеза сфінголіпідів *de novo* запобігають порушенню фосфорилювання і транслокації Akt-1 у відповідь на дію інсуліна при дії підвищених концентрацій пальмітинової кислоти на клітини-мішені гормону. Фумонізин В1, мікотоксин, що інгібує сфінгозин-N-ацилтрансферазу (церамідсинтазу) зв’язуючи каталітичний центр ферменту [324]. Пригнічення СПТ у тварин також блокує синтез сфінголіпідів, при цьому знижується ліпотоксичність, відновлюється відповідь на дію інсуліна і поліпшується регуляція метаболізму глюкози [155, 269]. Ці дані літератури підтверджують те, що посилення синтеза цераміду є необхідною умовою розвитку інсулінорезистентності, однак питання про те чи є ефекти накопичення цераміду

прямими або вони опосередковуються іншими біологічно активними сполуками залишається не з'ясованим. Крім того, механізми регуляції процесів обміну глюкози в тканинах-мішенях інсуліна при розвитку вікових патологій вивчені недостатньо. Метою наступного етапу цієї роботи стало дослідження регуляції інсуліном обміну глюкози при моделюванні стану порушення чутливості до дії інсуліна в діафрагмі, клітинах печінки і тканині неокортексу щурів за допомогою екзогенних індукторів синтеза сфінголіпідів – пальмітинової кислоти і С2-цераміду.

Встановлено, що в тканині діафрагми пальмітинова кислота пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена (Рис. 3.39).

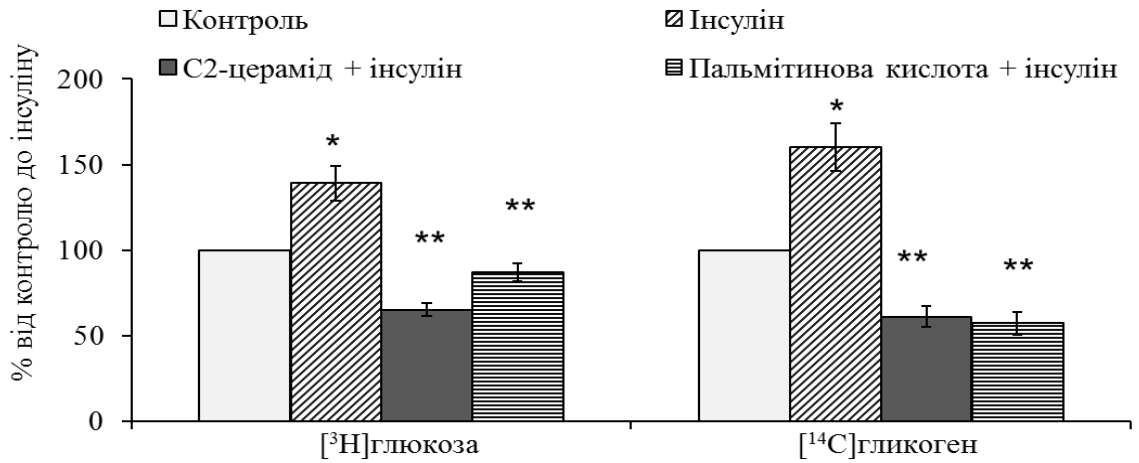

Рис. 3.39 Вплив пальмітинової кислоти і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в шматочках діафрагми 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$; ** – статистично значимо щодо «інсуліна», $p<0,05$

Цераміди є членами сфінгомієлінового сигнального шляху, які утворюються або в результаті синтеза *de novo*, або в результаті деградації СФМ. Показано, що вони є індукторами ліпоапоптоза в різних типах клітин [325], в тому числі, і в м'язових клітинах, і можуть провокувати розвиток інсулінорезистентності [167, 326-328]. У попередніх розділах було показано, що тривала інкубація діафрагми 3-місячних інтактних щурів з екзогенним С2-церамідом призвела до підвищення в порівнянні з контролем вмісту [^{14}C]цераміду і зниження вмісту [^{14}C]СФМ (розділ 3.2.2). Відомо також, що церамід є інгібітором ФЛД [324]. У розділі 3.2.3

встановлено, що екзогенний С2-церамід скасував стимулюючу дію інсуліна на ФЛД. Встановлено, що С2-церамід інгібував, стимульоване інсуліном поглинання клітинами 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і синтез в них [^{14}C]глікогена (Рис. 3.39). Вважають, що атипові ізоформи ПКСζ і λ, ПКВ/Akt і ФЛД беруть участь в регуляції швидкість-лімітуючого етапу транспорту глюкози, а саме транслокации чутливого до інсуліна транспортера глюкози ГЛЮТ4 з ендоплазматичного ретикулуму в плазматичну мембрану [328]. Відомо, що церамід є інгібітором ПКВ, а також ФЛД і інгібування цих ферментів сфінголіпідом призводить до порушення сигналінгу інсуліна [179]. Тому, можна вважати, що підвищення базального вмісту [^{14}C]цераміду під дією екзогенного С2-цераміду супроводжується пригніченням індукованого інсуліном поглинання глюкози і синтеза глікогена і може бути пов'язано зі змінами активності як ПКС, так і ФЛД, і ПКВ [18, 249].

Раніше було показано, що в старих клітинах печінки щурів збільшений вміст цераміда знижується при інкубації гепатоцитів в присутності специфічного інгібітору синтеза цераміда – міріоцина. Також встановлено, що зниження вмісту цераміда в гепатоцитах старих 24-місячних щурів за допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз супроводжується підвищенням активності ФЛД і посиленням процесів поглинання глюкози і утворення глікогена у відповідь на дію інсуліна.

Моделювання стану порушення чутливості до дії гормону клітин печінки при культивуванні гепатоцитів молодих щурів в присутності підвищеної концентрації пальмітинової кислоти або екзогенного С2-цераміду показало, що інкубація гепатоцитів 3-місячних щурів в присутності С2-цераміду або пальмітинової кислоти призводить до підвищення вмісту в клітинах печінки ендогенних церамідів. Екзогенні пальмітинова кислота і С2-церамід гальмували стимуляцію інсуліном ФЛД в даних умовах експерименту. Як пальмітинова кислота, так і екзогенний С2-церамід, перешкоджають стимуляції інсуліном поглинання глюкози і синтеза глікогена в гепатоцитах молодих тварин (Рис. 3.40). Отримані дані свідчать про

порушення чутливості гепатоцитів молодих щурів до дії інсуліна в умовах інкубації клітин за наявності пальмітинової кислоти і С2-цераміду.

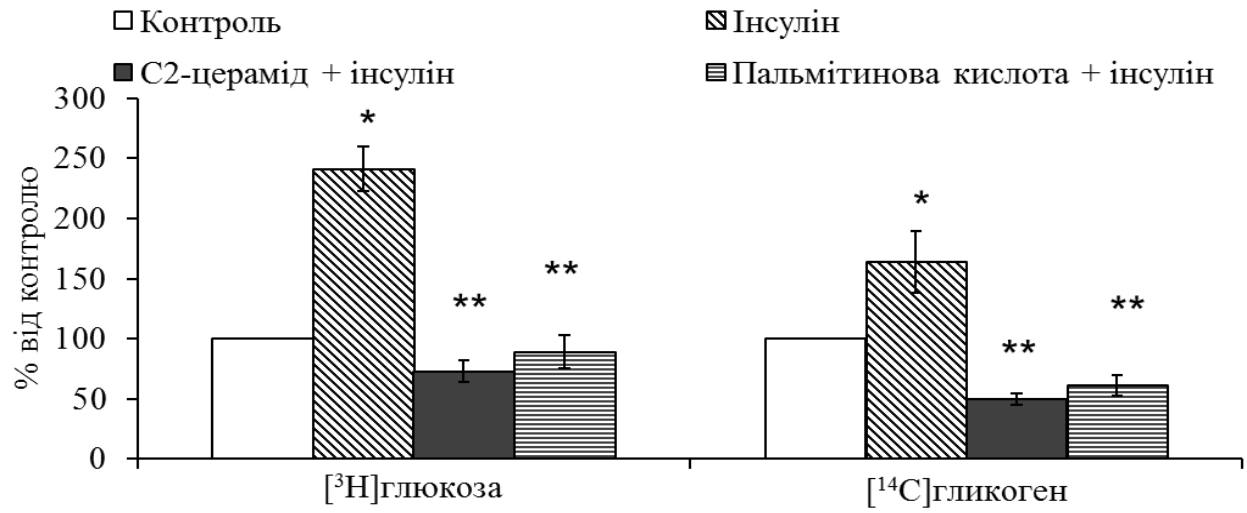

Рис. 3.40 Вплив пальмітинової кислоти і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена у клітинах печінки 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$; ** – статистично значимо щодо «інсуліна», $p<0,05$

Раніше було встановлено, що в старості підвищується вміст церамідів і їх попередників вільних ЖК як у класичних тканинах-мішенях дії інсуліна – скелетній мускулатурі і клітинах печінки [18, 20, 328], так і в неокортексі і гіпокампі [20, 329]. Наслідком зниження рівня церамідів в старих клітинах печінки за допомогою інгібітору його синтеза *de novo* – міріоцина було відновлення активації індукованого інсуліном поглинання глюкози. Таким чином, показано, що спонтанне порушення чутливості старих клітин печінки до дії гормону пов'язане з віковим накопиченням цераміду.

З метою моделювання стану порушення чутливості тканини неокортексу до дії інсуліна подібне до того, яке спостерігається при старінні, на наступному етапі роботи було вивчено вплив екзогенних пальмітинової кислоти або С2-цераміду на інсулін-залежне поглинання глюкози і утворення глікогена в тканині неокортексу 3-місячних щурів. Інкубація тканини неокортексу молодих щурів в присутності екзогенної пальмітинової кислоти призвела до пригнічення стимульованого

інсуліном поглинання [^{3}H]глюкози на 67 % в порівнянні з інсуліном (Рис. 3.41). Під дією С2-цераміду відзначено зниження рівня поглинання міченої [^{3}H]глюкози на 71 % в порівнянні з інсуліном. У той же час, при інкубації тканини неокортексу в присутності пальмітинової кислоти або С2-цераміду встановлено гальмування стимульованого інсуліном утворення міченого [^{14}C]глікогена нервовими клітинами (Рис. 3.41).

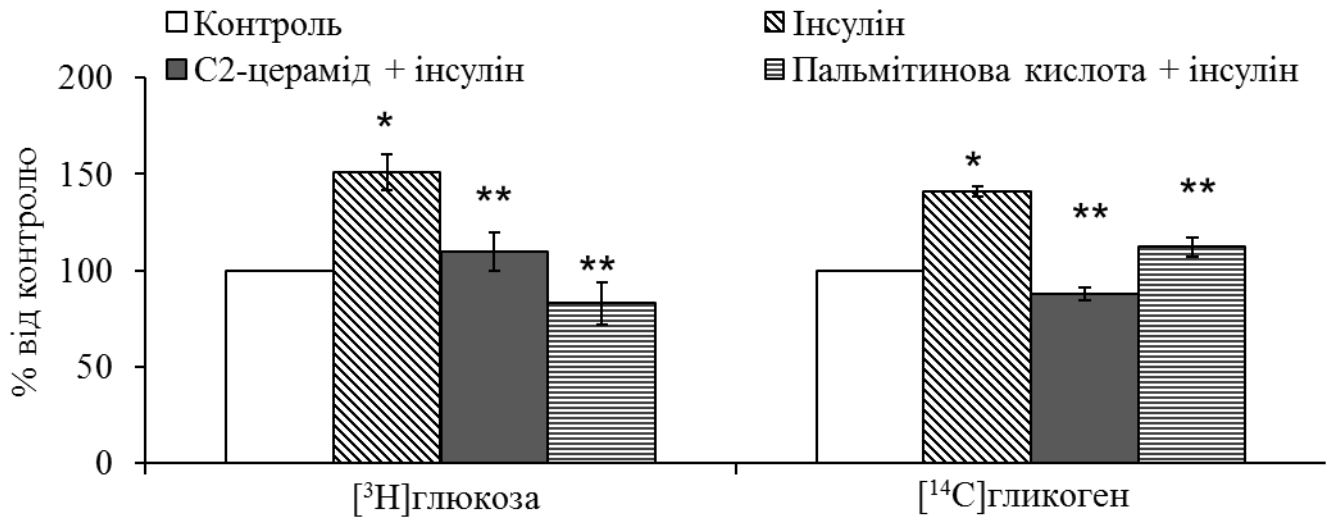

Рис. 3.41 Вплив пальмітинової кислоти і С2-цераміда на індуковане інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена у неокортексі 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значмо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$; ** – статистично значимо щодо «інсуліна», $p<0,05$

Таким чином, встановлено, що моделювання вікового підвищення вмісту цераміду в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі щурів за допомогою ендогенних попередників (пальмітинової кислоти і С2-цераміду) супроводжується зниженням чутливості тканин-мішеней до дії інсуліна. Велике значення в розвитку вікової резистентності клітин печінки, тканини діафрагми і неокортексу до дії інсуліна відіграє зміна ліпідного спектра мембран клітин, зокрема, підвищення вмісту церамідів. Церамід, будучи інгібітором ключових учасників сигнальних шляхів інсуліна в мозку, таких як Akt/ПКВ, ARF, і ФЛД, може призводити до порушення функціонування сигнального каскаду і формування фізіологічної відповіді. З огляду на те, що глюкоза грає важливу роль у функціонуванні всіх

вивчених тканин і клітин і процеси поглинання і запасання глюкози є мішенню дії церамідов, можна припустити, що пригнічення інсулін-залежного обміну глюкози може бути важливою причиною порушення функціонування клітин-мішеней інсуліна в старості і передувати розвитку різних патологій.

3. 3. 3 Вплив фармакологічних індукторів накопичення цераміда і інгібіторів обміну сфінголіпідів на стимуляцію інсуліном метаболізму глюкози у клітинах- і тканинах-мішенях

Показано, що обмін сфінголіпідів посилюється у старих щурів у порівнянні з молодими в печінці [22] і структурах мозку (стриатумі, гіпокампі і фронтальній корі великих півкуль) [19, 20]. Накопичення цераміду в старості в печінці і гепатоцитах супроводжується зниженням вмісту СФМ і посиленням активності кислої і нейтральній СФМаз [18, 21]. Вікове підвищення продукції і накопичення цераміду може бути індуковано в різних типах клітин шляхом перевантаження попередником сфінголіпідів – пальмітинової кислотою. Внесення насичених ЖК в раціон мишей статистично значимо збільшувало вміст цераміду в печінці і камбаловидній м'язі, тоді як міріоцин, інгібітор активності СПТ1, введений тваринам блокував продукцію цераміду в тканинах [269]. Додавання пальмітинової кислоти в середовище інкубації гепатоцитів індукує значне накопичення цераміду в клітинах [330-333]. Індуковане пальмітинової кислотою накопичення цераміду в клітинах печінки і астроцитах блокувалось інгібітором СПТ1 (L-циклосерином) або церамідсінтази (фумонізином В1), відповідно, але не інгібітором кислої СФМази [273, 332].

Встановлено, що в клітинах печінки 3-місячних щурів інкубація клітин в присутності пальмітинової кислоти і С2-цераміду призводить до гальмування стимульованого інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена (Рис. 3.42). Міріоцин підвищує, але не відновлює повністю стимульоване інсуліном поглинання глюкози і утворення глікогена в молодих гепатоцитах, оброблених пальмітиновою кислотою і С2-церамідом (Рис. 3.42).

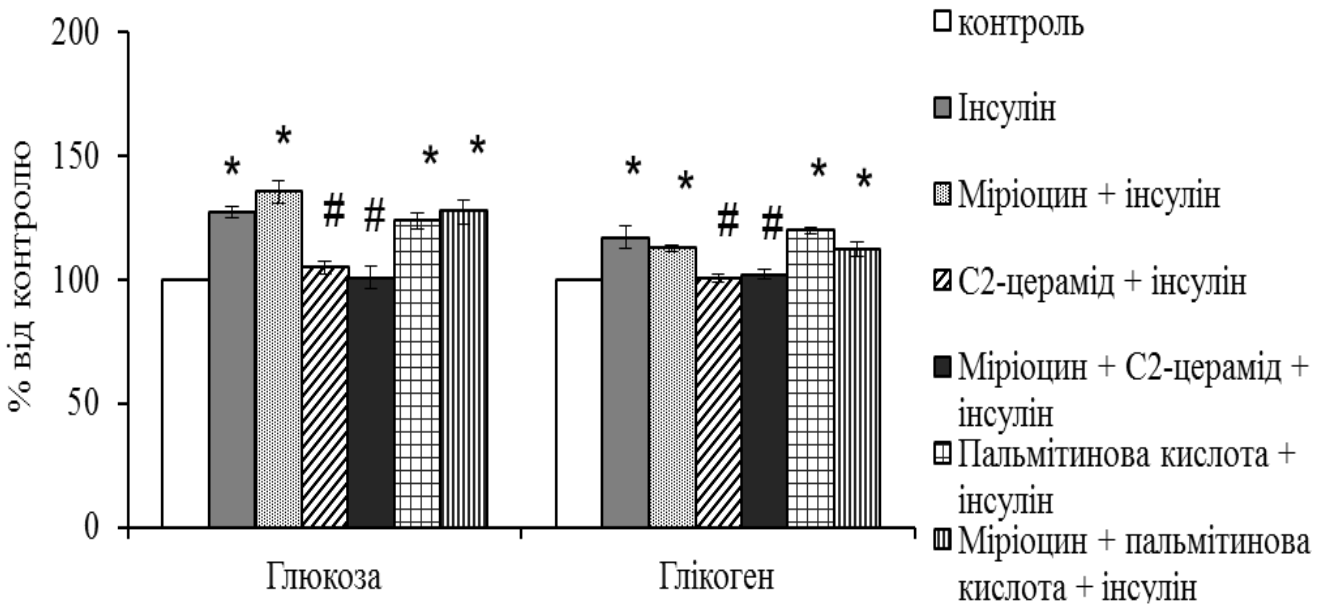

Рис. 3.42 Вплив пальмітинової кислоти і С2-цераміда на стимульовані інсуліном поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози і утворення [^{14}C]глікогена у гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо «контролю», $p < 0,05$; # – статистично значимо щодо «інсуліна», $p < 0,05$

У попередніх розділах даної роботи було показано, що міріоцин нормалізує вміст ендогенних церамідів в гепатоцитах старих щурів і молодих гепатоцитах, культивованих за наявності як С2-цераміду, так і пальмітинової кислоти, що свідчить про те, що активація синтеза цераміду *de novo* є важливою причиною його накопичення в клітинах печінки. Ендогенні С2-церамід і пальмітинова кислота повністю пригнічують активуючу дію інсуліна як на ФЛД (розділ 3.3), так і на обмін глюкози в гепатоцитах молодих тварин. Однак нормалізація вмісту церамідів за допомогою інгібітору синтеза сфінголіпідів міріоцина повністю відновлює стимулюючу дію інсуліна на ФЛД в нечутливих до інсуліна клітинах молодих щурів, що свідчить про те, що пальмітинова кислота і С2-церамід переважно діють на ФЛД в стимульованих гормоном клітинах, збільшуючи вміст ендогенних знову синтезованих церамідів. У той же час міріоцин підсилює, але не відновлює дію інсуліна на транспорт глюкози і синтез глікогена в гепатоцитах нечутливих до інсуліна. Отримані дані можуть свідчити про те, що знову синтезовані цераміди

пригнічують ФЛД-залежну ланку сигналінгу інсуліна і не впливають на інші шляхи сигнальної трансдукції інсуліна в даних умовах експерименту.

Паклітаксел і доксорубіцин є цитотоксичними препаратами, які здатні індукувати накопичення цераміду в клітинах як по шляху синтеза *de novo*, так і активуючи сфінгомієлінази [300]. При цьому механізми утворення цераміду для паклітакселу можуть залежати від концентрації цитостатика: при низьких концентраціях він індукує активацію кислої СФМази, а високі концентрації необхідні для запуску синтеза цераміду *de novo* [300]. У розділі 3.2 було показано, що інгібітор синтеза сфінголіпідів міріоцин і інгібітори кислої і нейтральної СФМази іміпрамін і GW4869 знижують індукований паклітакселом або доксорубіцином вміст міченого цераміду в молодих гепатоцитах [196]. Крім того, тільки міріоцин відновлює активацію інсуліном ФЛД в клітинах печінки передінкубірованних з паклітакселом. Для доксорубіцину показано відновлення вмісту церамідів в клітинах печінки до рівня молодих тварин і відновлення стимульованої інсуліном активації ФЛД (розділ 3.2) при дії суми інгібіторів обміну сфінголіпідів.

На даному етапі роботи встановлено пригнічення інсулін-стимульованого поглинання глюкози під дією паклітакселу (Рис. 3.43). При спільній дії паклітакселу з міріоцином або іміпраміном спостерігається посилення поглинання глюкози клітинами печінки на 25 % і 29 %, відповідно, порівняно з контролем до інсуліна. Сума інгібіторів запобігає пригніченню паклітакселом інсулін-залежного поглинання глюкози в гепатоцитах молодих щурів.

Нормалізація рівня церамідів в доксорубіцин-оброблених клітинах за допомогою "коктейлю" інгібіторів супроводжувалася відновленням відповіді гепатоцитів на дію інсуліна.

У попередньому розділі встановлено, що внесення всіх інгібіторів ключових ферментів синтеза цераміду (міріоцина) і продукції цераміду зі сфінгомієліна (GW4869, іміпраміна) в середовище інкубації гепатоцитів посилювало активацію ФЛД (розділ 3.3).

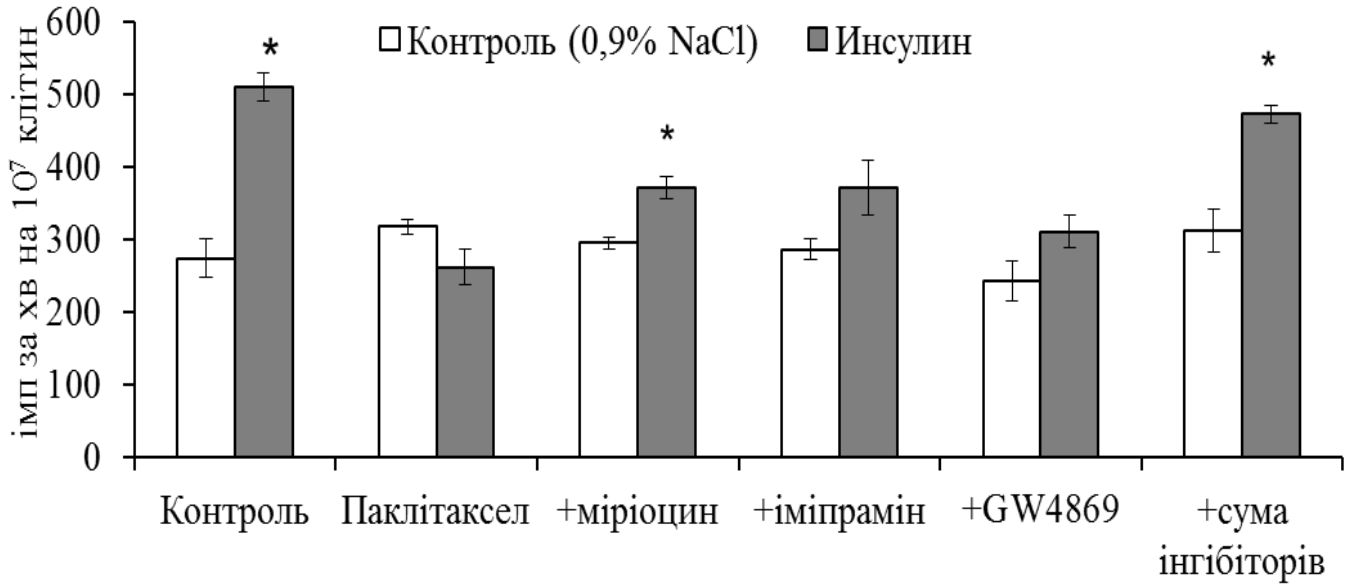

Рис. 3.43 Вплив паклітакселу і інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ на індуковане інсуліном поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітки:

1. Білі стовпці – контроль (0,9 % NaCl), заштриховані стовпці – інсулін

2. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна, $p \leq 0,05$

Внесення інгібіторів обміну сфінголіпідів в середовище інкубації клітин печінки запобігало доксорубіцин-індукованому пригніченню поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози під дією інсуліна в гепатоцитах (Рис. 3.44).

Більш того, інгібування активності ФЛД за допомогою специфічного інгібітору, галопеміда, що передує фармакологічної даун регуляції рівня цераміда в клітинах, пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози в гепатоцитах (Рис. 3.44). Ці результати підтверджують і розширюють уявлення про значну роль ФЛД в регуляції метаболізму глюкози в первинних гепатоцитах, стимульованих інсуліном.

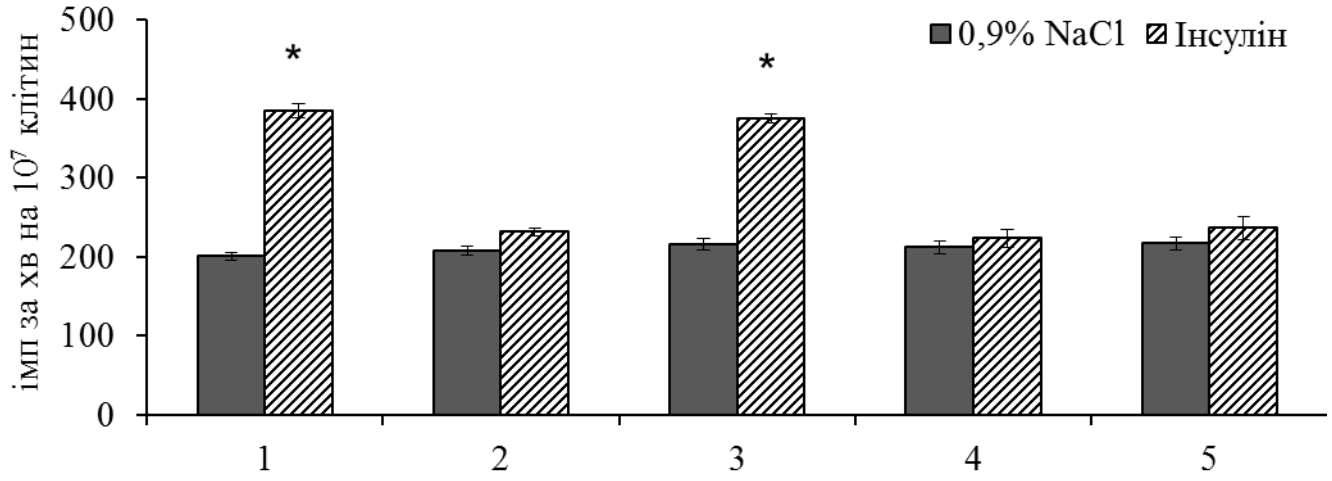

Рис. 3.44. Вплив доксорубіцину, інгібіторів обміну сфінголіпідів і галопеміда на індуковане інсуліном поглинання 2-деокси-[^{3}H]-D-глюкози в гепатоцитах 3-місячних щурів

Примітки:

1. 1 – Контроль; 2 – Доксорубіцин; 3 – Доксорубіцин + сума інгібіторів; 4 – Доксорубіцин + сума інгібіторів + галопемід 200 нМ; 5 – Доксорубіцин + сума інгібіторів + галопемід 300 нМ

2. *** – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9% NaCl), $p \leq 0,05$

Таким чином, індуктори утворення цераміду – пальмітинова кислота, С2-церамід, паклітаксел і доксорубіцин повністю пригнічують стимулювання інсуліном поглинання глюкози. Введення інгібітора синтеза цераміду *de novo* міріоцина частково знімає ефекти пальмітинової кислоти, С2-цераміду на інсулін-залежне поглинання глюкози молодими клітинами, що свідчить про участь інших шляхів утворення цераміду в клітинах. Міріоцин і іміпрамін також частково підвищують поглинання глюкози клітинами печінки порушене паклітакселом і доксорубіцином, а введення суми інгібіторів (міріоцина, іміпраміна і GW4869) відновлює відповідь клітин практично повністю. Таким чином, пригнічення різних шляхів утвроення цераміду призводить до відновлення чутливості клітин печінки до дії інсуліна при моделюванні стану резистентності за допомогою попередників синтеза і індукторів утворення сфінголіпіда цераміда. Крім того, використання специфічного інгібітора ФЛД – галопеміда – на тлі підвищення і корекції рівня

цераміду за допомогою цитотоксичного препарату та інгібіторів обміну сфінголіпідів, підтверджує ключову роль ФЛД в процесі регуляції інсуліном обміну глюкози в клітинах печінки

3. 4 Корекція вікового зниження чутливості тканин до дії інсуліна

3. 4. 1 Корекція вікового зниження чутливості фосфоліпаза Д-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна

Сфінголіпіди – це клас біологічно активних молекул, залучених в регуляцію фізіологічних процесів, таких як ріст клітин, апоптоз, аутофагія, ангіогенез, запалення і нейродегенерація. Сфінголіпіди грають важливу роль в розвитку резистентності клітин-мішеней до дії інсуліна. Модуляція вмісту сфінголіпідів в тканинах-мішенях дії інсуліна в умовах *in vivo* та в експериментах на культивованих клітинах, як правило, супроводжується зміною їх чутливості до дії гормону. Найбільш активними інгібіторами різних ланок сигнальної трансдукції інсуліна є – цераміди і гангліозиди. Інсулінорезистентність, індукована висококалорійною дієтою або інфузією ліпідів, супроводжується накопиченням в м'язовій тканині і печінці не тільки попередника синтеза сфінголіпідів *de novo* – пальмітинової кислоти, але і цераміду [155, 156]. У той час, як інгібітори ключового ферменту синтеза сфінголіпідів (СПТ) – міріоцин і циклосерин перешкоджають накопиченню цераміду і нормалізують гомеостаз глюкози в організмі. За допомогою аналогів цераміду показано, що в м'язовій тканині цераміди інгібують важливу ланку сигналінгу інсуліна, а саме – протеїнкіназу Akt/ПКВ (ЄС 2.7.11.1) за допомогою пригнічення транслокації ферменту в плазматичну мембрану і/або дефосфорилювання протеїнкінази під дією протеїнфосфатази А2 (ЄС 3.1.3.16), що є мішенню цераміду в різних клітинах [335, 336]. Екзогенні гангліозиди GM3 інгібують фосфорилювання тирозину інсулінового рецептора і IRS-1 в адипоцитах 3T3 L1 [335]. Різні інгібітори синтеза глюкозілцерамідів [336, 337], також як і нокаут ферментів [338, 339] в клітинах м'язової тканини і печінки підсилюють стимуляцію

інсуліном фосфорилювання інсулінового рецептора, Akt/ПКВ і mTOR. У той же час, порушення синтеза і зниження вмісту СФМ, але не гангліозидів GM3 в печінці, м'язовій і жировій тканині, і плазматичних мембранах клітин печінки мишей, що характеризуються дефіцитом СФМсінтази 2 або другої субодиниці СПТ, є важливою причиною збільшення чутливості тканин до дії інсуліна [340]. Важливим є те, що вміст цераміду підвищується в печінці і м'язовій тканині, але не змінюється в плазматичних мембранах клітин печінки СФМсінтаза-дефіцитних тварин і суттєво знижується в мембранах СПТ-нокаутних мишей. З огляду на ці дані і результати інших досліджень [341, 342] можна припустити, що цераміди і гангліозиди не є єдиними медіаторами у розвитку інсулінорезістентності в тканинах мішенях.

Підвищення вмісту СФМ в плазматичних мембранах адипоцитів і еритроцитів передує розвитку резистентності до дії інсуліна і гіперінсулеміі у пацієнтів з ожирінням [343]. Дефіцит СФМсінтази 2 і порушення синтеза СФМ у нокаутних тварин запобігає індукції під дією високожирової дієти ожиріння і інсулінорезистентності [342]. Пригнічення експресії СФМсінтази за допомогою siRNA також знижує в клітинах HepG2 вміст великих ліпідних крапель і триацилгліцерина в печінці лептин-дефіцитних мишей ob/ob. СФМсінтаза 2 локалізована в ліпідних мікродоменах і частково асоційована з транспортером жирних кислот – CD36/FAT і кавеоліном 1. Оскільки СФМсінтаза 2 модулює вміст СФМ в ліпідних платформах, автори роблять висновок, що саме конформаційні зміни мембран опосередковують участь ферменту в регуляції процесу ожиріння і діабету 2 типу. З огляду на те, що СФМ є компонентом ліпідних рафт, які відіграють важливу роль в компартменталізації інсулінового сигналінгу, можна вважати, що зміна вмісту СФМ і зміна впорядкованості ліпідного бішару плазматичних мембран є важливою причиною порушення сигнальної трансдукції інсуліна.

В даний час залишаються невирішеними питання які саме сфінголіпіди і порушення яких ланок метаболізму сфінголіпідів грають ключову роль в розвитку інсулінорезистентності в клітинах печінки в старості. Зважаючи на це метою цієї роботи було вивчення дії специфічних інгібіторів ферментів синтеза і деградації

СФМ і цераміда на здатність старих клітин печінки адекватно відповідати на дію інсуліна.

Застосовувані в роботі інгібітори обміну сфінголіпідів не чинили істотного впливу на життєздатність клітин печінки (Рис. 3.45).

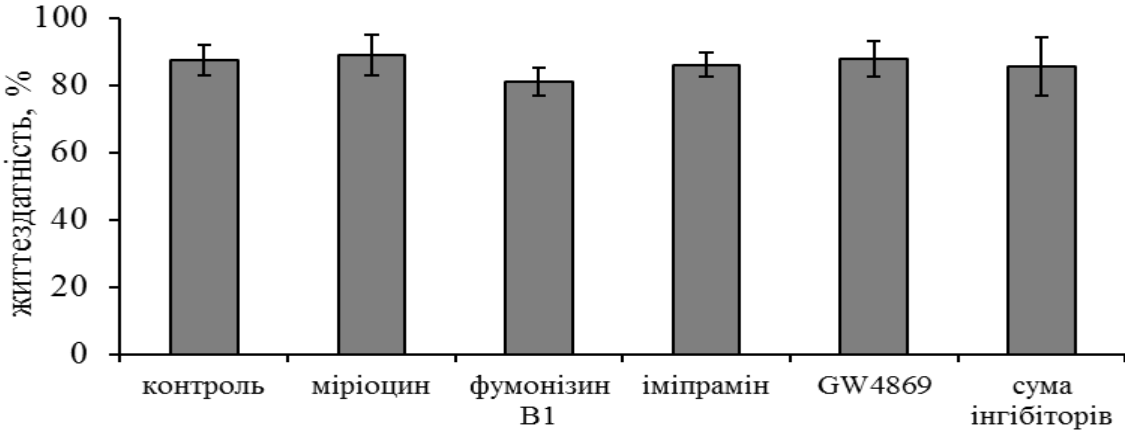

Рис. 3.45 Вплив інгібіторів метаболізму сфінголіпідів на життєздатність гепатоцитів щурів 24-місячного віку

Встановлено, що в клітинах печінки щурів в старості істотно підвищувався вміст знову синтезованого в присутності [^{14}C]пальмітіновой кислоти цераміда і СФМ в клітинах печінки (Рис. 3.46).

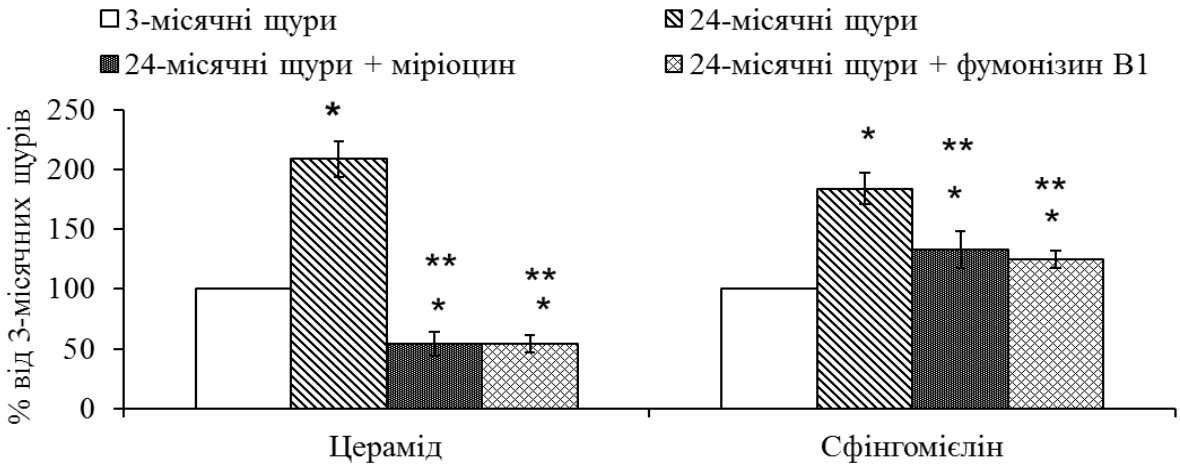

Рис. 3.46 Вплив міріоцина і фумонізина B1 на синтез цераміда і сфінгомієліна в ізольованих гепатоцитах 24-місячних щурів щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з 3-місячними щурами, $p<0,05$; ** – статистично значимо порівняно з контролем – 24-місячними щурами, $p<0,05$

З метою з'ясування можливого механізму вікових змін змісту цераміда і СФМ в гепатоцитах вивчали дію інгібіторів синтеза і деградації сфінголіпідів на гепатоцити старих щурів.

Встановлено, що інгібітори метаболізму сфінголіпідів викликали значні зміни вмісту СФМ і цераміду в гепатоцитах старих 24-місячних щурів (Рис. 3.46). Так, додавання в культуральне середовище специфічного інгібітора ключового ферменту синтеза сфінголіпідів міріоцина [297] або інгібітору синтеза цераміду фумонізина B1 [345] пригнічувало синтез цераміду і СФМ в присутності [^{14}C]пальмітинової кислоти (Рис. 3.46). У той же час, дослідженнями, раніше проведеними в нашій лабораторії, було показано, що інгібітори синтеза сфінголіпідів міріоцин і фумонізин B1 знижували вміст цераміду в гепатоцитах старих тварин [221], проте ці зміни не досягали рівня сфінголіпіда у молодих щурів. Згідно з отриманими даними в цій роботі можна припустити, що в старості шлях синтеза цераміду *de novo* не є основним, через що на наступному етапі даного дослідження були розглянуті інші шляхи утворення цераміду, зокрема участь в цьому процесі СФМаз (Рис. 3.47).

Для з'ясування ролі СФМаз в зміні вмісту СФМ і цераміду в клітинах печінки в старості вивчали дію функціонального інгібітору кислої СФМази іміпраміна [310] і неконкурентного інгібітора нейтральної СФМази GW4869 [309]. Встановлено, що іміпрамін пригнічує активність кислої СФМази, але не впливає на нейтральну СФМазу в гепатоцитах (Рис. 3.47 А). Внесення в середовище інкубації клітин іміпраміна знизило вміст цераміду в гепатоцитах старих щурів [221], але не до рівня молодих тварин. Отримані результати свідчать про те, що іміпрамін надає специфічну дію на активність кислої СФМази і утворення цераміду в результаті активації кислої СФМази в клітинах печінки старих щурів.

Інкубація гепатоцитів, виділених з печінки 24-місячних тварин, в присутності GW4869 супроводжувалася пригніченням активності нейтральної СФМази, але не кислого ферменту (Рис. 3.47 Б).

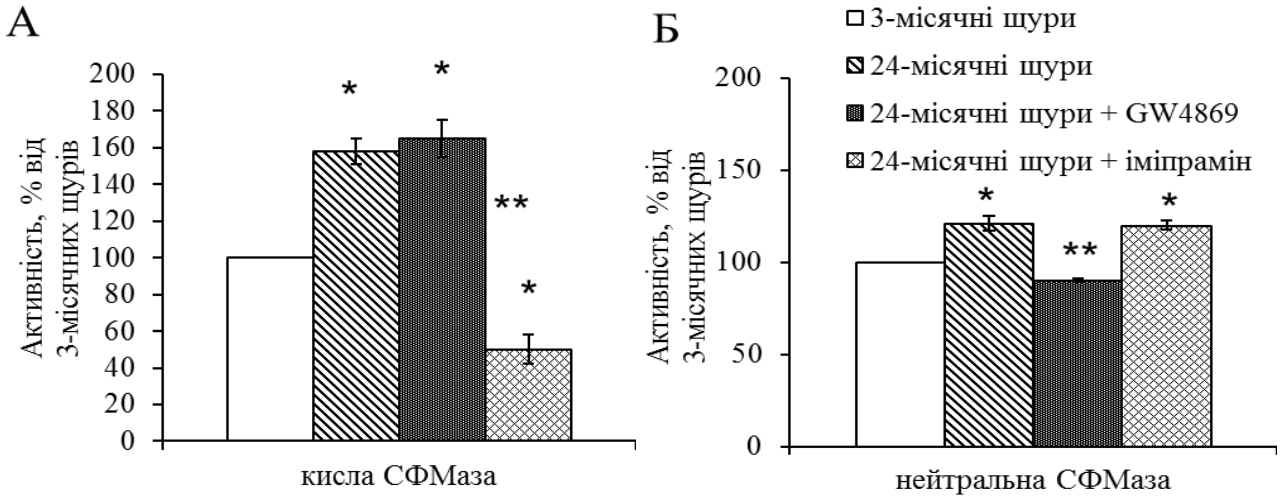

Рис. 3.47 Вплив іміпраміна і GW4869 на активність кислої і нейтральній сфінгомієліназ в ізольованих гепатоцтах 24-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з 3-місячними щурами, $p<0,05$; ** – статистично значимо порівняно з контролем – 24-місячними щурами, $p<0,05$

Встановлено, що вміст [^{14}C]цераміда в клітинах 3- і 24-місячних щурів і «старих» гепатоцитах, преінкубованих за наявності [^{14}C]пальмітату і суміші всіх інгібіторів обміну сфінголіпідів, призвело до зниження рівня знову синтезованого цераміда практично до рівня молодих тварин (Рис. 3.48).

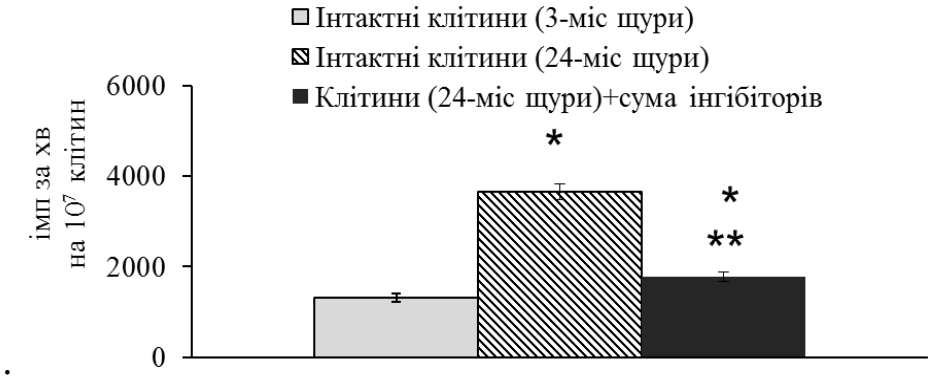

Рис. 3.48 Вплив суми інгібіторів метаболізму сфінголіпідів (міріоцин, фумонізин В1, іміпрамін, GW4869) на вміст [^{14}C]цераміда в гепатоцитах старих щурів

Примітка. * – статистично значимо порівняно з інтактними гепатоцитами 3-місячних щурів, $p<0,05$; ** – статистично значимо порівняно з інтактними клітинами печінки 24-місячних щурів, $p<0,05$

Цераміди займають центральне місце в синтезі всіх складних сфінголіпідів, локалізовані в мембранах клітин і накопичуються в клітинах у відповідь на дію стресу і в старості [18, 20, 328]. Існує три основних шляхи продукції церамідів в клітинах. Найбільш вивченим є шлях синтеза цераміду *de novo*, який починається реакцією конденсації серина і пальмитоїл-СоА і утворенням 3-кетосфінганіна. Ця реакція каталізується швидкість лімітуючим ферментом – СПТ. Подальша активація 3-кетосфінганінредуктази (ЄС 1.1.1.102), (дигідро)церамідсінтази (ЄС 2.3.1.24) і (дигідро)цераміддесатурази (ЄС 3.4.24.81) приводить до перетворення цих проміжних продуктів в церамід. Гідроліз СФМ – наступний шлях утворення цераміду. Різні СФМази, що розрізняються по оптимуму pH і локалізації в клітині, гідролізують СФМ, що призводить до вивільнення фосфорилхоліну і накопичення цераміду. З огляду на те, що СФМ є найбільш поширеним сфінголіпідом в клітинах ссавців, можна вважати, що СФМаза-залежний шлях грає важливу роль в накопиченні цераміду. Однак і інші складні сфінголіпіди можуть бути джерелом цераміду в клітинах. Концентрація цераміду в клітинах може збільшуватися в результаті деградації глюкозилцераміда і церамід-1-фосфату або в процесі реацилювання сфінгозина.

Показано важливу роль церамідів в порушенні ФЛД-залежного сигналінгу інсуліна в клітинах печінки старих щурів [221]. Встановлено, що при культивуванні гепатоцитів старих щурів 24-місячного віку в присутності інгібіторів *de novo* синтеза сфінголіпідів – міріоцина і фумонізина B1 – відбувається часткове відновлення індукованої інсуліном активації ФЛД, однак інтенсивність цього процесу не повертається до рівня молодих тварин (Рис. 3.49).

Крім того, внесення в середовище інкубації клітин печінки старих тварин інгібіторів сфінгомієліназної активності – іміпраміна і GW4869 – також лише частково відновлює гормон-залежну активацію ФЛД (Рис. 3.49). У той же час, поєднана дія всіх вивчених інгібіторів обміну сфінголіпідів приводить до повного відновлення індукції інсуліном активації ФЛД (Рис. 3.49).

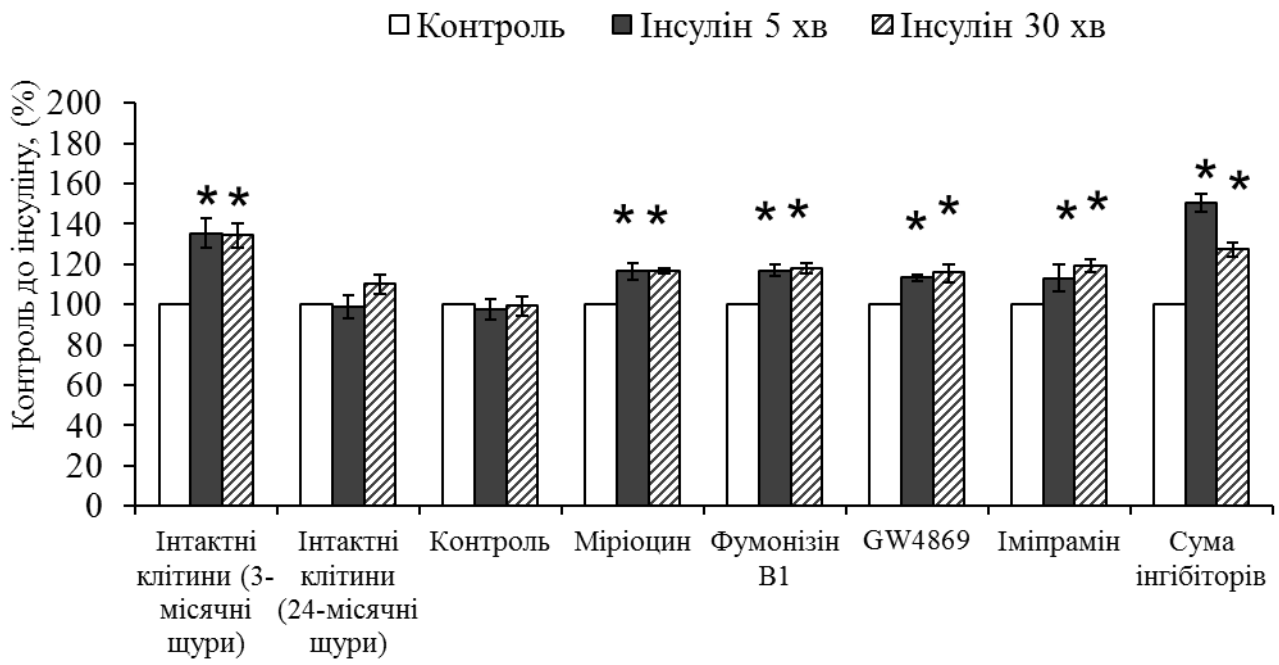

Рис. 3.49 Вплив інгібіторів метаболізму сфінголіпідів (міріоцин, фумонізин В1, GW4869, іміпраміна або сума всіх інгібіторів) на активацію інсуліном фосфоліпази Д в гепатоцитах 24-місячних щурів

Примітка. * – статистично значимо щодо контролю до інсуліна (0,9 % NaCl), $p<0,05$

У даній роботі встановлено, що при культивуванні клітин печінки старих тварин в присутності одного з інгібіторів синтеза або деградації сфінголіпідів відбувається зниження рівня цераміду, однак його вміст не відновлюється до рівня в гепатоцитах дорослих щурів. У той час, як в умовах поєднаної дії міріоцина, фумонізина В1, іміпраміна і GW4869 відбувалася корекція вмісту цераміду в старих клітинах печинки до рівня молодих щурів. Отримані дані узгоджуються з раніше отриманими результатами про зміну різних шляхів обміну сфінголіпідів в старих клітинах і свідчать про важливу роль кислої і нейтральної СФМаз, і синтеза сфінголіпідів *de novo* в накопиченні цераміду в гепатоцитах в старості. Крім того, зниження вмісту цераміду в результаті впливу індивідуальних інгібіторів синтеза сфінголіпідів або СФМазної активності супроводжується лише частковим відновленням чутливості до дії інсуліна ФЛД. Одночасне пригнічення всіх основних

шляхів утворення цераміду за допомогою суми всіх інгібіторів повністю відновлює чутливість ФЛД-залежного сигнального шляху до дії інсуліна.

3. 4. 2 Вплив інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієліназ на регуляцію інсуліном метаболізма глюкози

Раніше було встановлено підвищення вмісту церамідів в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі 24-місячних щурів (розділ 3.2). У старості в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі щурів відбувається пригнічення інсулін-залежної активації ФЛД і стимульованого гормоном обміну глюкози (розділ 3.2). Підвищення концентрації цераміду і порушення активації інсуліном ФЛД в тканинах-мішенях гормону спостерігалося при моделюванні стану порушення чутливості клітин до дії гормонального стимула у молодих 3-місячних щурів за допомогою дієти з високим вмістом насичених жирних кислот (розділ 3.2). Крім того, при моделюванні стану порушення чутливості клітин печінки, діафрагми і неокортексу у молодих 3-місячних щурів за допомогою екзогенного С2-цераміду або попередника синтеза ендогенних церамідів – пальмітинової кислоти, або індукторів накопичення цераміду – паклітакселу та доксорубіцину відзначено підвищення вмісту ендогенних церамідів і пригнічення інсулін-залежної активації ФЛД (розділ 3.2). ФЛД грає важливу роль в процесах везикулярного транспорту, в тому числі і інсулін-залежного транспорту глюкози клітинами [12].

Церамід є інгібітором ряду сигнальних молекул, що беруть участь в реалізації ефектів інсуліна в клітинах і тканинах-мішенях. Показано, що підвищений вміст цераміду в м'язових клітинах, клітинах печінки, адипоцитах супроводжується пригніченням фосфорилювання Akt/ПКВ, порушенням інсулін-залежного поглинання глюкози і розвитком інсулінорезистентності [179, 311-315, 346-349]. Також церамід пригнічує активацію ФЛД.

Показано, що при дії міріоцина – специфічного інгібітора СПТ, ключового ферменту синтеза сфінголіпідів – на гепатоцити старих 24-місячних щурів спостерігалось зниження вмісту церамідів і часткове відновлення активації

інсуліном ФЛД (розділ 3.2). Зниження рівня церамідів в інсулінорезистентних тканинах за допомогою фізичних навантажень або за допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів (міріоцина, фумонізина В1) супроводжується відновленням чутливості клітин до інсуліна і інсулін-залежного обміну глюкози [313, 314].

З огляду на важливу роль цераміду в пригніченні ключових молекул-учасниць сигнального каскаду інсуліна і в розвитку інсулінорезистентності клітин-мішеней, на даному етапі дослідження важливим є вивчення впливу специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і сфінгомієлінази на інсулін-залежний поглинання глюкози клітинами печінки старих 24-місячних щурів.

Встановлено, що в гепатоцитах 24-місячних щурів інсулін не викликає статистично значущих змін в поглинанні міченої глюкози і утворенні глікогена клітинами в порівнянні з гепатоцитами молодих 3-місячних щурів (Рис. 3.50).

Внесення в середовище інкубації клітин печінки старих тварин інгібітора СПТ 1 міріоцина і інгібітору кислої СФМази іміпраміна супроводжувалось частковим відновленням інсулін-залежного поглинання міченої глюкози (Рис. 3.50) на 30 % і 15 %, відповідно.

При внесенні в середовище інкубації клітин печінки суми всіх інгібіторів встановлено підвищення поглинання глюкози на 90 % в порівнянні з інтактними 24-місячними гепатоцитами. Ця зміна склала 76 % від рівня поглинання глюкози гепатоцитами 3-місячних щурів. Holland і співавтори показали, що гальмування синтеза цераміду *de novo* шляхом фармакологічного пригнічення СПТ1 може запобігати інсулінорезистентності, яка викликана кортикостероїдами, насиченими жирами і в генетичній моделі ожиріння [269].

Крім того, фармакологічне інгібування СПТ1 в м'язових клітинах людини запобігає інгібуванню стимульованого інсуліном синтеза глікогена індукованого пальмітинової кислотою [198]. Також при моделюванні ожиріння та інсулінорезистентності у мишей за допомогою високожирової дієти було показано,

що в литковому м'язі мишей, які страждають ожирінням, міріоцин відновлює фосфорилювання Akt/ПКВ і GSK3β інсуліном [296].

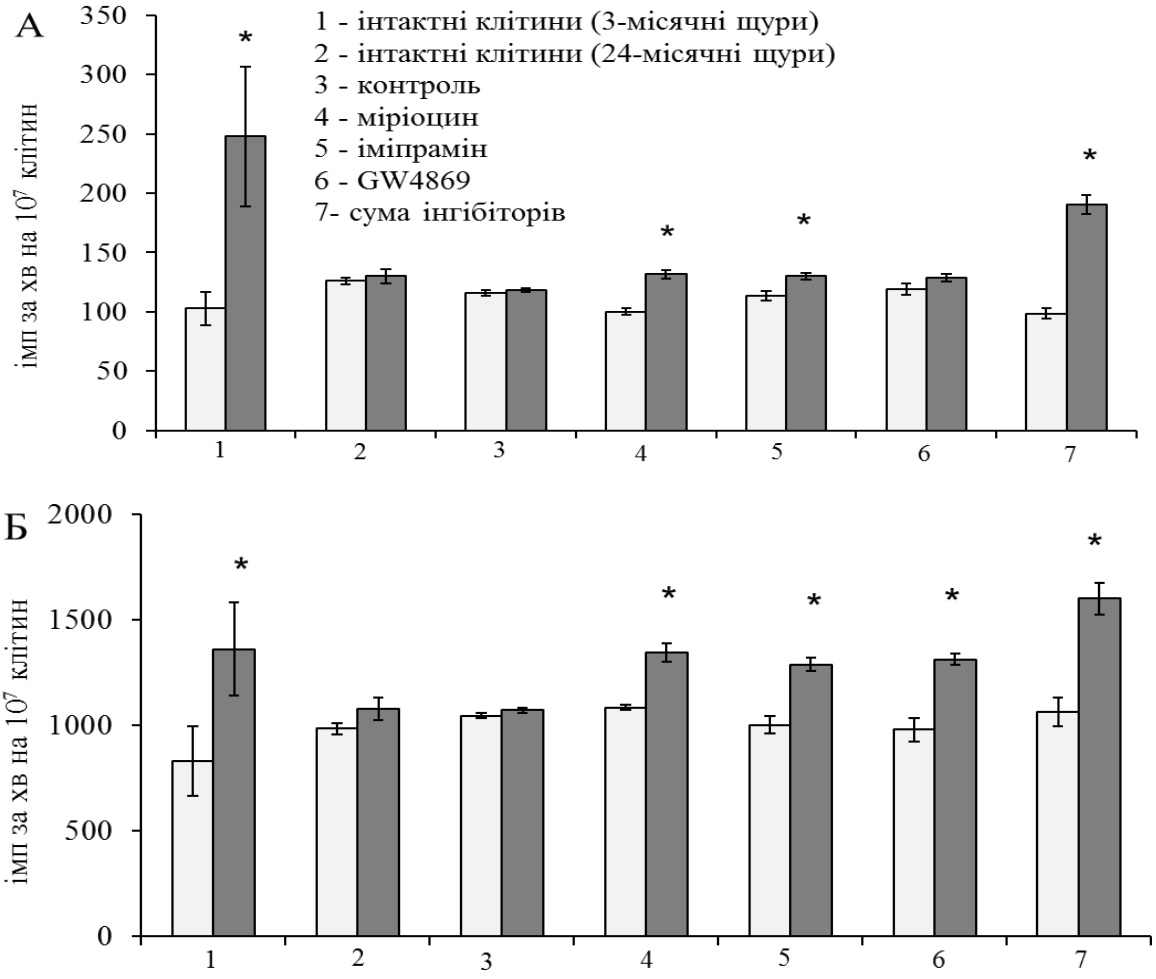

Рис. 3.50 Вплив міріоцина, іміпраміна, GW4869 і суми інгібіторів на інсулін-залежне поглинання глюкози (А) і утворення глікогена (Б) гепатоцитами 24-місячних щурів

Примітки:

1) Білі колонки – контроль до інсуліна (0,9% NaCl), темно-сірі колонки – інсулін

2) * – статистично значимо порівняно з контролем до інсуліна (0,9% NaCl), $p \leq 0,05$

Посилення обміну і накопичення цераміду спостерігається при старінні і стресових впливах в різних типах клітин [344, 346, 347]. Показано, що в клітинах печінки щурів старіння супроводжується зниженням вмісту СФМ і посиленням

активності кислої і нейтральної СФМаз [18, 21]. Показано, що в гепатоцитах щурів активація нейтральної СФМзи фактором некрозу пухлин альфа супроводжується пригніченням утворення глікогена клітинами [348]. Крім того, ці автори показують, що гальмування процесу синтеза глікогена СФМазой не залежить від утворення цераміду ферментом, а регулюється безпосередньо СФМазой. З огляду на цей факт, можна припустити в умовах сьогодення експерименту пригнічення СФМаз специфічними інгібіторами сприяє відновленню індукованого інсуліном утворення глікогена.

З метою з'ясувати, які шляхи утворення ендогенних церамідів в тканині неокортексу задіяні в старості на наступному етапі цього дослідження були використані специфічні інгібітори синтеза сфінголіпідів і СФМаз. Встановлено, що в неокортексі старих щурів статистично значимо знижують вміст цераміду – інгібітор СПТ 1 (міріоцин), інгібітор нейтральної СФМази (GW4869). Іміпрамін – інгібітор кислої СФМази не впливає на вміст цераміду в неокортексі старих тварин. У той же час, максимальний ефект на вміст церамідів надає сума всіх використаних інгібіторів (Рис. 3.51).

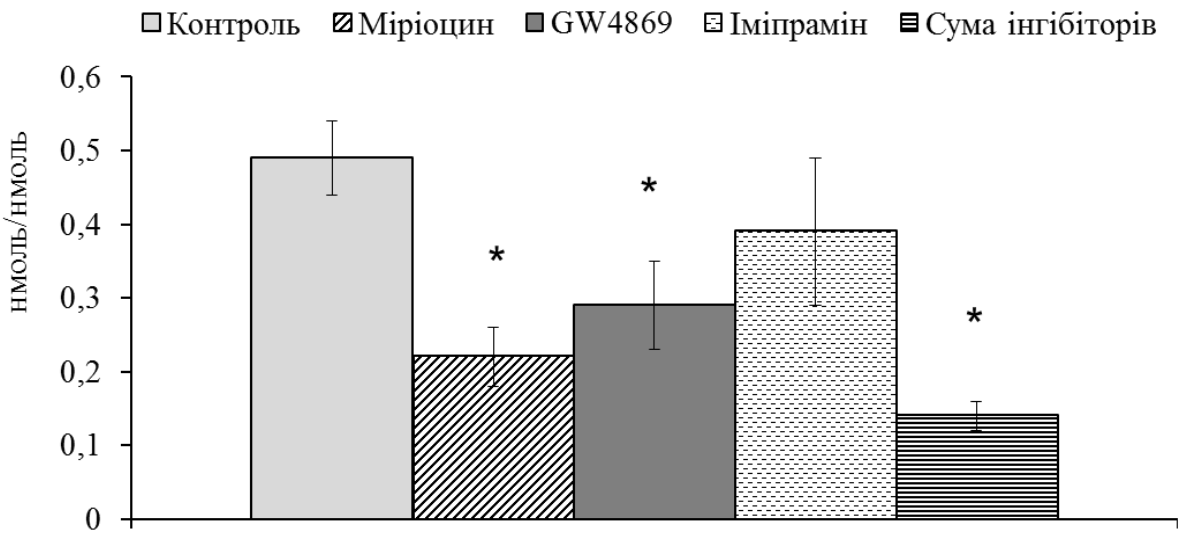

Рис. 3.51 Вплив інгібіторів синтеза сфінголіпідів на утримання церамідів в неокортексі щурів 24-місячного віку

Примітка. * – статистично значимо порівняно з контролем, $p \leq 0,05$

Раніше в нашій лабораторії було показано, що в клітинах печінки 24-місячних тварин ФЛД-залежна ланка сигнального каскаду інсуліна не активується у відповідь на дію гормону [221]. Внесення в середовище інкубції гепатоцитів старих щурів інгібіторів обміну сфінголіпідів відновлює відповідь клітин на дію інсуліна [221]. Інкубування тканини неокортексу 24-місячних щурів за наявності інгібітора синтеза цераміду (міріоцина), інгібітора нейтральної СФМази (GW4869), інгібітора кислої СФМази (іміпраміна) і суми інгібіторів відновлює активацію інсуліном ФЛД порівняно з контрольною тканиною (Рис. 3.52).

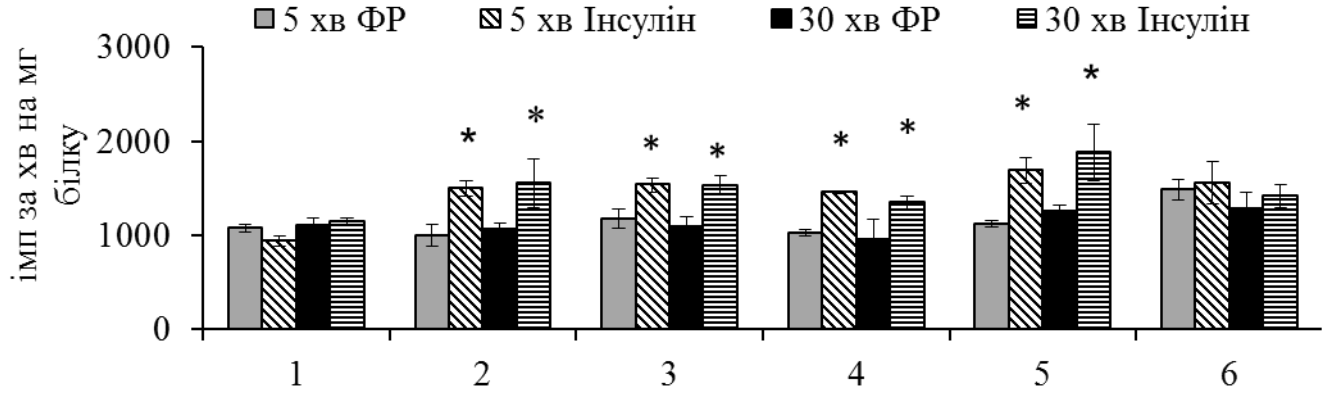

Рис. 3.52 Вплив інгібіторів метаболізму сфінголіпідів і галопеміда на індукцію інсуліном активації фосфоліпази Д в неокортексі 24-місячних щурів

Примітки:

1) 1 – контроль; 2 – міріоцин; 3 – GW4869; 4 – іміпрамін; 5 – сума інгібіторів; 6 – сума інгібіторів + галопемід (300 нМ)

2) * – статистично значимо порівняно з 0,9 % NaCl, $p \leq 0,05$

На клітинах меланоми було показано, що іміпрамін може впливати на активацію ФЛД не тільки через пригнічення накопичення церамідів, а шляхом посилення експресії ферменту в клітинах [267]. З огляду на ці дані, можна припустити, що в даних умовах експерименту іміпрамін не впливає на вміст церамідів в неокортексі, але може посилювати експресію ФЛД в нервових клітинах.

Інкубація тканини неокортексу 24-місячних щурів за наявності інгібітора синтеза церамідів (міріоцина) або інгібіторів СФМаз (GW4869, іміпраміна) не

робить статистично значущого впливу на зміни базального рівня стимульованого інсуліном поглинання глюкози (Рис. 3.53).

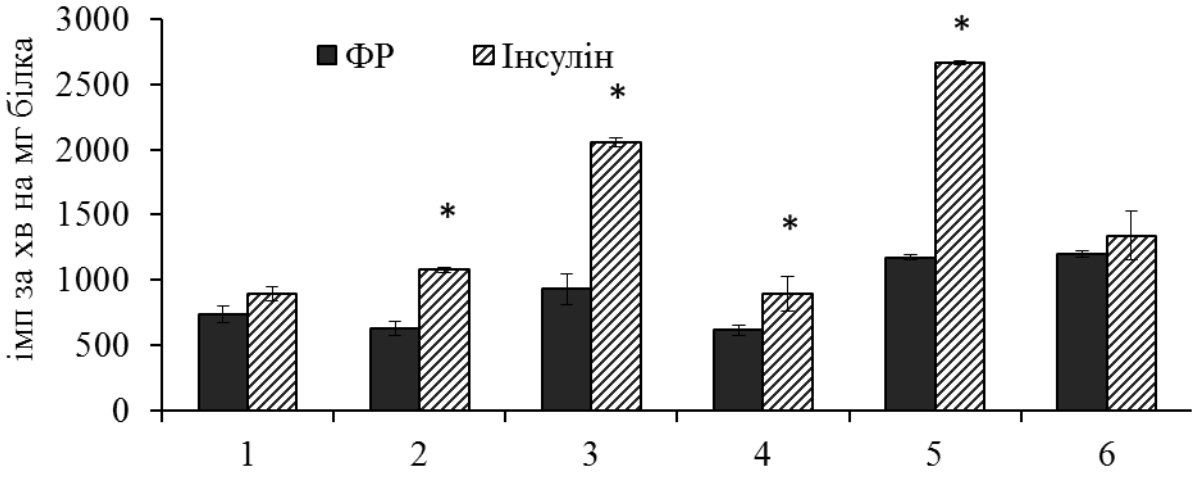

Рис. 3.53 Вплив інгібіторів метаболізму сфінголіпідів і галопеміда на активацію інсуліном поглинання глюкози неокортексом 24-місячних щурів

Примітки:

1) 1 – контроль; 2 – міріоцин; 3 – GW4869; 4 – іміпрамін; 5 – сума інгібіторів; 6 – сума інгібіторів + галопемід (300 нМ)

2) * – статистично значимо порівняно з 0,9 % NaCl, $p \leq 0,05$

Міріоцин підвищує стимульований інсуліном вміст поглинання глюкози на 50% порівняно з контрольною тканиною (Рис. 3.4.9). GW4869 збільшує поглинання глюкози на 100 % (Рис. 3.53). Сума всіх інгібіторів підсилює поглинання глюкози тканиною неокортексу на 105 % (Рис. 3.53).

Крім того, встановлено, що внесення в середовище інкубації тканини неокортексу 24-місячних щурів інгібітора ФЛД, галопеміда, перед додаванням суми інгібіторів метаболізму сфінголіпідів, редукує активацію ФЛД (Рис. 3.52) і пригнічує стимульоване інсуліном поглинання глюкози (Рис. 3.53).

Церамід є відомим інгібітором сигналінгу інсуліна в клітинах чутливих до дії гормону [160, 293]. Сфінголіпід шляхом дефосфорилювання, пригнічує активацію і транслокацию Akt/ПКВ в клітинну мембрану, тим самим пригнічуючи синтез глікогена в клітинах [233]. ФЛД є мішенню дії цераміду в клітинах [210, 211]. Церамід пригнічує активність ФЛД різними шляхами: пригнічуючи активність ПКС

і мономерних G-білків [249], шляхом даунрегуляції транскрипції гена ФЛД [243] або безпосередньо впливаючи на каталітичне ядро ферменту [251]. Коротколанцюгові екзогенні С2- і С6-цераміди пригнічують мітогенні ефекти ФЛД в фібробластах [249]. У попередніх роботах нашої лабораторії було встановлено, що внесення в середовище інкубації гепатоцитів екзогенного С6-цераміду, вибірково знижує активність і експресію ФЛД1 [185], редукує базальну і стимульовану інсуліном активність ФЛД і метаболізм глюкози в клітинах печінки [239]. Показано, що в клітинах коротколанцюгові екзогенні цераміди можуть піддаватися гідролізу до сфінгозина і включатися в синтез довголанцюгових церамідів, тим самим викликаючи підвищення рівня ендогенних довголанцюгових церамідів [210]. Внесення в середовище інкубації тканини неокортексу молодих щурів синтетичного С6-цераміду викликало підвищення вмісту мічених ^{14}С-пальмітинової кислотою ендогенних церамідів. Крім того, збільшення рівня ендогенних церамідів супроводжувалося пригніченням інсулін-залежної ФЛД і поглинання глюкози в нервовій тканині. У той же час запобігання накопичення ендогенних церамідів за допомогою специфічного інгібітору синтеза сфінголіпідів, фумонізина В1, скасовувала інгібуючу дію С6-цераміду на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози. Таким чином, внесення в середовище інкубації тканини неокортексу щурів екзогенних церамідів призводить до індукції накопичення довголанцюгових ендогенних церамідів, які, ймовірно, опосередковують дію синтетичних сфінголіпідів на ФЛД-залежну ланку сигнального каскаду інсуліна.

Раніше було показано, що в неокортексі і гіпокампі 24-місячних щурів у порівнянні з молодими 3-місячними тваринами підвищується вміст цераміду [329]. Крім того, показано, що поряд з підвищенням рівня церамідів в тканині неокортексу щурів в старості, відбувається також зниження чутливості ФЛД до дії інсуліна [199] і скасування стимулюючої дії гормону на процеси поглинання глюкози і синтеза глікогена в нервовій тканині [170]. Експериментальне збільшення вмісту церамідів в клітинах печінки за допомогою фармакологічних індукторів накопичення сфінголіпідів – доксорубіцину і паклітакселу – викликає пригнічення стимульованих

інсуліном активації ФЛД і поглинання глюкози [198]. Застосування інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз запобігає накопиченню ендогенних церамідів і редукуючій дії на активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози в клітинах печінки. Крім того, в клітинах печінки щурів 24-місячного віку інгібітори синтеза сфінголіпідів *de novo* (міріоцин, фумонізин В1) і інгібітори СФМаз (GW4869, іміпрамін) відновлюють чутливість гепатоцитів до дії інсуліна, що проявляється в активації поглинання глюкози і синтеза глікогена при стимулюванні клітин гормоном [198]. Застосування інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз в тканині неокортексу 24-місячних щурів знижує вмісту ендогенних церамідів і відновлює активацію інсуліном ФЛД і поглинання глюкози в неокортексі. Пригнічення ФЛД специфічним інгібітором, галопемідом, після відновлення чутливості нервової тканини за допомогою суми всіх інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз, показує, що ФЛД є ключовою ланкою сигнального шляху інсуліна і мішенню для дії ендогенних церамідів в неокортексі щурів.

Таким чином, в даній роботі встановлено, що в гепатоцитах 24-місячних щурів пригнічення утворення цераміду за допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз підвищує чутливість до інсуліна процесу поглинання глюкози. При цьому найбільш вираженою дією володіють інгібітор СПТ1 – міріоцин і інгібітор кислої СФМази – іміпрамін, а також сума всіх інгібіторів. Можна припустити, що важливу роль в пригніченні обміну глюкози клітинами печінки в старості відіграють як знову синтезовані цераміди, так і СФМази. Крім того, встановлено, що регуляція інсуліном активності ФЛД і метаболізму глюкози в неокортексі чутлива до внутрішньоклітинного вмісту антагоніста сигнальних шляхів інсуліна цераміда. Модуляція вмісту внутрішньоклітинних церамідів за допомогою специфічних інгібіторів метаболізму сфінголіпідів і СФМаз в неокортексі 24-місячних щурів супроводжується відновленням відповіді нервової тканини до дії інсуліна, що проявляється в активації ФЛД-чутливої ланки сигнального каскаду гормону, а також посиленням поглинання глюкози тканиною.

Висновки до розділу 3

Проведено аналіз отриманих даних і встановлено, що що ФЛД грає важливу роль в сигналінгу інсуліна в різних типах клітин- і тканин-мішеней гормону. ФЛД, що активується після ФІ3-кінази/Akt/ПКВ, є дуже чутливою до вмісту цераміду як в первинних гепатоцитах, так і в неокортексі. Пригнічення активації інсуліном ФЛД і поглинання глюкози за допомогою специфічного інгібітора галопеміда доводить участь ФЛД в процесі регуляції інсуліном метаболізму глюкози в клітинах печінки та неокортексі щурів. Модуляція активності ФЛД в клітинах за допомогою специфічних інгібіторів може бути зручним інструментом для зміни чутливості гепатоцитів до дії інсуліна.

Встановлено, що у старості відбувається порушення активації ФЛД-залежного ланки сигнального каскаду інсуліна в клітинах печінки, м'язовій тканині (діафрагмі) і тканині неокортексу. В діафрагмі, печінці і неокортексі 3-місячних щурів дієта з високим вмістом насичених ЖК індукує синтез вільних ЖК і їх похідних ДАГ, ТАГ і цераміду та супроводжується порушенням активації інсуліном ФЛД. При моделюванні стану резистентності до дії інсуліна за допомогою екзогенних С2-цераміду і пальмітинової кислоти відбувається зміна ліпідного спектра тканин-мішеней інсуліна – підвищення вмісту цераміду. Це супроводжується скасуванням активації ФЛД при короткочасному впливі інсуліна. Використання інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз показало, що саме знову синтезований церамід пригнічує ФЛД-залежну ланку сигнального шляху інсуліна при моделюванні стану резистентності в клітинах печінки молодих щурів за допомогою пальмітинової кислоти і С2-цераміду та індукторів накопичення церамідів протипухлинних препаратів – паклітакселу і доксорубіцину.

Було розглянуто вікові особливості стимулювання інсуліном процесів поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах печінки, діафрагмі і неокортексі щурів 3- і 24-місячного віку. Встановлено порушення стимулювання гормоном процесів обміну глюкози, яке пов’язане з віковим підвищенням вмісту церамідів і блокуванням процесу активації ФЛД. Моделювання вікового підвищення

вмісту цераміду в клітинах печінки, діафрагми і неокортексі щурів за допомогою ендогенних попередників (пальмітинової кислоти і С2-цераміду) супроводжується зниженням чутливості тканин-мішеней до дії інсуліна. Пригнічення різних шляхів утвроення цераміду відновлює чутливість клітин печінки до дії інсуліна при моделюванні стану резистентності за допомогою попередників синтеза і індукторів утворення сфінголіпіда цераміда. Використання специфічного інгібітора ФЛД – галопеміда – на тлі підвищення і корекції рівня цераміду за допомогою цитотоксичного препарату та інгібіторів обміну сфінголіпідів, підтверджує ключову роль ФЛД в процесі регуляції інсуліном обміну глюкози в клітинах печінки.

Вивчали дію специфічних інгібіторів ферментів синтеза і деградації сфінгомієліна і цераміда на чутливість клітин печінки та неокортексу до дії інсуліна. Встановлено, що при культивуванні клітин печінки старих та неокортексу тварин в присутності одного з інгібіторів синтеза або деградації сфінголіпідів відбувається зниження рівня цераміду, однак його вміст не відновлюється до рівня дорослих щурів. Зниження вмісту цераміду в результаті впливу індивідуальних інгібіторів синтеза сфінголіпідів або СФМазної активності супроводжується лише частковим відновленням чутливості до дії інсуліна ФЛД. Одночасне пригнічення всіх основних шляхів утворення цераміду за допомогою суми всіх інгібіторів повністю відновлює чутливість ФЛД-залежного сигнального шляху до дії інсуліна.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено [165, 167, 168, 169, 170, 183, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 209, 235, 236, 250, 254, 255, 274, 278, 288, 298, 305, 318].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі доведено, що ФЛД-залежна ланка сигнального каскаду інсуліна поряд зі стимульованим гормоном метаболізмом глюкози є чутливим до вікового і експериментально індукованого підвищення рівня ендогенних церамідів. Крім того, встановлено, що ефективним засобом корекції порушення чутливості клітин до дії гормональних стимулів в старості є модуляція вмісту церамідів за допомогою інгібіторів обміну сфінголіпідів, що є фармакологічними препаратами.

1. У клітинах печінки, діафрагмі та неокортексі молодих статевозрілих щурів під дією інсуліна відбувається активація ФХ-специфічної ФЛД. Пригнічення активності даного ферменту за допомогою інгібіторів ФІ3-кінази (вортманіна і LY294002) і інгібіторів Akt/ПКВ (АП7Гл і ЛЮ7Гл) свідчить про активацію інсулін-залежної ФЛД даунстрим від ФІ3-кінази і Akt/ПКВ, ключових учасників сигнального каскаду інсуліна, і знаходиться під їх контролем.

2. В процесі блокування специфічними інгібіторамі індукованої інсуліном активації ФІ3-кінази, ФЛД і Akt/ПКВ в клітинах печінки і неокортексі молодих щурів відбувається пригнічення ефектів інсуліна на метаболізм глюкози, що свідчить на користь ключової ролі ФЛД в реалізації дії гормону на процеси поглинання і запасання глюкози, наряду із ФІ3-кіназою і Akt/ПКВ.

3. У старості спостерігається пригнічення активації ФЛД-залежної ланки сигнального каскаду інсуліна і інсулін-залежного поглинання глюкози і утворення глікогена як в класичних тканинах-мішенях інсуліна (печинці і м’язовій тканині), так і в нервовій тканині, яка також знаходиться під дію гормону.

4. Додавання екзогенних попередників синтеза і накопичення цераміду – пальмітинової кислоти і С2-цераміду, або індукторів накопичення сфінголіпідів (паклітакселу або доксорубіцину) до інкубаційного середовища, супроводжується посиленням утворення цераміду в гепатоцитах, м’язовій тканині і неокортексі молодих щурів. Пригнічення в даних експериментальних умовах активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози і утворення глікогена, свідчить про

те, що ФЛД є ланкою чутливою до змін рівня церамідів в тканинах-мішенях дії інсуліна.

5. За допомогою специфічних інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз встановлено, що пальмітинова кислота і С2-церамід підвищують в клітинах- і тканинах-мішенях вміст цераміду за рахунок активації його синтеза *de novo*, в той час як паклітаксел і доксорубіцин індукують утворення цераміду як шляхом синтеза, так і за рахунок активації СФМаз.

6. Введення інгібіторів синтеза сфінголіпідів і СФМаз в середовище інкубації клітин і тканин з віковими, а також експериментально індукованими порушеннями чутливості клітин до дії інсуліна, супроводжується відновленням активації інсуліном ФЛД і процесів поглинання глюкози і утворення глікогена в клітинах- і тканинах-мішенях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Houston DK, Nicklas BJ, Zizza CA. Weighty Concerns: The Growing Prevalence of Obesity among Older Adults. J Am Diet Assoc [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 May 29];109(11):1886–95. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000282230901431X

2. Mozumdar A, Liguori G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. Diabetes Care [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2017 May 29];34(1):216–9. Available from: http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc10-0879

3. Jové M, Portero-Otín M, Naudí A, Ferrer I, Pamplona R. Metabolomics of human brain aging and age-related neurodegenerative diseases J Neuropathol Exp Neurol. [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2018 Okt 30];73(7):640–57. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24918636

4. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, et al. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. Nature [Internet]. 2013 Nov 6 [cited 2017 May 29];503(7474):59–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201279

5. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance -- A Mini-Review. Gerontology [Internet]. 2009 [cited 2017 May 29];55(4):379–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365105

6. Akintola AA, van Heemst D. Insulin, Aging, and the Brain: Mechanisms and Implications. Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 2015 Feb 6 [cited 2017 May 29];6:13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705204

7. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes [Internet]. 2002 Oct [cited 2017 May 29];51(10):2944–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351431

8. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science [Internet]. 2005 Jan 21 [cited 2017 May 29];307(5708):384–7. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1104343

9. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2006 Feb [cited 2017 May 29];7(2):85–96. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1837

10. Xu Y, Rubin BR, Orme CM, Karpikov A, Yu C, Bogan JS, et al. Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis. J Cell Biol [Internet]. 2011 May 16 [cited 2017 May 29];193(4):643–53. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201008135

11. Slaaby R, Du G, Altshuller YM, Frohman MA, Seedorf K. Insulin-induced phospholipase D1 and phospholipase D2 activity in human embryonic kidney-293 cells mediated by the phospholipase C gamma and protein kinase C alpha signalling cascade. Biochem J [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2017 May 29];351 Pt 3:613–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042115

12. 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 [Internet]. American Society for Cell Biology; 2005 Jun [cited 2017 May 29];16(6):2614–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772157

13. Su W, Yeku O, Olepu S, Genna A, Park J-S, Ren H, et al. 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. Mol Pharmacol [Internet]. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2009 Mar [cited 2017 May 29];75(3):437–46. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064628

14. Donchenko V, Zannetti A, Baldini PM. Insulin-stimulated hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C and phospholipase D in cultured rat hepatocytes. Biochim Biophys Acta [Internet]. 1994 Jul 21 [cited 2017 May 29];1222(3):492–500. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8038220

15. 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 [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2017 May 29];81(2):244–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948152

16. Peng X, Frohman MA. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles. Acta Physiol (Oxf) [Internet]. 2012 Feb [cited 2017 May 29];204(2):219–26. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-1716.2011.02298.x

17. Nelson RK, Frohman MA. Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D. J Lipid Res [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2015 Dec [cited 2017 May 29];56(12):2229–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926691

18. Lightle SA, Oakley JI, Nikolova-Karakashian MN. Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. Mech Ageing Dev [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2017 May 29];120(1–3):111–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087909

19. Rivas DA, McDonald DJ, Rice NP, Haran PH, Dolnikowski GG, Fielding RA. Diminished anabolic signaling response to insulin induced by intramuscular lipid accumulation is associated with inflammation in aging but not obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [Internet]. American Physiological Society; 2016 Apr 1 [cited 2017 May 29];310(7):R561-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26764052)

20. Babenko NA, Semenova YA. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats. Exp Gerontol [Internet]. 2010 May [cited 2017 May 29];45(5):375–80. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556510001014

21. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. Exp Gerontol [Internet]. 2006 Jan [cited 2017 May 29];41(1):32–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556505001968

22. Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Increase in diacylglycerol production by liver and liver cell nuclei at old age. Exp Gerontol [Internet]. 2003 Apr [cited 2017 May 29];38(4):441–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670631

23. Xia JY, Morley TS, Scherer PE. The adipokine/ceramide axis: key aspects of insulin sensitization. Biochimie [Internet]. NIH Public Access; 2014 Jan [cited 2017 May 29];96:130–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969158

24. Singh IN, Stromberg LM, Bourgoin SG, Sciorra VA, Morris AJ, Brindley DN. Ceramide inhibition of mammalian phospholipase D1 and D2 activities is antagonized by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Biochemistry [Internet]. 2001 Sep 18 [cited 2017 May 31];40(37):11227–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11551222

25. Gidwani A, Brown HA, Holowka D, Baird B. Disruption of lipid order by short-chain ceramides correlates with inhibition of phospholipase D and downstream signaling by FcεRI. J Cell Sci [Internet]. 2003 [cited 2017 May 29];116(15). Available from: http://jcs.biologists.org/content/116/15/3177.long

26. Abousalham A, Liossis C, O'Brien L, Brindley DN. Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. J Biol Chem [Internet]. 1997 Jan 10 [cited 2017 May 31];272(2):1069–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995404

27. Cockcroft S. Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2001 Oct [cited 2017 May 30];58(11):1674–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11706993

28. Gomez-Cambronero J, Julian. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. Scientific World Journal [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2010 Jul 7 [cited 2017 May 30];10:1356–69. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20623096

29. Oliveira TG, Di Paolo G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta [Internet]. NIH Public Access; 2010 Aug [cited 2017 May 30];1801(8):799–805. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399893

30. Zheng Y, Rodrik V, Toschi A, Shi M, Hui L, Shen Y, et al. Phospholipase D couples survival and migration signals in stress response of human cancer cells. J Biol Chem [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2006 Jun 9 [cited 2017 May 30];281(23):15862–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595654

31. Knoepp SM, Chahal MS, Xie Y, Zhang Z, Brauner DJ, Hallman MA, et al. Effects of Active and Inactive Phospholipase D2 on Signal Transduction, Adhesion, Migration, Invasion, and Metastasis in EL4 Lymphoma Cells. Mol Pharmacol [Internet]. 2008 [cited 2017 May 30];74(3). Available from: http://molpharm.aspetjournals.org/content/74/3/574.lon

32. Cai D, Netzer WJ, Zhong M, Lin Y, Du G, Frohman M, et al. Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. National Academy of Sciences; 2006 Feb 7 [cited 2017 May 30];103(6):1941–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449386

33. Vorland M, Holmsen H. Phospholipase D activity in human platelets is inhibited by protein kinase A, involving inhibition of phospholipase D1 translocation. Platelets [Internet]. Taylor & Francis; 2008 Jan 7 [cited 2017 May 30];19(4):300–7. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09537100801910838

34. Min Han J, Kim Y, Sung Lee J, Sup Lee C, Dae Lee B, Ohba M, et al. Localization of Phospholipase D1 to Caveolin-enriched Membrane via Palmitoylation: Implications for Epidermal Growth Factor Signaling. Mol Biol Cell [Internet]. 2002 [cited 2017 May 30];13:3976–88. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC133608/pdf/mk1102003976.pdf

35. Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, et al. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties

that provokes cytoskeletal reorganization. Curr Biol [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2017 May 30];7(3):191–201. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395408

36. Gao Q, Frohman MA. Roles for the lipid-signaling enzyme MitoPLD in mitochondrial dynamics, piRNA biogenesis, and spermatogenesis. BMB Rep [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 May 31];45(1):7–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281006

37. Ponting CP, Kerr ID. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: Identification of duplicated repeats and potential active site residues. Protein Sci [Internet]. Cambridge University Press; 1996 [cited 2017 May 30];5:914–22. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2143407/pdf/8732763.pdf

38. Choi S-Y, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. Nat Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2006 Nov 8 [cited 2017 May 30];8(11):1255–62. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb1487

39. Brühl A, Faldum A, Löffelholz K. Degradation of phosphatidylethanol counteracts the apparent phospholipase D-mediated formation in heart and other organs. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2003 Jul 21 [cited 2017 May 30];1633(2):84–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880867

40. Frohman MA, Sung T-C, Morris AJ. Mammalian phospholipase D structure and regulation. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids [Internet]. 1999 [cited 2017 May 30];1439(2):175–86. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198199000931

41. Sung T-C, Altshuller YM, Morris AJ, Frohman MA. Molecular Analysis of Mammalian Phospholipase D2*. [cited 2017 May 30]; Available from: http://www.jbc.org/content/274/1/494.full.pdf

42. Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, et al. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. Cell [Internet]. Elsevier; 1999 Nov

24 [cited 2017 May 30];99(5):521–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10589680

43. Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, et al. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. J Biol Chem [Internet]. 1995 Dec 15 [cited 2017 May 31];270(50):29640–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530346

44. Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. Cell [Internet]. 1993 Dec 17 [cited 2017 May 30];75(6):1137–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261513

45. Chen Y-G, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung T-C, Frohman MA. Phospholipase D Stimulates Release of Nascent Secretory Vesicles from the trans-Golgi Network. J Cell Biol [Internet]. 1997 [cited 2017 May 30];138(3):495–504. Available from: http://www.jcb.org

46. Singer WD, Brown HA, Jiang X, Sternweis PC. Regulation of Phospholipase D by Protein Kinase C Is Synergistic with ADP-ribosylation Factor and Independent of Protein Kinase Activity*. [cited 2017 May 30]; Available from: http://www.jbc.org/content/271/8/4504.full.pdf

47. Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, et al. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. J Biol Chem [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2017 May 31];272(6):3860–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013646

48. Zhang Y, Altshuller YM, Hammond SM, Hayes F, Morris AJ, Frohman MA. Loss of receptor regulation by a phospholipase D1 mutant unresponsive to protein kinase C. EMBO J [Internet]. 1999 Nov 15 [cited 2017 May 31];18(22):6339–48. Available from: http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/18.22.6339

49. Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Lavie Y, Tang X. Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. Biochim Biophys Acta [Internet]. 1999 Jul 30 [cited 2017 May 30];1439(2):245–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425399

50. Toda K, Nogami M, Murakami K, Kanaho Y, Nakayama K. Colocalization of phospholipase D1 and GTP-binding-defective mutant of ADP-ribosylation factor 6 to endosomes and lysosomes. FEBS Lett [Internet]. 1999 Jan 15 [cited 2017 May 30];442(2–3):221–5. Available from: http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2898%2901646-9

51. Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D. Intracellular Localization of Phospholipase D1 in Mammalian Cells. Mol Biol Cell [Internet]. 2001 [cited 2017 May 30];12:943–55. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC32278/pdf/mk000943.pdf

52. Vitale N. Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2 is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. Biochem Soc Trans [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2017 May 31];38(Pt 1):167–71. Available from: http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0380167

53. Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, Thompson NT, et al. Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. Curr Biol [Internet]. Elsevier; 1998 Jul 2 [cited 2017 May 30];8(14):835–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663393

54. Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, et al. Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. J Cell Biol [Internet]. 2003 [cited 2017 May 30];162(2). Available from: http://jcb.rupress.org/content/162/2/305.long

55. Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ. Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. J Biol Chem

[Internet]. 2004 Jun 25 [cited 2017 May 30];279(26):27534–41. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M403012200

56. Du G, Huang P, Liang BT, Frohman MA. Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis. Mol Biol Cell [Internet]. 2004 Mar 29 [cited 2017 May 30];15(3):1024–30. Available from: http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E03-09-0673

57. Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG. Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. J Cell Biol [Internet]. 1996 Jul [cited 2017 May 30];134(2):295–306. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707816

58. Bi K, Roth MG, Ktistakis NT. Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. Curr Biol [Internet]. 1997 May 1 [cited 2017 May 30];7(5):301–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133344

59. Ma W, Park S-Y, Han J-S. Role of phospholipase D1 in glucose-induced insulin secretion in pancreatic Beta cells. Exp Mol Med [Internet]. 2010 Jun 30 [cited 2017 May 30];42(6):456–64. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.3858/emm.2010.42.6.047

60. Roach AN, Wang Z, Wu P, Zhang F, Chan RB, Yonekubo Y, et al. Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. J Lipid Res [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2017 May 30];53(12):2598–609. Available from: http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.M028597

61. Harsh DM, Blackwood RA. Phospholipase A(2)-mediated fusion of neutrophil-derived membranes is augmented by phosphatidic acid. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2001 Mar 30 [cited 2017 May 30];282(2):480–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01946017

62. Vicogne J, Vollenweider D, Smith JR, Huang P, Frohman MA, Pessin JE. Asymmetric phospholipid distribution drives *in vitro* reconstituted SNARE-dependent membrane fusion. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 2006 Oct 3

[cited 2017 May 30];103(40):14761–6. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606881103

63. Waring M, Drappatz J, Weichel O, Seimetz P, Sarri E, Böckmann I, et al. Modulation of neuronal phospholipase D activity under depolarizing conditions. FEBS Lett [Internet]. 1999 Dec 24 [cited 2017 May 30];464(1–2):21–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611476

64. Brandenburg L-O, Koch T, Sievers J, Lucius R. Internalization of PrP106-126 by the formyl-peptide-receptor-like-1 in glial cells. J Neurochem [Internet]. 2007 May 20 [cited 2017 May 30];101(3):718–28. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2006.04351.x

65. Rankovic M, Jacob L, Rankovic V, Brandenburg L-O, Schröder H, Höllt V, et al. ADP-ribosylation factor 6 regulates mu-opioid receptor trafficking and signaling via activation of phospholipase D2. Cell Signal [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 May 30];21(12):1784–93. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656809002216

66. Scarselli M, Donaldson JG. Constitutive Internalization of G Protein-coupled Receptors and G Proteins via Clathrin-independent Endocytosis. J Biol Chem [Internet]. 2009 Feb 6 [cited 2017 May 30];284(6):3577–85. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M806819200

67. Klein J. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. J Neurochem [Internet]. 2005 Sep [cited 2017 May 30];94(6):1473–87. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16042758

68. Burkhardt U, Stegner D, Hattingen E, Beyer S, Nieswandt B, Klein J. Impaired brain development and reduced cognitive function in phospholipase D-deficient mice. Neurosci Lett [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 May 30];572:48–52. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394014003632

69. Zhao D, Frohman MA, Blusztajn JK. Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms. BMC Neurosci [Internet]. 2001 [cited 2017 May 30];2:16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734063

70. Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. Biochemistry [Internet]. 1998 Apr 7 [cited 2017 May 30];37(14):4901–9. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi972776r

71. Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H. Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 May 30];1791(9):898–904. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198109000870

72. Yoon MS, Yon C, Park SY, Oh DY, Han AH, Kim DS, et al. Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2005;329(3):804–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15752728

73. Watanabe H, Hongu T, Yamazaki M, Kanaho Y. Phospholipase D2 activation by p38 MAP kinase is involved in neurite outgrowth. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 May 30];413(2):288–93. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11014975

74. Yoon SN, Kim KS, Cho JH, Ma W, Choi H-J, Kwon S-J, et al. Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. Biochem J [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2017 May 30];441(1):407–16. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20110302

75. Exton JH. Phospholipase D-structure, regulation and function. Rev Physiol Biochem Pharmacol [Internet]. 2002 [cited 2017 May 30];144:1–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11987824

76. Voss M, Weernink PA, Haupenthal S, Möller U, Cool RH, Bauer B, et al. Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. J Biol Chem [Internet]. 1999 Dec 3 [cited 2017 May 30];274(49):34691–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574935

77. McHarg S, Shore AC, Whatmore JL. Heterogeneity of Phospholipase D Activation by Angiotensin II, Lysophosphatidylcholine, and Insulin in Human Endothelial Cells. Endothelium [Internet]. 2008 Jan 13 [cited 2017 May 30];15(4):213–8. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10623320802228765

78. Standaert ML, Bandyopadhyay G, Zhou X, Galloway L, Farese R V. Insulin stimulates phospholipase D-dependent phosphatidylcholine hydrolysis, Rho translocation, *de novo* phospholipid synthesis, and diacylglycerol/protein kinase C signaling in L6 myotubes. Endocrinology [Internet]. 1996 Jul [cited 2017 May 30]; 137(7):3014–20. Available from: https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.137.7.8770926.

79. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese R V. Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. Endocrinology [Internet]. 1997 Nov [cited 2017 May 30];138(11):4721–31. Available from: https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.138.11.5473

80. Standaert ML, Musunuru K, Yamada K, Cooper DR, Farese R V. Insulin-stimulated phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol/protein kinase C signalling, and hexose transport in pertussis toxin-treated BC3H-1 myocytes. Cell Signal [Internet]. 1994 Aug [cited 2017 May 30];6(6):707–16. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857772

81. Karnam P, Standaert ML, Galloway L, Farese R V. Activation and translocation of Rho (and ADP ribosylation factor) by insulin in rat adipocytes. Apparent involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem [Internet]. 1997 Mar 7 [cited 2017 May 30];272(10):6136–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045624

82. Ploug T, Ralston E. Exploring the whereabouts of GLUT4 in skeletal muscle (review). Mol Membr Biol [Internet]. [cited 2017 May 30];19(1):39–49. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11989821

83. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2002 Apr [cited 2017 May 30];3(4):267–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994746

84. Fisher RJ, Pevsner J, Burgoyne RD. Control of Fusion Pore Dynamics During Exocytosis by Munc18. Science (80-) [Internet]. 2001 Feb 2 [cited 2017 May 30];291(5505):875–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157167

85. Matsuoka K, Morimitsu Y, Uchida K, Schekman R. Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles. Mol Cell [Internet]. 1998 Nov [cited 2017 May 30];2(5):703–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844642

86. Thurmond DC, Ceresa BP, Okada S, Elmendorf JS, Coker K, Pessin JE. Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3L1 adipocytes. J Biol Chem [Internet]. 1998 Dec 11 [cited 2017 May 30];273(50):33876–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837979

87. Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont J-L, Du G, Frohman MA, et al. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2001 Dec 18 [cited 2017 May 30];98(26):15300–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752468

88. Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, Beaven MA. Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. J Immunol [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2017 May 30];168(11):5682–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023367

89. Piatkiewicz P, Czech A, Tatoń J, Górski A. Investigations of cellular glucose transport and its regulation under the influence of insulin in human peripheral blood lymphocytes. Endokrynol Pol [Internet]. [cited 2017 May 30];61(2):182–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464705

90. Emoto M, Klarlund JK, Waters SB, Hu V, Buxton JM, Chawla A, et al. A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. J Biol Chem [Internet]. 2000 Mar 10 [cited 2017 May 30];275(10):7144–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702282

91. Lim SN, Bonzelius F, Low SH, Wille H, Weimbs T, Herman GA. Identification of discrete classes of endosome-derived small vesicles as a major cellular pool for recycling membrane proteins. Mol Biol Cell [Internet]. 2001 Apr [cited 2017 May 30];12(4):981–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294901

92. Strawbridge AB, Elmendorf JS. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses endothelin-1-induced insulin resistance via an actin-dependent mechanism. Diabetes [Internet]. 2005 Jun [cited 2017 May 30];54(6):1698–705. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919791

93. Strawbridge AB, Elmendorf JS. Endothelin-1 impairs glucose transporter trafficking via a membrane-based mechanism. J Cell Biochem [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2017 May 30];97(4):849–56. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20687

94. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J Biol Chem [Internet]. 1996 Dec 6 [cited 2017 May 30];271(49):31372–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940145

95. Kao AW, Noda Y, Johnson JH, Pessin JE, Saltiel AR. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. J Biol Chem [Internet]. 1999 Jun 18 [cited 2017 May 30];274(25):17742–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364216

96. Kim JH, Lee S, Kim JH, Lee TG, Hirata M, Suh P-G, et al. Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via Its PH domain. Biochemistry [Internet]. 2002 Mar 12 [cited 2017 May 30];41(10):3414–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11876650

97. Van Obberghen E, Baron V, Delahaye L, Emanuelli B, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, et al. Surfing the insulin signaling web. Eur J Clin Invest [Internet]. 2001 Nov [cited 2017 May 30];31(11):966–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737239

98. Lizcano JM, Alessi DR, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, et al. The insulin signalling pathway. Curr Biol [Internet]. Elsevier; 2002 Apr 2 [cited 2017 May 30];12(7):R236-8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937037

99. Huang S, Czech MP, Guma A, Ruderman NB, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, et al. The GLUT4 Glucose Transporter. Cell Metab [Internet]. Elsevier; 2007 Apr [cited 2017 May 30];5(4):237–52. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107000678

100. Zaid H, Talior-Volodarsky I, Antonescu C, Liu Z, Klip A. GAPDH binds GLUT4 reciprocally to hexokinase-II and regulates glucose transport activity. Biochem J [Internet]. 2009 Apr 15 [cited 2017 May 30];419(2):475–84. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20081319

101. Kristiansen S, Nielsen JN, Bourgoin S, Klip A, Franco M, Richter EA. GLUT-4 translocation in skeletal muscle studied with a cell-free assay: involvement of phospholipase D. Am J Physiol Endocrinol Metab [Internet]. 2001 Sep [cited 2017 May 30];281(3):E608-18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500317

102. Yu D, Sun C-Y, Sun G-P, Ren G-P, Ye X-L, Zhu S-L, et al. [The synergistic effect of FGF-21 and insulin on regulating glucose metabolism and its mechanism]. Yao Xue Xue Bao [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 May 30];49(7):977–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233627

103. Bogan JS, Rubin BR, Yu C, Loffler MG, Orme CM, Belman JP, et al. Endoproteolytic Cleavage of TUG Protein Regulates GLUT4 Glucose Transporter Translocation. J Biol Chem [Internet]. 2012 Jul 6 [cited 2017 May 30];287(28):23932–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610098

104. Talior-Volodarsky I, Randhawa VK, Zaid H, Klip A. Alpha-actinin-4 is selectively required for insulin-induced GLUT4 translocation. J Biol Chem [Internet]. 2008 Sep 12 [cited 2017 May 30];283(37):25115–23. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M801750200

105. Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. J Cell Sci [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2017 May 30];124(24):4147–59. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247191.

106. Zorzano A, Fandos C, Palacín M. Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. Biochem J [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2017 May 30];349 Pt 3:667–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903126

107. Wilson CM, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A. Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. FEBS Lett [Internet]. 1995 Jul 10 [cited 2017 May 30];368(1):19–22. Available from: http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2895%2900589-2

108. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature [Internet]. Nature Publishing Group; 2001 Dec 13 [cited 2017 May 30];414(6865):799–806. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/414799a

109. Lavoie L, Band CJ, Kong M, Bergeron JJ, Posner BI. Regulation of glycogen synthase in rat hepatocytes. Evidence for multiple signaling pathways. J Biol Chem [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2017 May 30];274(40):28279–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10497184

110. Guo T, Mao Y, Li H, Wang X, Xu W, Song R, et al. Characterization of the gene expression profile of heterozygous liver-specific glucokinase knockout mice at a young age. Biomed Pharmacother [Internet]. 2012 Dec [cited 2017 May 30];66(8):587–96. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332212000741

111. Eisenberg ML, Maker A V, Slezak LA, Nathan JD, Sritharan KC, Jena BP, et al. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2005 Jan 13 [cited 2017 May 30];15(1–4):51–8. Available from: http://www.karger.com/?doi=10.1159/000083638

112. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. AJP Endocrinol Metab [Internet].

2009 May 1 [cited 2017 May 30];296(5):E985–92. Available from: http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00004.2009

113. Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, de Kruijff B, Burger KNJ, et al. Spontaneous Curvature of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. Biochemistry [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2017 Nov 21];44(6):2097–102. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15697235

114. Jiang X, Kenerson H, Aicher L, Miyaoka R, Eary J, Bissler J, et al. The Tuberous Sclerosis Complex Regulates Trafficking of Glucose Transporters and Glucose Uptake. Am J Pathol [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 May 30];172(6):1748–56. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010619323

115. Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. Diabetes [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 May 30];54(10):3056–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186415.

116. Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. Biochem J [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2017 May 30];413(2):201–15. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20080723

117. Brutman-Barazani T, Horovitz-Fried M, Aga-Mizrachi S, Brand C, Brodie C, Rosa J, et al. Protein kinase Cδ but not PKCα is involved in insulin-induced glucose metabolism in hepatocytes. J Cell Biochem [Internet]. 2012 Jun [cited 2017 May 30];113(6):2064–76. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24078\

118. Tan Y, Adami G, Costa RH. Maintaining HNF6 expression prevents AdHNF3beta-mediated decrease in hepatic levels of Glut-2 and glycogen. Hepatology [Internet]. 2002 Apr [cited 2017 May 30];35(4):790–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2002.32482.

119. Nakashima T, Takayama Y, Nishie A, Asayama Y, Baba S, Yamashita Y, et al. Hepatocellular adenoma showing high uptake of 18F-fluorodeoxyglucose (FDG) via an increased expression of glucose transporter 2 (GLUT-2). Clin Imaging [Internet].

2014 Nov [cited 2017 May 30];38(6):888–91. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899707114001545.

120. Chen L-N, Lyu J, Yang X-F, Ji W-J, Yuan B-X, Chen M-X, et al. Liraglutide ameliorates glycometabolism and insulin resistance through the upregulation of GLUT4 in diabetic KKAy mice. Int J Mol Med [Internet]. 2013 Oct 19 [cited 2017 May 30];32(4):892–900. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2013.1453

121. Zheng F, Zhang S, Lu W, Wu F, Yin X, Yu D, et al. Regulation of Insulin Resistance and Adiponectin Signaling in Adipose Tissue by Liver X Receptor Activation Highlights a Cross-Talk with PPARγ. Valledor A, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Jun 27 [cited 2017 May 30];9(6):e101269. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101269.

122. Hagiwara A, Cornu M, Cybulski N, Polak P, Betz C, Trapani F, et al. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. Cell Metab [Internet]. 2012 May 2 [cited 2017 May 30];15(5):725–38. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413112001350

123. Beresford GW, Agius L. Cytochalisin D exerts stimulatory and inhibitory effects on insulin-induced glucokinase mRNA expression in hepatocytes. Mol Cell Biochem [Internet]. 1994 Oct 26 [cited 2017 May 30];139(2):177–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7862107

124. Sankar R, Thamotharan S, Shin D, Moley KH, Devaskar SU. Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. Brain Res Mol Brain Res [Internet]. 2002 Nov 15 [cited 2017 May 30];107(2):157–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12425944

125. D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. Neuropeptides [Internet]. [cited 2017 May 30];36(2–3):209–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359511

126. Plata-Salamán CR. Insulin in the cerebrospinal fluid. Neurosci Biobehav Rev [Internet]. 1991 [cited 2017 May 30];15(2):243–58. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852315

127. Laron Z. Insulin and the brain. Arch Physiol Biochem [Internet]. 2009 May [cited 2017 May 30];115(2):112–6. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813450902949012

128. Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. J Neural Transm Suppl [Internet]. 2007 [cited 2017 May 30];(72):217–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982898

129. Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. Neurosci Biobehav Rev [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 May 30];24(8):855–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118610

130. Le Stunff H, Coant N, Migrenne S, Magnan C. Targeting lipid sensing in the central nervous system: new therapy against the development of obesity and type 2 diabetes. Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2013 Jun 4 [cited 2017 May 30];17(5):545–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23379938.

131. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, 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 [Internet]. 1999 Dec 3 [cited 2017 May 30];274(49):34893–902. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574963

132. Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, Johnson G, Gaskins J. Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. Brain Res [Internet]. 1998 Oct 19 [cited 2017 May 30];808(2):270–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767173

133. Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, et al. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer’s disease.

Neurobiol Aging [Internet]. [cited 2017 May 30];17(1):123–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786794.

134. Adamo M, Raizada MK, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system. Mol Neurobiol [Internet]. [cited 2017 May 30];3(1–2):71–100. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553069.

135. Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. J Biol Chem [Internet]. 1994 Mar 18 [cited 2017 May 30];269(11):8445–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132571.

136. Hoyer S. Memory Function and Brain Glucose Metabolism. Pharmacopsychiatry [Internet]. 2003 Jun [cited 2017 May 30];36:62–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130391

137. Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M. Identification of insulin in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1978 Nov [cited 2017 May 30];75(11):5737–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364489

138. Burns JM, Donnelly JE, Anderson HS, Mayo MS, Spencer-Gardner L, Thomas G, et al. Peripheral insulin and brain structure in early Alzheimer disease. Neurology [Internet]. 2007 Sep 11 [cited 2017 May 30];69(11):1094–104. Available from: http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/01.wnl.0000276952.91704.af

139. de la Monte SM, Wands JR. 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 [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 May 30];7(1):45–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750214

140. Cardoso S, Correia S, Santos RX, Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, et al. Insulin is a two-edged knife on the brain. J Alzheimers Dis [Internet]. 2009 Oct 30 [cited 2017 May 30];18(3):483–507. Available from: http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2009-1155

141. Fulop T, Larbi A, Douziech N. Insulin receptor and ageing. Pathol Biol (Paris) [Internet]. 2003 Dec [cited 2017 May 30];51(10):574–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622948

142. Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. J Pharmacol Sci [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 May 30];99(2):128–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210778

143. Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. Neurobiol Aging [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 May 30];31(2):224–43. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458008001176

144. van der Heide LP, Ramakers GMJ, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. Prog Neurobiol [Internet]. 2006 Jul [cited 2017 May 30];79(4):205–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16916571

145. Бондарева ВМ, Чистякова ОВ. Інсулін и інсулін-рецепторная сигнальная система мозга [Інтернет]. Нейрохимия. 2007 [цитовано 2017 Травня 30].24(1):8–20.

146. Ашмарин ИП (Ашмарин ИП, Антипенко АЕ, Ашапкин ВВ) Нейрохимия [Интернет]. Изд. Ин-та биомед. Химии РАМН; 1996 [цитовано 2017 Травня 30]. 469 с. Доступно на: http://booksshare.net/index.php?id1=4&category=chem&author=ashmarin-ip&book=1996

147. Dienel GA. Fueling and imaging brain activation. ASN Neuro [Internet]. 2012 Jul 20 [cited 2017 May 30];4(5):AN20120021. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1042/AN20120021.

148. Howarth C, Gleeson P, Attwell D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. J Cereb Blood Flow Metab [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 May 30];32(7):1222–32. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2012.35

149. 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 [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 May 30];26(10):1285–97. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/sj.jcbfm.9600281

150. 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 $^{2+}$ levels. J Neurochem [Internet]. 2009 May [cited 2017 May 30];109:87–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393013

151. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. Cell [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2017 May 30];144(5):810–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376239

152. Karow DS, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, Jennings RG, Brewer JB, et al. Relative capability of MR imaging and FDG PET to depict changes associated with prodromal and early Alzheimer disease. Radiology [Internet]. 2010 Sep [cited 2017 May 30];256(3):932–42. Available from: http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.10091402

153. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. Endocr Rev [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 May 31];29(4):381–402. Available from: https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2007-0025

154. Babenko NA. Effects of short- and long-term saturated fat-enriched diet on the ceramide and neutral lipids accumulation in the insulin responsive tissues of rats. In: Saturated Fats: Metabolism, Disease Risks and Public Awareness. Nova Science Publishers Inc NY: 71-97, 2012.

155. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, et al. Sphingoid bases and *de novo* ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and

mechanisms of action. Pharmacol Res [Internet]. 2003 May [cited 2017 Jun 1];47(5):373–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676511

156. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1998 Mar 3 [cited 2017 Jun 1];95(5):2498–502. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482914

157. Schilling JD, Machkovech HM, He L, Sidhu R, Fujiwara H, Weber K, et al. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages. J Biol Chem [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2017 Jun 1];288(5):2923–32. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.419978

158. Kitatani K, Nemoto M, Akiba S, Sato T. Stimulation by *de novo*-synthesized ceramide of phospholipase A(2)-dependent cholesterol esterification promoted by the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages. Cell Signal [Internet]. 2002 Aug [cited 2017 Jun 1];14(8):695–701. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020770

159. Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. *De novo*-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. Biochem J [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2017 Jun 1];363(Pt 1):183–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11903061

160. Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. Biochem Cell Biol [Internet]. 2004 Feb [cited 2017 Jun 1];82(1):27–44. Available from: http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o03-091

161. Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y. Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. J Biol Chem [Internet]. 1991 Jan 5 [cited 2017 Jun 1];266(1):484–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845977

162. Brenner B, Ferlinz K, Grassmé H, Weller M, Koppenhoefer U, Dichgans J, et al. Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases. Cell Death Differ [Internet]. 1998 Jan 28 [cited 2017 Jun 1];5(1):29–37. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4400307

163. Goldkorn T, Filosto S, Chung S. Lung injury and lung cancer caused by cigarette smoke-induced oxidative stress: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities involving the ceramide-generating machinery and epidermal growth factor receptor. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2014 Nov 20 [cited 2017 Jun 1];21(15):2149–74. Available from: http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2013.5469

164. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat *in vivo*. J Biol Chem [Internet]. 1990 Oct 5 [cited 2017 Jun 1];265(28):16880–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211599

165. Бабенко НА, Харченко ВС. Роль церамідов в нарушении інсулінового сигналинга в диафрагме крыс в условиях in vivo и in vitro. Проблеми ендокринної патології. 2009;1:37–43. 1. [Цитовано 2017 Вер 30]; Available from: http://www.jpep.endocrinology.org.ua/issues/2009_01/2009_01.pdf.

166. Хассунех ЛХ, Семенова ЯО, Красільнікова ОА. Вікові особливості вмісту сигнальних ліпідів у печінці та мозку щурів. Фізіол журнал. 2006;6: 79-84

167. Babenko NA, Kharchenko VS. Age-Related Changes in the Phospholipase D-Dependent Signal Pathway of Insulin in the Rat Neocortex. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2013 Mar 4 [cited 2017 Jun 4];45(2):120–7. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-013-9346-9

168. Babenko NA, Semenova YA, Kharchenko VS. Effects of Fat-Enriched Diet on the Content of Sphingolipids in the Brain and on Cognitive Functions in Old Rats. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2009 Aug 20 [cited 2017 Sep 30];41(4):258–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-010-9101-4

169. Харченко В. С. Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе молодых крыс //

Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2012. [cited 2017 Jun 1]; 15(1008):41–49. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VKhb_2012_1008_15_7

170. Стороженко Г, Харченко В. Влияние насыщенных жиров диеты на содержание липидов и регуляцию инсулином фосфолипазы Д в тканях крыс. Research [Internet]. 2014 May 20 [cited 2017 Sep 30];ru1. Available from: http://www.labome.ru/research/The-effects-of-high-fat-diet-on-lipid-content-and-regulation-of-phospholipase-D-by-insulin-in-rat-ti.html

171. de la Monte SM, Tong M, Nguyen V, Setshedi M, Longato L, Wands JR. Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions. J Alzheimers Dis [Internet]. 2010 Sep 2 [cited 2017 Jun 1];21(3):967–84. Available from: http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2010-091726

172. de la Monte SM, Re E, Longato L, Tong M. Dysfunctional pro-ceramide, ER stress, and insulin/IGF signaling networks with progression of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 1];30 Suppl 2:S217-29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297646

173. Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, et al. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. Wang Y, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Jul 11 [cited 2017 Jun 1];6(7):e21643. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021643

174. Rivas DA, Morris EP, Haran PH, Pasha EP, Morais M da S, Dolnikowski GG, et al. Increased ceramide content and NFκB signaling may contribute to the attenuation of anabolic signaling after resistance exercise in aged males. J Appl Physiol [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2017 Jun 1];113(11):1727–36. Available from: http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/japplphysiol.00412.2012

175. Chavez JA, Knotts TA, Wang L-P, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, et al. A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal

Transduction by Saturated Fatty Acids. J Biol Chem [Internet]. 2003 Mar 14 [cited 2017 Jun 1];278(12):10297–303. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525490

176. Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. Mol Cell Biol [Internet]. 2003 Nov [cited 2017 Jun 1];23(21):7794–808. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14560023

177. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. J Biol Chem [Internet]. 1999 Aug 20 [cited 2017 Jun 1];274(34):24202–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446195

178. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. Mol Cell Biol [Internet]. 1998 Sep [cited 2017 Jun 1];18(9):5457–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710629

179. Resjö S, Göransson O, Härndahl L, Zolnierowicz S, Manganiello V, Degerman E. Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. Cell Signal [Internet]. 2002 Mar [cited 2017 Jun 1];14(3):231–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812651

180. Powell DJ, Turban S, Gray A, Hajduch E, Hundal HS. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase Czeta activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. Biochem J [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2017 Jun 1];382(Pt 2):619–29. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20040139

181. Webb LM, Arnholt AT, Venable ME. Phospholipase D modulation by ceramide in senescence. Mol Cell Biochem [Internet]. 2010 Apr 25 [cited 2017 Jun 1];337(1–2):153–8. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11010-009-0294-z

182. Mebarek S, Komati H, Naro F, Zeiller C, Alvisi M, Lagarde M, et al. Inhibition of *de novo* ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. J Cell Sci [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2017 Jun 1];120(Pt 3):407–16. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.03331

183. Харченко ВС. Экспериментально индуцированные изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах молодых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали XIX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 6(3). с. 148-9.

184. Петренко АЮ, Сукач АН, Росляков АД. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности. Биохимия. 1991;56(9):1647-1650.

185. Chavez JA, Holland WL, Bär J, Sandhoff K, Summers SA. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. J Biol Chem [Internet]. 2005 May 20 [cited 2017 Jun 1];280(20):20148–53. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M412769200

186. Кулганек В, Клашка В. Упрощенное определение альдолазной активности в сыворотке крови. Вопр. Мед. Химии. 1961. Том 7 (4): 434–36.

187. Moehren G, Gustavsson L, Hoek JB. Activation and desensitization of phospholipase D in intact rat hepatocytes. J Biol Chem [Internet]. 1994 Jan 14 [cited 2017 Jun 1];269(2):838–48. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288637

188. Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. Biochemistry [Internet]. 1998 Apr 7 [cited 2017 Jun 1];37(14):4901–9. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi972776r

189. Aga-Mizrachi S, Brutman-Barazani T, Jacob AI, Bak A, Elson A, Sampson SR. Cytosolic protein tyrosine phosphatase-epsilon is a negative regulator of insulin signaling in skeletal muscle. Endocrinology [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Jun 1];149(2):605–14. Available from: https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2007-0908

190. Doyle E. Saturated Fat and Beef Fat as Related to Human Health [Internet]. Madison: Food Research Institute, University of Wisconsin; 2004 [cited 2017 Jun 1]. 1-39 p. Available from: https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/satfat.pdf.

191. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol [Internet]. 1959 Aug [cited 2017 Jun 1];37(8):911–7. Available from: http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099

192. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem [Internet]. 1959 Mar [cited 2017 Jun 1];234(3):466–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13641241

193. Marsh JB, Weinstein DB. Simple charring method for determination of lipids. J Lipid Res [Internet]. 1966 Jul [cited 2017 Jun 1];7(4):574–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5965305

194. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem [Internet]. 1951 Nov [cited 2017 Jun 1];193(1):265–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713

195. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of Aging and Experimentally Induced Modifications of Signal Pathways on Insulin-Induced Shifts of Glucose Metabolism in the Rat Neocortex. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2015 Feb 24 [cited 2017 Jun 4];47(1):16–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-015-9491-4

196. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2015 Jan 21 [cited 2017 Jun 5];80(1):104–12. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297915010125

197. Babenko NA, Kharchenko VS. Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. Int J Endocrinol [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 4];2015:794838. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ije/2015/794838/

198. Babenko NA, Hassouneh LKM, Kharchenko VS, Garkavenko V V. Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover

in liver cells. Age (Omaha) [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2017 Sep 30];34(4):905–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796379

199. Babenko NA, Kharchenko VS. Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2012 Feb 29 [cited 2017 Jun 1];77(2):180–6. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297912020095

200. Бабенко НА, Белый АН, Харченко ВС. Роль церамидов с различной длиной ацильной цепи в нарушении функционального состояния клеток печени. Таврический медико-биологический. вестник. 2013 [cited 2017 Sep 30];3(61):29–34. 1. Available from: http://www.csmu.edu.ua/res/200917/Tmbv_2013_16_1(3)__7.pdf

201. Farese RV. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. Exp Biol Med (Maywood) [Internet]. 2001 Apr [cited 2017 Jun 1];226(4):283–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368419

202. Billah MM, Anthes JC. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. Biochem J [Internet]. 1990 Jul 15 [cited 2017 Jun 1];269(2):281–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2201284

203. Kiss Z, Chattopadhyay J, Pettit G. Stimulation of phosphatidylcholine synthesis by activators of protein kinase C is dissociable from increased phospholipid hydrolysis. Biochem J [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2017 Jun 1];273(Pt 1):189–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1989580

204. Farese RV, Lee MC, Sajan MP. Hepatic Atypical Protein Kinase C: An Inherited Survival-Longevity Gene that Now Fuels Insulin-Resistant Syndromes of Obesity, the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. J Clin Med [Internet]. 2014 Jul 7 [cited 2017 Jun 1];3(3):724–40. Available from: http://www.mdpi.com/2077-0383/3/3/724/

205. Giusto NM, Salvador GA, Castagnet PI, Pasquaré SJ, Ilincheta de Boschero MG. Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism. Neurochem Res [Internet]. 2002 Nov [cited 2017 Jun 1];27(11):1513–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512956

206. Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, Frohman MA, et al. Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem [Internet]. 1999 Jan 8 [cited 2017 Jun 1];274(2):1131–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9873061

207. Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, et al. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. Mol Cell Biol [Internet]. 1996 Apr [cited 2017 Nov 22];16(4):1722–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657148

208. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem [Internet]. 1994 Feb 18 [cited 2017 Nov 22];269(7):5241–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106507.

209. Бабенко НА, Харченко ВС. Роль фосфолипазы Д в сигнальном каскаде инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання); 2014 Бер. 13-14; Харків. Харків; 2014. с. 25-6.

210. Scott SA, Mathews TP, Ivanova PT, Lindsley CW, Brown HA. Chemical modulation of glycerolipid signaling and metabolic pathways. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Jun 1];1841(8):1060–84. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198114000146

211. Pasquaré SJ, Gaveglio VL, Giusto NM. Regulation of Phosphatidic Acid Metabolism by Sphingolipids in the Central Nervous System. J Lipids [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 1]; 2011:1–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490799

212. Arana L, Gangoiti P, Ouro A, Trueba M, Gómez-Muñoz A. Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. Lipids Health Dis [Internet].

2010 Feb 5 [cited 2017 Jun 1];9(1):15. Available from: http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-9-15

213. Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. Chem Rev [Internet]. 2011 Oct 12 [cited 2017 Jun 1];111(10):6064–119. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr200296t

214. Scott SA, Selvy PE, Buck JR, Cho HP, Criswell TL, Thomas AL, et al. Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. Nat Chem Biol [Internet]. NIH Public Access; 2009 Feb [cited 2017 Nov 29];5(2):108–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136975

215. Ganesan R, Mahankali M, Alter G, Gomez-Cambronero J. Two sites of action for PLD2 inhibitors: The enzyme catalytic center and an allosteric, phosphoinositide biding pocket. Biochim Biophys Acta [Internet]. NIH Public Access; 2015 Mar [cited 2017 Nov 29];1851(3):261–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532944

216. Nomura M, Takahashi T, Nagata N, Tsutsumi K, Kobayashi S, Akiba T, et al. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. Biol Pharm Bull [Internet]. 2008 Jul [cited 2017 Jun 1];31(7):1403–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591783

217. Bumke-Vogt C, Osterhoff MA, Borchert A, Guzman-Perez V, Sarem Z, Birkenfeld AL, et al. The flavones apigenin and luteolin induce FOXO1 translocation but inhibit gluconeogenic and lipogenic gene expression in human cells. Eckel J, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Aug 19 [cited 2017 Jun 1];9(8):e104321. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104321

218. Babenko NA, Shakhova EG. Effects of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells. Lipids Health Dis [Internet]. 2008 Jan 28 [cited 2017 Jun 1];7(1):1. Available from: http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-7-1

219. Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Suzuki R, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. Cell Metab [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Jun 1];7(2):125–34. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107003683

220. Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. Mol Cell [Internet]. 2000 Jul [cited 2017 Jun 1];6(1):87–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949030

221. Li H-S, Shome K, Rojas R, Rizzo MA, Vasudevan C, Fluharty E, et al. The guanine nucleotide exchange factor ARNO mediates the activation of ARF and phospholipase D by insulin. BMC Cell Biol [Internet]. 2003 Sep 11 [cited 2017 Jun 1];4(1):13. Available from: http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-4-13

222. Sozzani S, Agwu DE, McCall CE, O'Flaherty JT, Schmitt JD, Kent JD, et al. Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. J Biol Chem [Internet]. 1992 Oct 5 [cited 2017 Jun 1];267(28):20481–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328200

223. Seiler AE, Henderson A, Rubin R. Ethanol inhibits insulin receptor tyrosine kinase. Alcohol Clin Exp Res [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 Jun 1];24(12):1869–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141047

224. Xu J, Yeon JE, Chang H, Tison G, Chen GJ, Wands J, et al. Ethanol impairs insulin-stimulated neuronal survival in the developing brain: role of PTEN phosphatase. J Biol Chem [Internet]. 2003 Jul 18 [cited 2017 Jun 1];278(29):26929–37. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M300401200

225. Bobeszko M, Czajkowski R, Wójcik M, Sabała P, Lei L, Nalepa I, et al. Modulation by cationic amphiphilic drugs of serine base-exchange, phosholipase d and intracellular calcium homeostasis in glioma C6 cells. Pol J Pharmacol [Internet].

[cited 2017 Jun 1];54(5):483–93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593535

226. Zhang C, Hwarng G, Cooper DE, Grevengoed TJ, Eaton JM, Natarajan V, et al. Inhibited insulin signaling in mouse hepatocytes is associated with increased phosphatidic acid but not diacylglycerol. J Biol Chem [Internet]. 2015 Feb 6 [cited 2017 Jun 1];290(6):3519–28. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.602789

227. Rauch C, Loughna P. C2C12 skeletal muscle cells exposure to phosphatidylcholine triggers IGF-1 like-responses. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2017 Jun 1];15(5):211–24. Available from: http://www.karger.com/?doi=10.1159/000086408

228. Waselle L, Gerona RRL, Vitale N, Martin TFJ, Bader M-F, Regazzi R. Role of Phosphoinositide Signaling in the Control of Insulin Exocytosis. Mol Endocrinol [Internet]. 2005 Dec [cited 2017 Jun 1];19(12):3097–106. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081518

229. Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese R V, et al. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-riboside (AICAR)-stimulated glucose transport. J Biol Chem [Internet]. 2002 Jun 28 [cited 2017 Jun 1];277(26):23554–62. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M201152200

230. Karim S, Adams DH, Lalor PF. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. World J Gastroenterol [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2017 Jun 1];18(46):6771–81. Available from: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i46/6771.htm

231. Chen F, Ghosh A, Shneider BL. Phospholipase D2 mediates signaling by ATPase class I type 8B membrane 1. J Lipid Res [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2017 Jun 1];54(2):379–85. Available from: http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.M030304

232. Ivey RA, Sajan MP, Farese R V. Requirements for pseudosubstrate arginine residues during autoinhibition and phosphatidylinositol 3,4,5-$(PO_4)_3$-dependent activation

of atypical PKC. J Biol Chem [Internet]. 2014 Sep 5 [cited 2017 Jun 1];289(36):25021–30. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.565671

233. Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced Inhibition of Akt Is Mediated through Protein Kinase C : IMPLICATIONS FOR GROWTH ARREST. J Biol Chem [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2017 Jun 1];277(5):3286–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723139

234. Mizutani T, Nakashima S, Nozawa Y. Changes in the expression of protein kinase C (PKC), phospholipases C (PLC) and D (PLD) isoforms in spleen, brain and kidney of the aged rat: RT-PCR and Western blot analysis. Mech Ageing Dev [Internet]. 1998 Sep 15 [cited 2017 Jun 1];105(1–2):151–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922125

235. Стороженко ГВ, Харченко ВС, Бабенко НА. Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1.

236. Бабенко НА, Харченко ВС. Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д и модуляции состояния инсулинорезистентности. В: Асоціація патологів україни Запорізький медичний університет. Матеріали V нац. конгресу патофізіологів України Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів; 2008 Вер. 17-19; Запоріжжя. Запоріжжя; 2008. Т. 5(2). с. 85.

237. Ruiz PA, Haller D. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. J Nutr [Internet]. 2006 Mar [cited 2017 Jun 1];136(3):664–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484540

238. Park CM, Song Y-S. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF-κB/AP-1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. Nutr Res Pract [Internet].

2013 Dec [cited 2017 Jun 1];7(6):423–9. Available from: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4162/nrp.2013.7.6.423

239. 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 [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2017 Jun 1];90(21):10086–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234260

240. González-Sánchez JL, Serrano-Ríos M. Molecular basis of insulin action. Drug News Perspect [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Jun 1];20(8):527–31. Available from: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=3&p_RefId=1157615&p_IsPs=N

241. 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 [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 Jun 4];26(10):1285–97. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/sj.jcbfm.9600281

242. 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 [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Jun 4];119(5):1389–95. Available from: http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.119.5.1389

243. 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 [Internet]. 1999 Oct [cited 2017 Jun 4];48(10):1915–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10512354

244. Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R. Distribution and levels of [^{125}I]IGF-I, [^{125}I]IGF-II and [^{125}I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-

unimpaired and -impaired rats. Neuroscience [Internet]. 1997 Oct [cited 2017 Jun 4];80(4):1033–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284058

245. McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. Eur J Pharmacol [Internet]. 2004 Apr 19 [cited 2017 Jun 4];490(1–3):13–24. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299904001980

246. Figlewicz DP, Szot P. Insulin stimulates membrane phospholipid metabolism by enhancing endogenous alpha 1-adrenergic activity in the rat hippocampus. Brain Res [Internet]. 1991 May 31 [cited 2017 Jun 4];550(1):101–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653632

247. 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 [Internet]. 2004 Feb 8 [cited 2017 Jun 4];67(5–6):450–9. Available from: http://www.karger.com/?doi=10.1159/000082930

248. Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. ATP-stimulated Ca2+ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. J Neurochem [Internet]. 1999 Jul [cited 2017 Jun 4];73(1):334–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10386986

249. Venable ME, Obeid LM. Phospholipase D in cellular senescence. Biochim Biophys Acta [Internet]. 1999 Jul 30 [cited 2017 Jun 4];1439(2):291–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425402

250. Харченко ВС. Роль церамидов в нарушении передачи фосфолипаза Д-зависимого сигнала инсулина в неокортексе крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Одинадцяті Данилевські читання); 2012 Бер. 1-2; Харків. Харків, 2012. с.137-8.

251. Nakashima S, Nozawa Y. Possible role of phospholipase D in cellular differentiation and apoptosis. Chem Phys Lipids [Internet]. 1999 Apr [cited 2017 Jun 4];98(1–2):153–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358937

252. Tacutu R, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. Molecular links between cellular senescence, longevity and age-related diseases - a systems biology perspective. Aging (Albany NY) [Internet]. 2011 Dec 18 [cited 2017 Jun 4];3(12):1178–91. Available from: http://www.aging-us.com/article/100413

253. Haigis MC, Yankner BA. The Aging Stress Response. Mol Cell [Internet]. 2010 Oct 22 [cited 2017 Jun 4];40(2):333–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965426

254. Куликова (Харченко) ВС, Никитина ИВ. Возрастные особенности индукции инсулином фосфолипазы Д в коре головного мозга крыс. Влияние кверцетина на сигналинг инсулина в старости. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы VIII междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 Мая 21-24; Харьков. Харьков, 2008. с. 34.

255. Харченко ВС. Фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе крыс. возрастные и индуцированные изменениюю. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы X междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 Мая 16-19; Харьков. Харьков; 2012. с. 63-4.

256. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. World J Diabetes [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 4];1(3):68. Available from: http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v1/i3/68.htm

257. Lee S, Lynn EG, Kim J, Quon MJ. Protein Kinase C-ζ Phosphorylates Insulin Receptor Substrate-1, -3, and -4 But Not -2: Isoform Specific Determinants of Specificity in Insulin Signaling. Endocrinology [Internet]. 2008 May [cited 2017 Jun 4];149(5):2451–

8. Available from: https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2007-1595

258. Marchesan D, Rutberg M, Andersson L, Asp L, Larsson T, Borén J, et al. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. J Biol Chem [Internet]. 2003 Jul 18 [cited 2017 Jun 4];278(29):27293–300. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M301430200

259. Andersson L, Boström P, Ericson J, Rutberg M, Magnusson B, Marchesan D, et al. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. J Cell Sci [Internet]. 2006 Jun 1 [cited 2017 Jun 4];119(Pt 11):2246–57. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02941

260. Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. Curr Biol [Internet]. 2001 Jun 5 [cited 2017 Jun 4];11(11):R446-9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516669

261. Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation. Trends Biochem Sci [Internet]. 1999 Mar [cited 2017 Jun 4];24(3):109–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203758

262. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J Clin Invest [Internet]. 2004 Jul 15 [cited 2017 Jun 4];114(2):147–52. Available from: http://www.jci.org/articles/view/22422

263. den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2004 Apr 5 [cited 2017 Jun 4];24(4):644–9. Available from: http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000116217.57583.6e

264. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. J Lipid Res [Internet]. 2008 Dec 19 [cited 2017 Jun 4];50(Supplement):S74–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997164

265. Cazanave SC, Mott JL, Elmi NA, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y, et al. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis. J Biol Chem [Internet]. 2009 Sep 25 [cited 2017 Jun 4];284(39):26591–602. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M109.022491

266. Neschen S, Morino K, Hammond LE, Zhang D, Liu Z-X, Romanelli AJ, et al. Prevention of hepatic steatosis and hepatic insulin resistance in mitochondrial acyl-CoA:glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 knockout mice. Cell Metab [Internet]. 2005 Jul [cited 2017 Jun 4];2(1):55–65. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413105001713

267. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. J Lipid Res [Internet]. 2008 Dec 19 [cited 2017 Jun 4];50(Supplement):S74–9. Available from: http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.R800053-JLR200.

268. Longato L, Ripp K, Setshedi M, Dostalek M, Akhlaghi F, Branda M, et al. Insulin Resistance, Ceramide Accumulation, and Endoplasmic Reticulum Stress in Human Chronic Alcohol-Related Liver Disease. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 4];2012:1–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577490

269. Holland WL, Brozinick JT, Wang L-P, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. Cell Metab [Internet]. 2007 Mar [cited 2017 Jun 4];5(3):167–79. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107000034

270. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 Jun 4];11(2):183–90. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm1166

271. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. Arch

Physiol Biochem [Internet]. 2008 Jul 10 [cited 2017 Jun 4];114(3):183–94. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13813450802181047

272. Malaisse WJ, Portois L, Zhang Y, Oguzhan B, Louchami K, Jijakli H, et al. Fatty acid content and pattern of epididymal and parametrial adipose tissue lipids in streptozotocin (type 1) and Goto-Kakizaki (type 2) diabetic rats. Int J Mol Med [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Jun 4];18(6):1231–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089031

273. Lyn-Cook LE, Lawton M, Tong M, Silbermann E, Longato L, Jiao P, et al. Hepatic ceramide may mediate brain insulin resistance and neurodegeneration in type 2 diabetes and non-alcoholic steatohepatitis. Bierhaus A, editor. J Alzheimers Dis [Internet]. 2009 Apr 17 [cited 2017 Jun 4];16(4):715–29. Available from: http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2009-0984

274. Куликова (Харченко) ВС. Содержание липидов и индукция инсулином обмена ФХ и фосфатидилэтаноламина в коре головного мозга молодых крыс в условиях высококалорийного рациона и введения кверцетина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 97.

275. Konstantynowicz-Nowicka K, Harasim E, Baranowski M, Chabowski A. New Evidence for the Role of Ceramide in the Development of Hepatic Insulin Resistance. Cowart A, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jan 30 [cited 2017 Jun 4];10(1):e0116858. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635851

276. Blázquez C, Galve-Roperh I, Guzmán M. *De novo*-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. FASEB J [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2017 Jun 4];14(14):2315–22. Available from: http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.00-0122com

277. Chabowski A, Żendzian-Piotrowska M, Konstantynowicz K, Pankiewicz W, Mikłosz A, Łukaszuk B, et al. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate

induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. Acta Physiol (Oxf) [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Jun 4];207(2):346–57. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12022

278. Бабенко НА, Харченко ВС. Возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті; 2009 Жовт 29-30; Харків. Харків; 2009. с. 16-7.

279. Swagell CD, Henly DC, Morris CP. Expression analysis of a human hepatic cell line in response to palmitate. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2005 Mar 11 [cited 2017 Jun 4];328(2):432–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694366

280. Hickson-Bick DLM, Sparagna GC, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. Am J Physiol - Hear Circ Physiol [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2017 Jun 4];282(2):H656–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788415

281. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. J Biol Chem [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2017 Jun 4];272(6):3324–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013572

282. Welters HJ, Diakogiannaki E, Mordue JM, Tadayyon M, Smith SA, Morgan NG. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic beta-cells exposed to palmitate. Apoptosis [Internet]. 2006 Jul 11 [cited 2017 Jun 4];11(7):1231–8. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10495-006-7450-7

283. Yi J, Gao F, Shi G, Li H, Wang Z, Shi X, et al. The inherent cellular level of reactive oxygen species: one of the mechanisms determining apoptotic susceptibility of leukemic cells to arsenic trioxide. Apoptosis [Internet]. 2002 Jun [cited 2017 Jun 4];7(3):209–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997664

284. Ford JH. Saturated fatty acid metabolism is key link between cell division, cancer, and senescence in cellular and whole organism aging. Age (Dordr) [Internet]. 2010 Jun 14 [cited 2017 Jun 4];32(2):231–7. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11357-009-9128-x

285. Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2014 Jul [cited 2017 Jun 4];1843(7):1402–13. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488914001220

286. Grether-Beck S, Timmer A, Felsner I, Brenden H, Brammertz D, Krutmann J. Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide *de novo* synthesis. J Invest Dermatol [Internet]. 2005 Sep [cited 2017 Jun 4];125(3):545–53. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15324350

287. Bladergroen BA, Bussière M, Klein W, Geelen MJ, Van Golde LM, Houweling M. Inhibition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis in rat-2 fibroblasts by cell-permeable ceramides. Eur J Biochem [Internet]. 1999 Aug [cited 2017 Jun 4];264(1):152–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10447683

288. Харченко ВС**.** Активация инсулином фосфолипазы Д в гепатоцитах крыс. возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы IX междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 Мая 26-29; Харьков. Харьков, 2010. с. 28-9.

289. Gomez-Muñoz A, Martin A, O'Brien L, Brindley DN. Cell-permeable ceramides inhibit the stimulation of DNA synthesis and phospholipase D activity by phosphatidate and lysophosphatidate in rat fibroblasts. J Biol Chem [Internet]. 1994 Mar

25 [cited 2017 Jun 4];269(12):8937–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132631

290. Patil S, Balu D, Melrose J, Chan C. Brain region-specificity of palmitic acid-induced abnormalities associated with Alzheimer's disease. BMC Res Notes [Internet]. 2008 Jun 4 [cited 2017 Jun 4];1(1):20. Available from: http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-1-20

291. Ridgway ND, Merriam DL. Metabolism of short-chain ceramide and dihydroceramide analogues in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Biochim Biophys Acta [Internet]. 1995 Apr 28 [cited 2017 Jun 4];1256(1):57–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742357

292. Pike LJ. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2005 Dec 30 [cited 2017 Jun 4];1746(3):260–73. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488905000881

293. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. Science [Internet]. 1993 Mar 19 [cited 2017 Jun 4];259(5102):1769–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456305

294. Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, et al. Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. J Biol Chem [Internet]. 2002 Apr 12 [cited 2017 Jun 4];277(15):12960–9. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110699200

295. Liu L, Martin R, Chan C. Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. Neurobiol Aging [Internet]. 2013 Feb [cited 2017 Jun 4];34(2):540–50. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019745801200317X

296. Ussher JR, Folmes CDL, Keung W, Fillmore N, Jaswal JS, Cadete VJ, et al. Inhibition of serine palmitoyl transferase I reduces cardiac ceramide levels and increases glycolysis rates following diet-induced insulin resistance. Federici M, editor. PLoS One

[Internet]. 2012 May 22 [cited 2017 Jun 4];7(5):e37703. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037703

297. Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. Biochemical and Biophysical Research Communications 1995-06-15; 1. Wadsworth JM, Clarke DJ, McMahon SA, Lowther JP, Beattie AE, Langridge-Smith PRR, et al. The Chemical Basis of Serine Palmitoyltransferase Inhibition by Myriocin. J Am Chem Soc [Internet]. 2013 Sep 25 [cited 2017 Nov 5];135(38):14276–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23957439

298. Babenko NA, Kharchenko VS. Ceramide synthesis *de novo* involved in insulin signaling disruption and insulin resistance development at old age. III International Symposium Intracellular signaling and bioactive molecules design; 2012 Sept 17-23; Lviv (Ukraine); 2012. 134 p.

299. Yang G, Badeanlou L, Bielawski J, Roberts AJ, Hannun YA, Samad F. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. Am J Physiol Endocrinol Metab [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2017 Jun 4];297(1):E211-24. Available from: http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.91014.2008

300. Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol [Internet]. 2001 May [cited 2017 Jun 4];47(5):444–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391861

301. Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Asano T, Hayakawa M. Selective Akt inactivation and tumor necrosis actor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. Cancer Res [Internet]. 2003 Mar 15 [cited 2017 Jun 4];63(6):1365–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649200

302. Wang H, Giuliano AE, Cabot MC. Enhanced *de novo* ceramide generation through activation of serine palmitoyltransferase by the P-glycoprotein antagonist SDZ

PSC 833 in breast cancer cells. Mol Cancer Ther [Internet]. 2002 Jul [cited 2017 Jun 4];1(9):719–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479368

303. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, Mühle C, Rhein C, Muehlbacher M, et al. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2010 [cited 2017 Jun 4];26(1):9–20. Available from: http://www.karger.com/doi/10.1159/000315101

304. Luberto, C.,Hassler, D.F.,Signorelli, P., et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. The Journal of Biological Chemisty 277(43), 41128-41139 (2002).

305. Харченко ВС, Белый АН, Бабенко НА. Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д при паклитаксел-индуцированной инсулинорезистентности. В: Укр. біохім. журнал. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(1). с. 216.

306. Martínez R, Navarro R, Lacort M, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB. Doxorubicin induces ceramide and diacylglycerol accumulation in rat hepatocytes through independent routes. Toxicol Lett [Internet]. 2009 Oct 8 [cited 2017 Jun 4];190(1):86–90. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842740901220X

307. Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR, Gulbins E. Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. Apoptosis [Internet]. 2007 Aug 22 [cited 2017 Jun 4];12(8):1533–41. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10495-007-0081-9

308. Rath G, Schneider C, Langlois B, Sartelet H, Morjani H, Btaouri HEL, et al. *De novo* ceramide synthesis is responsible for the anti-tumor properties of camptothecin and doxorubicin in follicular thyroid carcinoma. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2009 May [cited 2017 Jun 4];41(5):1165–72. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272508004433

309. de Lima VAB, Sørensen JB. Third-line chemotherapy with carboplatin, gemcitabine and liposomised doxorubicin for malignant pleural mesothelioma. Med Oncol

[Internet]. 2015 Feb 9 [cited 2017 Jun 4];32(2):458. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s12032-014-0458-x

310. Arunachalam S, Tirupathi Pichiah PB, Achiraman S. Doxorubicin treatment inhibits PPARγ and may induce lipotoxicity by mimicking a type 2 diabetes-like condition in rodent models. FEBS Lett [Internet]. 2013 Jan 16 [cited 2017 Jun 4];587(2):105–10. Available from: http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2012.11.019

311. Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. Trends Endocrinol Metab [Internet]. 2005 Mar [cited 2017 Jun 4];16(2):59–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734146

312. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. J Clin Invest [Internet]. 1996 Jun 15 [cited 2017 Jun 5];97(12):2859–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675698

313. Hajduch E, Balendran A, Batty IH, Litherland GJ, Blair AS, Downes CP, et al. Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of protein kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. Diabetologia [Internet]. 2001 Feb 5 [cited 2017 Jun 5];44(2):173–83. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s001250051596

314. Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. Diabetes [Internet]. 2001 Nov [cited 2017 Jun 5];50(11):2563–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679435

315. Holloway GP, Han XX, Jain SS, Bonen A, Chabowski A. Chronic muscle stimulation improves insulin sensitivity while increasing subcellular lipid droplets and reducing selected diacylglycerol and ceramide species in obese Zucker rats. Diabetologia [Internet]. 2014 Apr 24 [cited 2017 Jun 5];57(4):832–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00125-014-3169-0

316. Mikłosz A, Łukaszuk B, Baranowski M, Górski J, Chabowski A. Effects of inhibition of serine palmitoyltransferase (SPT) and sphingosine kinase 1 (SphK1) on

palmitate induced insulin resistance in L6 myotubes. Cowart A, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Dec 23 [cited 2017 Jun 5];8(12):e85547. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085547

317. Choeiri C, Staines W, Messier C. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. Neuroscience [Internet]. 2002 [cited 2017 Jun 5];111(1):19–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955709

318. Харченко ВС, Тимофийчук ОА. Возрастные особенности инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в тканях-мишенях. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Ендокринна патологія у віковому аспекті. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю; 2012 Лист. 1-2; Харків. Харків; 2012. с. 87-8.

319. Deevska GM, Nikolova-Karakashian MN. The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation. Biochimie [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Jun 5];93(1):32–8. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908410002117

320. Miura A, Kajita K, Ishizawa M, Kanoh Y, Kawai Y, Natsume Y, et al. Inhibitory effect of ceramide on insulin-induced protein kinase Cζ translocation in rat adipocytes. Metabolism [Internet]. 2003 Jan [cited 2017 Jun 5];52(1):19–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524657

321. Hajduch E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, Dimopoulos N, et al. Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. Biochem J [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2017 Jun 5];410(2):369–79. Available from: http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20070936

322. Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, et al. Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. J Biol Chem [Internet].

2007 Apr 27 [cited 2017 Jun 5];282(17):12450–7. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M700082200

323. Salinas M, López-Valdaliso R, Martín D, Alvarez A, Cuadrado A. Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. Mol Cell Neurosci [Internet]. 2000 Feb [cited 2017 Jun 5];15(2):156–69. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743199908138

324. Merrill AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT, Riley RT. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. Environ Health Perspect [Internet]. National Institute of Environmental Health Science; 2001 May [cited 2017 Nov 5];109 Suppl 2(Suppl 2):283–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359697

325. Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. J Biol Chem [Internet]. 2001 May 4 [cited 2017 Jun 5];276(18):14890–5. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M010286200

326. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. Diabetes [Internet]. 1997 Jun [cited 2017 Jun 5];46(6):983–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9166669

327. Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, et al. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. Am J Physiol - Endocrinol Metab [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2017 Jun 5];284(4):E741–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626325

328. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinas GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. Diabetes [Internet]. 2001 Sep [cited 2017 Jun 5];50(9):2105–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522678

329. Babenko NA, Shakhova EG. Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain. Arch Gerontol Geriatr [Internet]. 2014 May [cited 2017 Jun 5];58(3):420–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167494313001970

330. Larsen PJ, Tennagels N. On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. Mol Metab [Internet]. 2014 Jun [cited 2017 Jun 5];3(3):252–60. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877814000167

331. Galbo T, Shulman GI. Lipid-induced hepatic insulin resistance. Aging (Albany NY) [Internet]. Impact Journals, LLC; 2013 Aug [cited 2017 Jun 5];5(8):582–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929893

332. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem [Internet]. 2009 May 29 [cited 2017 Jun 5];284(22):14809–18. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M901488200

333. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. AJP Endocrinol Metab [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2017 Jun 5];291(2):E275–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492686.

334. Stratford S, DeWald DB, Summers SA. Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. Biochem J [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2017 Jun 5];354(Pt 2):359–68. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171115

335. Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biol [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2017 Jun 5];24(19):8778–89. Available from: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.24.19.8778-8789.2004

336. Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, et al. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. J Biol Chem [Internet]. 2002 Feb 1 [cited 2017 Jun 5];277(5):3085–92. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M103705200

337. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. Cell Metab [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Jun 5];6(6):472–83. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413107003397

338. Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. Diabetes [Internet]. 2004 Jan [cited 2017 Jun 5];53(1):25–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693694

339. Yamashita H, Shao J, Qiao L, Pagliassotti M, Friedman JE. Effect of spontaneous gestational diabetes on fetal and postnatal hepatic insulin resistance in Lepr(db/+) mice. Pediatr Res [Internet]. 2003 Mar [cited 2017 Jun 5];53(3):411–8. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1203/01.PDR.0000049667.58071.7D

340. Li Z, Fan Y, Liu J, Li Y, Huan C, Bui HH, et al. Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2017 Jun 5];32(7):1577–84. Available from: http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.112.251538

341. Kralik SF, Liu P, Leffler BJ, Elmendorf JS. Ceramide and glucosamine antagonism of alternate signaling pathways regulating insulin- and osmotic shock-induced glucose transporter 4 translocation. Endocrinology [Internet]. 2002 Jan [cited 2017 Jun 5];143(1):37–46. Available from: https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.143.1.8606

342. Skovbro M, Baranowski M, Skov-Jensen C, Flint A, Dela F, Gorski J, et al. Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity.

Diabetologia [Internet]. 2008 Jul 6 [cited 2017 Jun 5];51(7):1253–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458871

343. Zeghari N, Younsi M, Meyer L, Donner M, Drouin P, Ziegler O. Adipocyte and erythrocyte plasma membrane phospholipid composition and hyperinsulinemia: a study in nondiabetic and diabetic obese women. Int J Obes Relat Metab Disord [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 Jun 5];24(12):1600–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11126212

344. Mitsutake S, Zama K, Yokota H, Yoshida T, Tanaka M, Mitsui M, et al. Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes. J Biol Chem [Internet]. 2011 Aug 12 [cited 2017 Jun 5];286(32):28544–55. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.255646

345. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with Fusarium moniliforme. J Biol Chem [Internet]. 1991 Aug 5 [cited 2017 Jun 5];266(22):14486–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860857

346. Pickersgill L, Litherland GJ, Greenberg AS, Walker M, Yeaman SJ. Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells. J Biol Chem [Internet]. 2007 Apr 27 [cited 2017 Jun 5];282(17):12583–9. Available from: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M611157200

347. Cutler RG, Mattson MP. Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. Mech Ageing Dev [Internet]. 2001 Jul 15 [cited 2017 Jun 5];122(9):895–908. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348657

348. Van Sluijters DA, Van Woerkom GM, Aerts JM, Meijer AJ. Sphingomyelinase treatment of rat hepatocytes inhibits cell-swelling-stimulated glycogen synthesis by causing cell shrinkage. Eur J Biochem [Internet]. 1999 Dec [cited 2017 Jun 5];266(2):653–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561609

349. Halder K, Banerjee S, Bose A, Majumder S, Majumdar S. Overexpressed PKCδ downregulates the expression of PKCα in B16F10 melanoma: induction of

apoptosis by PKCδ via ceramide generation. Saha B, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Mar 14 [cited 2017 Jun 5];9(3):e91656. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091656

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. Babenko NA, Kharchenko VS. Effects of Aging and Experimentally Induced Modifications of Signal Pathways on Insulin-Induced Shifts of Glucose Metabolism in the Rat Neocortex. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2015 Feb 24 [cited 2017 Jun 4];47(1):16–22. Available from: http://link.springer.com/10.1 007/s11062-015-9491-4 (SCOPUS).

2. Babenko N, **Kharchenko V.** Age-Related Changes in the Phospholipase D-Dependent Signal Pathway of Insulin in the Rat Neocortex. Neurophysiology. 2013;45(2):120-127. (SCOPUS).

3. **Харченко ВС.** Влияние высококалорийной диеты и кверцетина на фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе молодых крыс // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. 2012. [cited 2017 Jun 1]; 15(1008):41–49. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VKhb_2012_1008_15_7

4. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Роль церамідов в нарушении інсулінового сигналинга в диафрагме крыс в условиях in vivo и in vitro. Проблеми ендокринної патології. 2009;1:37–43. 1. [Цитовано 2017 Вер 30]; Available from: http://www.jpep.endocrinology.org.ua/issues/2009_01/2009_01.pdf.

Статті, що входять до міжнародних наукометричних баз

5. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Effects of inhibitors of key enzymes of sphingolipid metabolism on insulin-induced glucose uptake and glycogen synthesis in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2015 Jan 21 [cited 2017 Jun 5];80(1):104–12. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297915010125 (SCOPUS, PubMed).

6. Babenko N, **Kharchenko V.** Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. Int J Endocrinol [Internet].

2015 [cited 2017 Jun 4];2015:794838. Available from: http://www.hindawi.com/journals/ije/2015/794838/ (SCOPUS, PubMed).

7. Babenko N, Hassouneh L, **Kharchenko V**, Garkavenko V. Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells. Age (Omaha) [Internet]. 2012 Aug 28 [cited 2017 Sep 30];34(4):905–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796379 (SCOPUS, PubMed*). (Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

8. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Ceramides inhibit phospholipase D-dependent insulin signaling in liver cells of old rats. Biochemistry (Mosc) [Internet]. 2012 Feb 29 [cited 2017 Jun 1];77(2):180–6. Available from: http://link.springer.com/10.1134/S0006297912020095. (SCOPUS, PubMed).

9. Babenko NA, Semenova YA, **Kharchenko VS.** Effects of Fat-Enriched Diet on the Content of Sphingolipids in the Brain and on Cognitive Functions in Old Rats. Neurophysiology [Internet]. Springer US; 2009 Aug 20 [cited 2017 Sep 30];41(4):258–63. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11062-010-9101-4. (SCOPUS). *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних досліджень, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

Тези науково-практичних конференцій різного рівня

10. Бабенко НА, **Харченко ВС**. Роль фосфолипазы Д в сигнальном каскаде инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання); 2014 Бер. 13-14; Харків. Харків; 2014. с. 25-6.

11. **Харченко ВС.** Экспериментально индуцированные изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах молодых крыс. В: Фізіол. журн. (Додаток). Матеріали XIX-го з’їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю; 2014; Київ. Київ; 2014. Т. 6(3). с. 148-9.

12. **Харченко ВС**, Белый АН, Бабенко НА. Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д при паклитаксел-индуцированной инсулинорезистентности. В: Укр. біохім. журнал. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу; 2014 Жовт. 6-10; Київ. Київ; 2014. Т. 86(1). с. 216. *(Здобувач брав участь у постановці модельного експерименту, заборі біологічного матеріалу, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

13. Стороженко ГВ, **Харченко ВС**, Бабенко НА. Церамид и фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конференції «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Дванадцяті Данилевські читання); 2013 Бер. 14-15; Харків. Харків; 2013. с. 130-1. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проводив біохімічні дослідження, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, брав участь у обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

14. Babenko NA, **Kharchenko VS.** Ceramide synthesis *de novo* involved in insulin signaling disruption and insulin resistance development at old age. III International Symposium Intracellular signaling and bioactive molecules design; 2012 Sept 17-23; Lviv (Ukraine); 2012. 134 p.

15. **Харченко ВС**, Тимофийчук ОА. Возрастные особенности инсулин-индуцированного поглощения глюкозы в тканях-мишенях. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Ендокринна патологія у віковому аспекті. Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю; 2012 Лист. 1-2; Харків. Харків; 2012. с. 87-8. *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

16. **Харченко ВС.** Фосфолипаза Д-зависимый сигналинг инсулина в неокортексе крыс. возрастные и индуцированные изменениюю. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы X междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2012 Мая 16-19; Харьков. Харьков; 2012. с. 63-4.

17. **Харченко ВС.** Роль церамидов в нарушении передачи фосфолипаза Д-зависимого сигнала инсулина в неокортексе крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Одинадцяті Данилевські читання); 2012 Бер. 1-2; Харків. Харків, 2012. с.137-8.

18. **Харченко ВС.** Активация инсулином фосфолипазы Д в гепатоцитах крыс. возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы IX междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2010 Мая 26-29; Харьков. Харьков, 2010. с. 28-9.

19. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Возрастные и индуцированные церамидом и пальмитиновой кислотой изменения сигналинга инсулина в гепатоцитах крыс. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті; 2009 Жовт 29-30; Харків. Харків; 2009. с. 16-7.

20. Бабенко НА, **Харченко ВС.** Роль церамида в регуляции активности фосфолипазы Д и модуляции состояния инсулинорезистентности. В: Асоціація патологів україни Запорізький медичний університет. Матеріали V нац. конгресу патофізіологів України Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів; 2008 Вер. 17-19; Запоріжжя. Запоріжжя; 2008. Т. 5(2). с. 85.

21. Куликова (**Харченко**) ВС. Содержание липидов и индукция инсулином обмена ФХ и фосфатидилэтаноламина в коре головного мозга молодых крыс в условиях высококалорийного рациона и введения кверцетина. В: ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им В.Я. Данилевского НАМН Украины». Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи» (Сьомі Данилевські читання); 2008 Лют. 21-22; Харків. Харків; 2008. с. 97.

22. Куликова (**Харченко**) ВС, Никитина ИВ. Возрастные особенности индукции инсулином фосфолипазы Д в коре головного мозга крыс. Влияние кверцетина на сигналинг инсулина в старости. В: Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Материалы VIII междунар. симп. «Биологические механизмы старения»; 2008 Мая 21-24; Харьков. Харьков, 2008. с. 34. *(Здобувач брав участь у проведенні експерименту та обговоренні результатів досліджень, оформлював одержані дані у вигляді тез доповіді).*

Статті, що додатково відображають зміст дисертації

23. Бабенко Н. А., Белый А. Н., **Харченко ВС.** Роль церамидов с различной длиной ацильной цепи в нарушении функционального состояния клеток печени. Таврический медико-биологический. вестник. 2013 [cited 2017 Sep 30];3(61):29–34. 1. Available from: http://www.csmu.edu.ua/res/200917/Tmbv_2013_16_1(3)__7.pdf *(Здобувач брав участь у постановці експерименту, проведенні біохімічних дослідженнь, здійснював статистичний аналіз одержаних даних).*

Електронне видання

24. **Харченко ВС**, Стороженко ГВ. Влияние насыщенных жиров диеты на содержание липидов и регуляцию инсулином фосфолипазы Д в тканях крыс. Research [Internet]. 2014 May 20 [cited 2017 Sep 30];ru1. Available from: http://www.labome.ru/research/The-effects-of-high-fat-diet-on-lipid-content-and-

regulation-of-phospholipase-D-by-insulin-in-rat-ti.html *Дата звернення* 2014-05-20, *дата обновления 2016-04-21 (Здобувач брав участь в плануванні та самостійно виконував експериментальну частину роботи, здійснював статистичний аналіз даних, оформлював одержані дані у формі статті).*

Апробація результатів дисертації

1. VIII международный симпозиум «Биологические механизмы старения» Харьков, 21-24 мая 2008. Очна форма участі.

2. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Фундаментальна та клінічна ендокринологія: проблеми, здобутки, перспективи (Сьомі Данилевські читання)». Харків, 21-22 лютого 2008. Очна форма участі.

3. V національний конгрес патофізіологів України «Сучасні проблеми патофізіології від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів». Запоріжжя, 17-19 вересня 2008. Заочна форма участі.

4. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Проблемні питання ендокринології у віковому аспекті». Харків, 29-30 жовтня. 2009. Очна форма участі.

5. IX международный симпозиум «Биологические механизмы старения». Харьков, 26-29 мая 2010. Очна форма участі.

6. Науково-практична конференція «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Одинадцяті Данилевські читання)». Харків, 1-2 березня 2012. Очна форма участі.

7. X международный симпозиум «Биологические механизмы старения». Харьков, 16-19 мая 2012. Заочна форма участі.

8. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Ендокринна патологія у віковому аспекті». Харків, 1-2 листопада 2012. Заочна форма участі.

9. III International Symposium «Intracellular signaling and bioactive molecules design». Lviv Ukraine, 17-23 september 2012. Заочна форма участі.

10. Науково-практична конференція «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Дванадцяті Данилевські читання)». Харків 14-15 березня 2013. Очна форма участі.

11. XI Український біохімічний конгрес. Київ, 6-10 жовтня. 2014. Заочна форма участі.

12. XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю. Київ 2014. Заочна форма участі.

13. Науково-практична конференція «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Тринадцяті Данилевські читання)». Харків 13-14 березня 2014. Очна форма участі.

ДОДАТОК 2

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з навчальної та інноваційної роботи Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна

М. О. Азарєнков

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертаційної роботи Харченко Віталіни Сергіївни «Роль сфінголіпідів в модуляції фосфоліпаза Д-залежного сигналінга інсуліна в старості» у навчальні курси на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Комісія у складі: завідувача кафедри молекулярної біології та біотехнології, доктора біологічних наук, професора Божкова А. І., заступника декана з навчальної роботи біологічного факультета, кандидата біологічних наук, доцента Наглова О. В. та голови методичної комісії біологічного факультета, кандидата біологічних наук, доцента Мартиненко В. В. встановила, що результати кандидатської дисертації Харченко В. С., а саме: особливості регуляції фосфоліпази Д в процесі передавання сигналу інсуліну в морфо-функціонально різних тканинах впроваджені в навчальний процес кафедри фізіології людини та тварини біологічного факультету у рамках спеціальних курсів: «Ендогенні модулятори фізіологічних функцій» та «Клітинні системи сигнальної трансдукції» для студентів 5-го курсу біологічного факультету за ОКР «Магістр».

Завідувач кафедри
молекулярної біології та
біотехнології,
д.б.н., професор — А. І. Божков

Заступника декана з навчальної
роботи біологічного
факультета,
к.б.н., доцент — О. В. Наглов

Голова методичної комісії,
заступник декана
біологічного факультету,
к.б.н., доцент — В. В. Мартиненко