

ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ ЖИРАМИ ДИЕТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ СФИНГОЛИПИДОВ В МОЗГУ И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ У СТАРЫХ КРЫС

Поступила 08.06.09

Показано, что длительное содержание крыс (от 15- до 24-месячного возраста, 36 недель) на пищевом рационе, обогащенном насыщенными жирами, сопровождается увеличением уровней свободных жирных кислот и меченого ($[^{14}\text{C}]$) церамида в печени, мышцах и мозгу по сравнению с соответствующими уровнями у контрольных старых животных этого же возраста (24 месяца). Диета с высоким содержанием насыщенных жиров обуславливает повышенное содержание синтезированных *de novo* сфинголипидов в неокортексе и гиппокампе 24-месячных крыс. Высокие уровни церамида и сфингозина в неокортексе и гиппокампе старых крыс, обеспечиваемые влиянием упомянутой диеты, коррелируют со значительным ухудшением условнорефлекторной деятельности животных (рефлекс активного избегания в челночной камере).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: алиментарные факторы, насыщенные жиры, старение, сфинголипиды, когнитивные функции.

ВВЕДЕНИЕ

Алиментарные факторы, в заметной степени модулирующие обмен липидов, существенно влияют на функциональную активность различных тканей, органов и систем организма. Среди многочисленных компонентов пищевого рациона особое значение имеют жиры (триглицериды). Показано, что чрезмерное содержание жиров в пищевом рационе заметно увеличивает вероятность возникновения нейродегенеративных заболеваний. Высокая степень насыщенности жирных кислот, поступающих с пищей, является одним из критических факторов риска развития болезни Альцгеймера [1, 2]. Повышение уровня насыщенных жирных кислот в плазме крови и тканях в процессе развития ожирения, диабета и при травматическом повреждении мозга коррелирует с увеличением вероятности возникновения нейродегенеративных заболеваний [3, 4].

Результаты исследований, проведенных на экспериментальных животных, показали, что рационы, обогащенные жирами (21–40 %) и/или холестерином (0.15–1 %), обуславливают развитие патофизиологических изменений мозга, подобных нарушениям, возникающим при болезни Альцгеймера [5, 6].

Кормление крыс в течение трех месяцев пищей, содержащей в себе значительные количества насыщенных жиров, сопровождается ухудшением процессов обучения и формирования памяти, причем такие изменения наиболее выражены у старых животных [5]. Таким образом, существует определенная информация об индуцированных алиментарными факторами структурно-функциональных изменениях мозга, однако физиологические механизмы, лежащие в основе подобных сдвигов, остаются во многом не ясными.

Установлено, что добавление в среду культивирования кортикальных нейронов крыс насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой) сопровождается усилением амилоидогенеза [7, 8]. Пальмитиновая кислота значительно усиливает в клетках астроглии *de novo*-синтез сфинголипида церамида; увеличение же уровня последнего индуцирует образование бета-амилоида и гиперфосфорилирование белка *tau*, что способствует формированию альцгеймерподобных изменений в нейронах [7].

Сфинголипиды представляют собой класс биоактивных молекул, который начал привлекать особый интерес. Эти соединения являются компонентами биологических мембран и участвуют в регуляции

¹ НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (Украина).

Эл. почта: babenko@univer.kharkov.ua (Н. А. Бабенко);
yaroslava2611@yandex.ru (Я. А. Семенова);
vitalina8@ukr.net (В. С. Харченко).

процессов роста и апоптоза клеток [9]. Эндогенный активный пул церамида образуется главным образом в результате синтеза данного липида в ходе реакции конденсации пальмитоил-коэнзима А (CoA) и серина или гидролиза сфингомиелина при участии сфингомиелиназ. Наиболее важные функции церамида связаны с его способностью регулировать терминальную дифференцировку нейронов, старение клеток, их пролиферацию и смерть. Воздействие экзогенного церамида вызывает экспрессию маркера старения клеток – β -галактозидазы, индуцирует дефосфорилирование pRb и его активацию, ингибирует регулятор клеточного цикла Cdk2, увеличивает концентрацию ингибиторов Cdk (p21/Sdi и p27/Kip1). Эти изменения индуцируют «арест» клеточного цикла и приводят к развитию морфологических изменений, характерных для старой клетки [10].

Внутриклеточное содержание церамида повышается в процессе старения клеток; соответствующие сдвиги выявляются и в отдельных органах в процессе старения организма [11–13]. Содержание церамида в головном мозгу возрастает в процессе нормального старения человека; при развитии болезни Альцгеймера данные изменения более интенсивны [11]. Уровни эндогенного церамида в гиппокампе и неокортексе 24-месячных крыс заметно увеличиваются по сравнению с соответствующим показателем у месячных животных. Это происходит на фоне значительного повышения в указанных структурах мозга содержания предшественников сфинголипидов – свободных жирных кислот [13].

Экспрессия синтазы церамида в мозгу значительно выше, чем в других тканях. Ген *LAG1Hs*, кодирующий этот фермент, является гомологом гена *LAG1*, обеспечивающего длительность жизни дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*) [14]. Установлено, что ингибитор синтеза эндогенного церамида фумонизин В1 снижает накопление амилоидного бета-белка в кортикальных нейронах в результате стабилизации бета-секретазы BACE1. Экзогенный С6-церамид, легко проникающий в клетку, увеличивает в клетках содержание таких сфинголипидов и предотвращает подавление амилоидогенеза, индуцированное фумонизином В1 [15].

С учетом важной роли церамида в процессе старения клеток и индукции альцгеймерподобных изменений в нейронах мы в настоящей работе изучали влияние длительного воздействия пищевого рациона, обогащенного насыщенными жирами, на содержание сфинголипидов в гиппокампе и не-

кортексе старых крыс, а также изменения когнитивных функций у таких животных.

МЕТОДИКА

Все исследования на животных проводили с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985), и национальных Общих этических принципов экспериментов на животных (Киев, 2001). В экспериментах использовали 15-месячных крыс-самцов линии Вистар массой 400–420 г. Контрольные крысы ($n = 12$) вплоть до 24-месячного возраста содержались на стандартном рационе вивария (количество белков по калорийности – 12 %, жиров – 14 % и углеводов – 75 %). Крысы экспериментальной группы ($n = 12$) дополнительно получали в течение этого же периода говяжий жир. Рацион данной группы включал в себя 9 % белков, 32 % жиров и 59 % углеводов (по калорийности); общая калорийность такой диеты превышала таковую у контрольной группы животных на 17 %.

Содержание липидов. Животных умерщвляли после наркотизации диэтиловым эфиром. Мозг и мышечную ткань диафрагмы быстро извлекали, области неокортекса и гиппокампа выделяли на льду. Печень перфузировали охлажденным 0.9 %-ным раствором NaCl. Кусочки изучаемых тканей инкубировали в буфере Кребса–Хензеляйта (рН 7.5) в присутствии $^{14}\text{C}_3\text{H}_7\text{COONa}$ (10 мкКи/мл) в течение 90 мин. Экстракцию липидов из гомогенатов тканей проводили по методу Блая и Дайера [16]. Экстракты липидов, предназначенные для анализа сфинголипидов, выпаривали в вакууме и инкубировали 60 мин при 37 °С в среде хлороформ – метанол (объемное соотношение – ОС 1:1), к которой добавляли 0.1 М КОН для гидролиза ацилглицеролов. Липиды снова экстрагировали и разделяли на классы (сфингомиелин – СФМ, церамид и сфингозин) с использованием тонкослойной хроматографии на коммерческих пластинках Sorbfil («Сорбполимер», РФ) в системе растворителей хлороформ – этилацетат – изопропиловый спирт – метанол – 0.25 % KCl (ОС 25:25:25:10:9). Свободные жирные кислоты (СЖК) растворяли в системе растворителей гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота – вода (ОС 130:20:30:100). Пятна СЖК, СФМ и церамида проявляли в парах йода. Пятна сфингозина проявляли

путем обработки хроматограмм 3 %-ным раствором нингидрина в насыщенном водой бутаноле и идентифицировали путем сравнения со стандартами. Для количественного определения содержания церамидов в исследованных тканях пятна липидов переносили в пробирки и элюировали смесью хлороформа с метанолом (ОС 1:1) с последующим элюированием метанолом. Объединенные элюаты выпаривали в вакууме и подвергали гидролизу в растворе 0.5 М HCl в метаноле при 65 °С в течение 15 ч. Массу церамидов определяли по высвобождению длинноцепочечных оснований в ходе гидролиза липидов по методу Лаутера – Трамса [17]. Для установления содержания СЖК применяли метод Марча – Венстейна [18]. Радиоактивность меченых липидов измеряли в сцинтилляционной жидкости с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Содержание общего белка определяли по методу Лоури [19].

Поведенческие характеристики. Условный рефлекс активного избегания болевого раздражения вырабатывали в челночной камере с двумя отделениями и электрифицированным полом. Условным стимулом был световой (включение электрической лампы 30 Вт); его предъявляли за 5 с до нанесения безусловного электроболевого раздражения конечностей (ток 0.8–1 мА, подаваемый через электродный пол поочередно то в одном, то в другом отделении). Условнорефлекторными реакциями считали вызванные включением света переходы из одного отделения в другое, если их латентный период составлял менее 5 с.

Ежедневный сеанс обучения для каждого животного состоял из 30 предъявлений условного сигнала с интервалами 30–90 с. Обучение продолжалось до такой степени воспроизводимости условного рефлекса активного избегания, когда животное выполняло девять условнорефлекторных переходов на 10 предъявлений условного сигнала. Ежедневно регистрировали количество условнорефлекторных реакций избегания и реакций избавления в пределах сеанса обучения и задержки выполнения этих рефлексов (с), а также общую продолжительность обучения до достижения выбранного критерия [20].

Для статистического анализа влияния диеты с повышенным содержанием насыщенных жиров на содержание липидов в мозгу, печени и диафрагме старых животных использовали дисперсионный анализ (критерий Ньюмена – Кейлса); при оценке выработки условного рефлекса активного избегания в челночной камере применяли непараметриче-

ский критерий Манна – Уитни. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5 %. Анализ данных производился с помощью пакета программ «STATISTICA 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что увеличение калорийности рациона и повышение количества жирных кислот, поступающих в организм, сопровождаются увеличением содержания насыщенных СЖК, нейтральных липидов и церамидов в сыворотке крови, печени и скелетных мышцах животных и человека [21, 22]. Хроническое накопление СЖК и их метаболитов – диацилглицеролов и церамидов – в периферических тканях приводит к ингибированию фосфатидилинозит-3-киназы и протеинкиназы В; эти сдвиги лежат в основе развития состояния инсулинорезистентности. Полагают, что эффекты избыточного поступления насыщенных жиров в организм (развитие диабета типа 2 и ожирения) ассоциированы с когнитивной дисфункцией и значительным увеличением риска возникновения болезни Альцгеймера [5, 23–25].

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что содержание СЖК и церамида в гиппокампе, коре мозга и клетках печени старых (24-месячных) крыс значительно повышается по

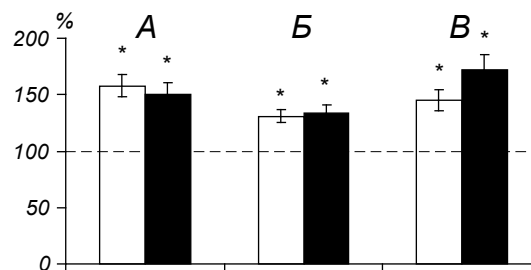


Рис. 1. Влияние длительного потребления пищи, обогащенной насыщенными жирами, на содержание свободных жирных кислот (белые столбцы) и церамида (черные столбцы) в печени (А), мышцах диафрагмы (Б) и мозгу (В) 24-месячных крыс. Представлены нормированные значения; за 100 % принято содержание указанных соединений в тканях контрольных крыс. Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий при сравнении крыс опытной и контрольной групп; $P < 0.05$.

Рис. 1. Вплив тривалого споживання їжі, збагаченої насиченими жирами, на вміст вільних жирних кислот (білі стовпчики) і цераміду (чорні стовпчики) у печінці (А), м'язах діафрагми (Б) і мозку (В) 24-місячних щурів.

сравнению с соответствующими показателями у трехмесячных животных [12, 13]. Наши же наблюдения показывают, что длительное (в течение 36 недель) содержание животных на пищевом рационе, обогащенном насыщенными жирами, сопровождается еще более значительным увеличением уровней СЖК и церамида в печени, мышцах и мозгу 24-месячных крыс по сравнению с аналогичными индексами у контрольных животных этого же возраста (рис. 1).

Одна из СЖК – пальмитиновая кислота – предшественник синтеза сфинголипидов в различных тканях; доступность субстратов является лимитирующим фактором данного процесса. В условиях культуры клеток введение в среду пальмитиновой кислоты усиливает процессы синтеза сфинголипидов и церамида [4]. Результаты наших экспериментов показали, что содержание вновь синтезированного СФМ в гиппокампе и неокортексе экспериментальных старых животных аналогично, а содержание церамида и сфингозина – выше, чем соответствующий показатель у контрольных крыс (рис. 2).

Известно, что сфингозин образуется в клетках исключительно в результате деградации церамида при участии церамидаз; наряду с церамидом сфингозин токсичен для клетки, и повышение его содержания индуцирует процессы апоптоза или некроза [9]. Можно полагать, что церамид, синтезированный

новый *de novo*, в гиппокампе и коре мозга старых крыс, содержащихся на высококалорийном «жировом» рационе, подвергается воздействию церамидаз и превращению в сфингозин. С таким предположением согласуются данные об увеличении экспрессии и активности кислой церамидазы в сомах нейронов головного мозга пациентов с когнитивной дисфункцией [26]. Экспрессия церамидазы и накопление сфингозина несколько усиливаются в мозгу и в процессе нормального старения организма [10].

В то же время результаты экспериментов на относительно молодых (восьмимесячных) крысах, потреблявших в течение 16 недель высокожировую диету, показали, что содержание сфингозина в скелетных мышцах у таких животных мало отличается от уровня данного сфинголипида у контрольных крыс. Это, очевидно, обеспечивалось компенсаторным превращением сфингозина в его нетоксичный пропролиферативный аналог – сфингозин1-фосфат [27]. Сфингозин1-фосфат и сфингозинкиназа обнаруживаются в самых различных отделах головного мозга – мозжечке, коре, гиппокампе и стволе мозга [28]. Наиболее интенсивное превращение сфингозина в сфингозин1-фосфат происходит в мозжечке, а наиболее низкая активность сфингозинкиназы обнаружена в гиппокампе. Можно предположить, что в условиях наших экспериментов активация церамидаз под действием жиронасыщенного пищевого рациона на фоне медленного превращения сфингозина в сфингозин1-фосфат является основной причиной накопления сфингозина в изученных структурах мозга. В гиппокампе, где интенсивность превращения сфингозина в сфингозин1-фосфат невысока [28], наблюдается более интенсивное, чем в коре, накопление сфингозина под действием экспериментальной диеты (рис. 2).

Следует отметить, что для различных отделов головного мозга характерна разная интенсивность метаболизма жирных кислот [29]. Гиппокамп и кора мозга – структуры, вовлеченные в формирование памяти и наиболее интенсивно подвергающиеся структурно-функциональным изменениям в процессе развития нейродегенеративных заболеваний, – отличаются особо интенсивным метаболизмом данных кислот. Ввиду этого при аномально высоком содержании пальмитиновой кислоты наиболее интенсивное накопление церамида и альцгеймерподобные структурно-функциональные изменения астроглиальных клеток и нейронов отмечаются именно в гиппокампе и коре мозга [4].

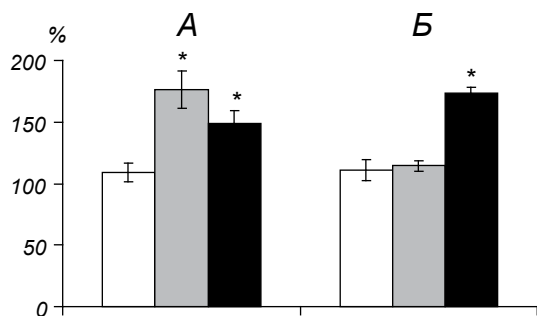
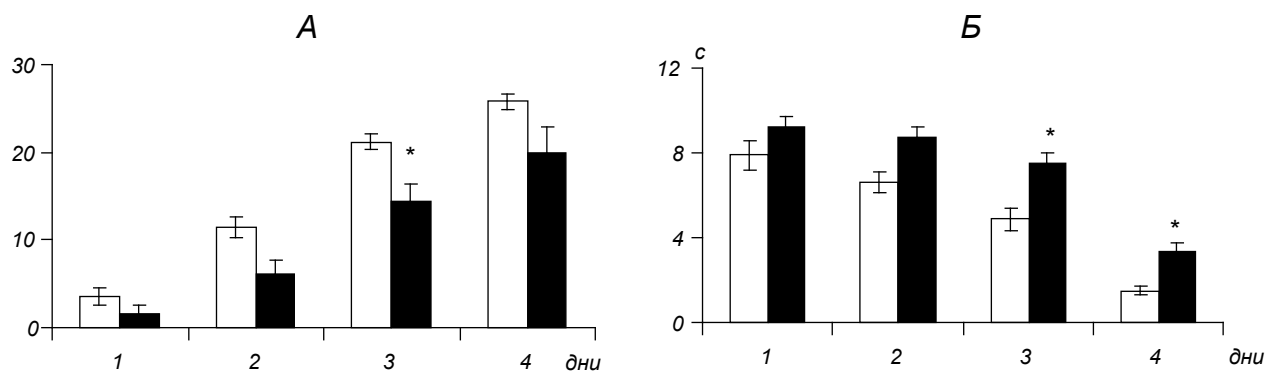


Рис. 2. Влияние длительного потребления пищи, обогащенной насыщенными жирами, на содержание синтезированных *de novo* сфингомиелина, сфингозина и церамида (белые, заштрихованные и черные столбцы соответственно) в неокортексе (А) и гиппокампе (Б) 24-месячных крыс. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Рис. 2. Вплив тривалого споживання їжі, збагаченої насиченими жирами, на вміст синтезованих *de novo* сфінгомієліну, сфінгозину та цераміду (білі, заштриховані та чорні стовпчики відповідно) у неокортексі (А) та гіпокампі (Б) 24-місячних шурів.



Р и с. 3. Влияние длительного потребления пищи, обогащенной насыщенными жирами, на число условнорефлекторных реакций активного избегания (*A*) и их латентные периоды (*B*) у 24-месячных крыс контрольной (белые столбцы) и экспериментальной (черные столбцы) групп.

По оси абсцисс – число активных избеганий (*A*) и длительность латентного периода, с (*B*); по оси ординат – дни тестирования. Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий при сравнении крыс опытной и контрольной групп, $P = 0.032$.

Р и с. 3. Вплив тривалого споживання їжі, збагаченої насиченими жирами, на кількість умовнорефлекторних реакцій активного уникання (*A*) та їх латентні періоди (*B*) у 24-місячних щурів контрольної (білі стовпчики) та експериментальної (чорні стовпчики) груп.

В условиях потребления пищи, обогащенной жирами, а также при развитии ожирения содержание насыщенных жирных кислот в плазме крови увеличивается. Насыщенные жирные кислоты захватываются астроглиальными клетками и используются в синтезе эндогенных церамидов. Церамиды, индуцируя секрецию цитокинов [30] и/или NO [31] клетками астроглии, могут обуславливать усиление образования реактивных форм кислорода, воздействующих на нейроны [27]. Индуцированный действием церамида оксидативный стресс может приводить к увеличению активности бета-секретазы BACE1 и активации стрессрегулируемых киназ (cdk5 и GSK-3) в нейронах, что в итоге приводит к образованию бета-амилоида и гиперфосфорилрованию белка *tau* [4].

Учитывая то, что длительное содержание старых крыс на рационе, обогащенном насыщенными жирами, сопровождается накоплением насыщенных СЖК и избыточным синтезом церамидов и сфингозина в гиппокампе и неокортексе (рис. 1; 2), а также данные об индукции в нейронах изменений, характерных для болезни Альцгеймера, в результате синтеза церамида в клетках астроглии [4], можно было ожидать развития негативных изменений функциональной активности изученных структур мозга в условиях наших экспериментов.

Тестирование условнорефлекторной деятельности показало, что спонтанная моторная активность исследуемых 24-месячных крыс в период их

адаптации к обстановке челночной камеры не демонстрировала существенных межгрупповых различий. Среднее количество спонтанных переходов из отсека в отсек в пределах периода наблюдения составляло 6.6 ± 0.51 и 5.6 ± 1.12 в контрольной и опытной группах животных соответственно ($P > 0.05$) [20].

Длительное потребление говяжьего жира стареющими крысами приводило к выраженному снижению их когнитивных функций. Число активных условнорефлекторных избеганий в челночной камере у крыс экспериментальной группы на третий день эксперимента было явно ниже, чем в контроле (рис. 3, *A*). У животных, которые содержались на рационе, обогащенном жиром, латентные периоды реакции избегания на третий и четвертый день тестирования превышали соответствующие показатели у контрольных животных (*B*). Кроме того, длительное потребление говяжьего жира животными сопровождалось заметной тенденцией к увеличению количества сочетаний раздражителей, необходимого для формирования условного рефлекса активного избегания (экспериментальная группа – 81.80 ± 3.51 , контроль – 69.60 ± 3.30 ; $P = 0.056$).

Сообщалось, что при использовании различных видов тестирования молодые животные, получавшие дополнительные количества насыщенных жиров, также демонстрировали ухудшение когнитивных показателей. Так, у половозрелых молодых крыс, потреблявших в течение 12 недель говяжий

жир в избыточном количестве, отмечалось значительное ухудшение таких показателей в тестировании VIDA (variable interval delayed alternation) [32]. В работе Гринвуда и соавт. [33] было выявлено, что форсированное скормливание крысам насыщенного жира (свиного) приводило к заметному снижению показателей тестов прохождения различных лабиринтов (Олтона, Хебба – Вильямса) по сравнению с таковыми у животных, в рацион которых входило соевое масло [33]. Диета, обогащенная насыщенными жирами, индуцировала воспалительную активацию микроглии в гиппокампе, ассоциированную с ухудшением результатов тестирования животных в восьмирукавном водном лабиринте [24].

Учитывая тот факт, что накопление церамидов и сфингозина в тканях старых организмов связано с развитием хронических воспалительных процессов [11, 12], причем такое накопление ассоциировано с морфологическими и функциональными нарушениями в гиппокампе и коре мозга [7, 11, 24], можно заключить, что повышение уровней сфинголипидов в мозгу при длительном избыточном потреблении насыщенных жиров (особенно стареющими организмами) является одним из важных факторов, обуславливающих ухудшение условнорефлекторной деятельности у таких животных.

Авторы выражают искреннюю благодарность проф., докт. биол. наук. Т. М. Воробьевой за помощь в обсуждении полученных результатов.

Н. О. Бабенко¹, Я. О. Семенова¹, В. С. Харченко¹

ВПЛИВ ЗБАГАЧЕНОЇ ЖИРАМИ ДІЄТИ НА ВМІСТ СФІНГОЛІПІДІВ У МОЗКУ ТА КОГНІТИВНІ ФУНКЦІЇ У СТАРИХ ЩУРІВ

¹НДІ біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна (Україна).

Резюме

Показано, що тривале утримування щурів (від 15- до 24-місячного віку, 36 тижнів) на харчовому раціоні, збагаченому насиченими жирами, супроводжується збільшенням рівнів вільних жирних кислот і міченого (¹⁴C) цераміду в печінці, м'язах і мозку порівняно з відповідними рівнями у контрольних старих тварин того ж самого віку (24 місяці). Діета з високим вмістом насичених жирів зумовлює підвищений вміст синтезованих *de novo* сфинголипидов у неокортексі й гіпокампі 24-місячних щурів. Високі рівні цераміду й сфингозину в неокортексі та гіпокампі старих щурів, забезпечені

впливом згаданої дієти, корелюють зі значним погіршенням умовнорефлекторної діяльності тварин (рефлекс активного уникання в човниковій камері).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. V. Solfrizzi, A. D'Intronto, A. M. Colacicco, et al., "Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia," *Exp. Gerontol.*, **40**, 257-270 (2005).
2. N. Scarmeas, Y. Stern, M. X. Tang, et al., "Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease," *Ann. Neurol.*, **59**, No. 6, 912-921 (2006).
3. R. A. Whitmer, E. P. Gunderson, E. Barrett-Connor, et al., "Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study," *BMJ*, **330**, No. 7504, 1360 (2005).
4. S. Patil, J. Melrose, and C. Chan, "Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons," *Eur. J. Neurosci.*, **26**, No. 8, 2131-2141 (2007).
5. G. Winocur and C. E. Greenwood, "Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model," *Neurobiol. Aging*, **26**, Suppl. 1, 46-49 (2005).
6. M. Oksman, H. Iivonen, E. Högges, et al., "Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice," *Neurobiol. Dis.*, **23**, No. 3, 563-572 (2006).
7. S. Patil and C. Chan, "Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons," *Neurosci. Lett.*, **384**, No. 3, 288-293 (2005).
8. S. Patil, L. Sheng, A. Masserang, et al., "Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons," *Neurosci. Lett.*, **406**, Nos. 1/2, 55-59 (2006).
9. Y. A. Hannun and L. M. Obeid, "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, No. 2, 139-150 (2008).
10. L. M. Obeid and Y. A. Hannun, "Ceramide, stress, and a "LAG" in aging," *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **2003**, No. 39, PE27 (2003).
11. R. G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, et al., "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, No. 7, 2070-2075 (2004).
12. N. Babenko and E. Shachova, "Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats," *Exp. Gerontol.*, **41**, 32-39 (2005).
13. Л. Хассунех, Я. О. Семенова, О. А. Красильникова та ін., "Вікові особливості вмісту сигнальних ліпідів у печінці та мозку щурів", *Фізіол. журн.*, **52**, № 6, 79-84 (2006).
14. J. C. Jiang, P. A. Kirchman, M. Zagulski, et al., "Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in Caenorhabditis elegans and human," *Genome Res.*, **8**, No. 12, 1259-1272 (1998).
15. L. Puglielli, B. C. Ellis, A. J. Saunders, et al., "Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis," *J. Biol. Chem.*, **278**, No. 22, 19777-19783 (2003).
16. E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, No. 8, 911-917 (1959).

17. C. J. Lauter and E. G. Trams, "On the isolation and characterization of gangliosides," *J. Lipid. Res.*, **3**, 135-138 (1962).
18. J. B. March and D. B. Weinstein, "Simple charring method for determination of lipids," *J. Lipid. Res.*, **7**, No. 4, 574-580 (1966).
19. O. N. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., "Protein measurement with the folin phenol reagent," *J. Lipid. Res.*, **193**, 365-375 (1951).
20. Я. Буреш, О. Бурешова, П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
21. L. K. Pulawa and R. H. Eckel, "Overexpression of muscle lipoprotein lipase and insulin sensitivity," *Current Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **5**, No. 5, 569-574 (2002).
22. M. Haag and N. G. Dippenaar, "Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection," *Med. Sci. Monit.*, **11**, No. 12, 359-367 (2005).
23. M. D. Parrott and C. E. Greenwood, "Dietary influences on cognitive function with aging: from high-fat diets to healthful eating," *Ann. New York Acad. Sci.*, **1114**, 389-397 (2007).
24. A. C. Granholm, H. A. Bimonte-Nelson, A. B. Moore, et al., "Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat," *J. Alzheimers Dis.*, **14**, No. 2, 133-145 (2008).
25. K. F. Neumann, L. Rojo, L. P. Navarrete, et al., "Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links and clinical implications," *Current Alzheimer Res.*, **5**, No. 5, 438-447 (2008).
26. Y. Huang, H. Tanimukai, F. Liu, et al., "Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain," *Eur. J. Neurosci.*, **20**, No. 12, 3489-3497 (2004).
27. T. Wei, C. Chen, J. Hou, et al., "Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells," *Biochim. Biophys. Acta*, **1498**, No. 1, 72-79 (2000).
28. N. Blondeau, Y. Lai, S. Tyndall, et al., "Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain," *J. Neurochem.*, **103**, No. 2, 509-517 (2007).
29. A. Szutowicz and W. Lysiak, "Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain," *J. Neurochem.*, **35**, No. 4, 775-785 (1980).
30. K. Lieb, B. L. Fiebich, M. Hell, et al., "Potent inhibition of interleukin-6 expression in a human astrocytoma cell line by tenidap," *Cell. Tissue Res.*, **288**, No. 2, 251-257 (1997).
31. K. Pahan, F. G. Sheikh, M. Khan, et al., "Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes," *J. Biol. Chem.*, **273**, No. 5, 2591-2600 (1998).
32. C. E. Greenwood and G. Winocur, "Glucose treatment reduces memory deficits in young adult rats fed high-fat diets," *Neurobiol. Learn. Mem.*, **75**, No. 2, 179-189 (2001).
33. C. E. Greenwood and G. Winocur, "Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet," *Behav. Neurol. Biol.*, **53**, No. 1, 74-87 (1990).