

*На правах рукописи*

**Лапшина  
Ксения Валерьевна**

**ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа  
ПРИ ДЕПРИВАЦИИ СНА И ЭНДОТОКСЕМИИ**

03.03.01. – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2011

Работа выполнена в лаборатории сравнительной термофизиологии  
Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии  
и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент  
**Екимова Ирина Васильевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Аристакесян Евгения Аветиковна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Клименко Виктор Матвеевич**

Ведущая организация: **Санкт-Петербургский Государственный  
Университет**

Защита диссертации состоится «10» мая 2011 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Человек около третьей части своей жизни тратит на сон. Продолжительное лишение сна несовместимо с жизнью. Большинство взрослых хотя бы однажды испытывали проблемы со сном, более четверти людей имеют те или иные его нарушения. Среди нарушений сна наиболее часто встречается инсомния, которая характеризуется затруднением засыпания или сокращением времени сна. К развитию инсомнии могут приводить нарушения режима сна, стрессовые факторы, чрезмерные умственные и физические нагрузки, различные неврологические заболевания [Левин, 2007, 2008]. В свою очередь, инсомния может провоцировать развитие неврозов, ослабление иммунитета, нарушение терморегуляции и других физиологических функций [Mullington et al., 2009]. Большая социальная значимость инсомнии определила разработку моделей, имитирующих нарушение сна. Одной из таких моделей является депривация (лишение) сна, сопровождающаяся эмоциональным стрессом и физическим напряжением. По наблюдениям клиницистов, нарушение режима сна и увеличение длительности бодрствования во время эндотоксемии, вызванной бактериальной или вирусной инфекцией, значительно затягивают процесс выздоровления. Особенности нарушений сна и терморегуляции, вызванные депривацией сна в условиях эндотоксемии, не изучались. Наиболее интересным объектом для этого исследования могут оказаться птицы, температура тела которых составляет 40-41 °С и при эндотоксемии может повышаться еще на 1-1.5 °С, достигая “красной” черты перегревания [Веселкин, 1963; Nomoto, 1997]; кроме того, они имеют ряд особенностей в организации сна [Rattenborg et al., 2009].

Лечение расстройств сна является одной из наиболее актуальных проблем сомнологии, поскольку успешность терапевтической коррекции этого нарушения ограничена рядом побочных эффектов снотворных препаратов и привыканием к ним [Pleuvry, 1996; Lemmer, 2007; Остроумова, 2010]. Поэтому в настоящее время особое внимание уделяется поиску природных соединений, обладающих сомногенными и стресс-лимитирующими свойствами. Перспективным в данном направлении может оказаться белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (Heat shock proteins, Hsp70). Шаперон Hsp70 является одной из наиболее древних защитных систем клеток и организмов от действия различных повреждающих факторов [Маргулис, Гужова, 2000; Пастухов и др. 2010]. Шаперонная функция, лежащая в основе его уникальных защитных свойств, заключается в способности контролировать укладку новосинтезированных белков и восстанавливать правильную пространственную структуру поврежденных белков. Несмотря на свою большую молекулярную массу, Hsp70 может выходить из клеток во внеклеточное пространство, а также в кровь и ликвор [Tytell et al., 1986; Guzhova et al., 1998; Campisi et al., 2003; Steensberg et al., 2006]. Показано, что экзогенный Hsp70, введенный в третий желудочек мозга, также способен пересекать мембрану клеток и проникать в нейроны, терминали и синапсы

структур мозга, ответственных за регуляцию сна и сомато-висцеральных функций у крыс и голубей [Ekimova et al., 2010]. В последнее десятилетие накапливаются данные о вовлечении шаперона Hsp70 в многофакторные механизмы контроля сна. Рядом авторов во время депривации сна обнаружено увеличение экспрессии Hsp70 в различных структурах мозга мыши, крысы и белоголовой овсянки [Terao et al., 2003; Naidoo et al., 2005; Jones et al., 2008]. Выяснено, что увеличение содержания Hsp70 в мозге (путем его микроинъекций в ликвор) вызывает увеличение медленного сна, снижение мышечной активности и температуры мозга у теплокровных животных [Пастухов и др., 2005, 2008]. Защитный (стресс-лимитирующий) эффект экзогенного Hsp70 обнаружен в модели стресса “заложника”: введение Hsp70 в третий желудочек мозга ускоряет восстановление цикла сон-бодрствование и снижает уровень кортикостерона в плазме крови [Пастухов, Екимова, 2005]. Данные о защитном эффекте Hsp70 при нарушениях сна и терморегуляции в модели депривации сна отсутствуют.

Другой, не менее серьезной проблемой является эндотоксемия, которая вызывается попаданием в кровь эндотоксина грамотрицательных бактерий липополисахарида (ЛПС). При эндотоксемии развиваются лихорадочная реакция, тахикардия, лейкоцитоз, нарушаются сон и функционирование иммунной, нервной и др. систем организма [Веселкин, 1963; Krueger et al., 1991; Яковлев, 2003; Клименко, 2005]. Избыточная концентрация в крови ЛПС может приводить к развитию тяжелейшего патологического процесса – сепсиса, смертность от которого в течение последних десятилетий варьирует от 25 до 80% [Angus, Wax, 2001]. Высокий уровень смертности свидетельствует о недостаточной эффективности имеющихся терапевтических средств. Согласно данным литературы, шаперон Hsp70 способен модулировать иммунный ответ [Asea, 2005; Маргулис, Гужова, 2009] и защищать от эндотоксинового сепсиса. Тепловое прекондиционирование, приводящее к экспрессии и накоплению Hsp70 в клетках периферических органов, уменьшает синтез провоспалительных цитокинов и смертность крыс при введении летальных доз ЛПС [Hotchkiss et al., 1993; Villar et al., 1994]. Системное введение Hsp70 крысам корректирует некоторые гемодинамические показатели, снижает продукцию NO макрофагами и частично нормализует апоптоз нейтрофилов в модели эндотоксинового сепсиса [Kustanova et al., 2006; Rozhkova et al., 2010]. Однако остается не изученным, способен ли экзогенный Hsp70 ослабить лихорадочную реакцию и уменьшить нарушения сна и количественно-функциональных характеристик крови, вызванных эндотоксемией. Наиболее перспективным является проведение сравнительного исследования защитных эффектов Hsp70 при эндотоксемии у млекопитающих и птиц, которое позволит выяснить общие закономерности повышения резистентности организма к действию эндотоксина.

**Цель исследования** – определить, какие нарушения терморегуляции, сна и клеток крови, вызванные депривацией сна и эндотоксемией, поддаются коррекции с помощью белка теплового шока 70 кДа.

### **Основные задачи исследования**

1. Определить изменения показателей терморегуляции и состояний сна и бодрствования у голубей при депривации сна.
2. Изучить изменения показателей терморегуляции и состояний сна и бодрствования у голубей при депривации сна в условиях эндотоксемии, вызванной липополисахаридом.
3. Выяснить, какие нарушения терморегуляции и временной организации состояний сна и бодрствования, вызванные депривацией сна у голубей, поддаются коррекции с помощью центральных микроинъекций Hsp70.
4. Сопоставить влияние периферических инъекций Hsp70 на показатели терморегуляции и состояний сна и бодрствования у голубей и крыс при эндотоксемии.
5. Изучить влияние периферических инъекций Hsp70 на число клеток крови и устойчивость мембран эритроцитов при эндотоксемии у крыс.

### **Научная новизна**

Впервые установлено, что депривация сна у голубей приводит к развитию гипертермии, а также к полному преобладанию бодрствования и повышению уровня сократительной активности мышц; изменения двух последних показателей сохраняются в течение первого часа после депривации; в последующие часы отмечается уменьшение времени бодрствования и “отдача” медленного, а затем быстрого сна. Впервые показано, что депривация сна в условиях эндотоксемии, вызванной бактериальным эндотоксином ЛПС, усиливает гипертермию, продлевает нарушения сна и сократительной активности мышц, характерные для первого часа после депривации сна, и отодвигает проявление “отдачи” медленного сна у голубей. Впервые установлено, что введение Hsp70 в третий желудочек мозга вызывает в период после депривации сна продолжительное снижение температуры мозга, ускоряет наступление медленного сна и восстановление структуры сна, а также способствует усилению эффекта “отдачи” медленного сна и поддержанию низкого уровня сократительной активности мышц у голубей. Впервые показано, что у голубей и крыс ЛПС- индуцированная эндотоксемия вызывает сходные изменения в терморегуляции (увеличение температуры мозга, уменьшение теплоотдачи и усиление сократительного термогенеза) и временной организации цикла сон-бодрствование (увеличение медленного сна и уменьшение быстрого сна). Впервые выявлено, что введение Hsp70 в вену оказывает противовоспалительное действие в модели эндотоксемии, о чем свидетельствуют снижение температуры мозга и уровня сократительной активности мышц, раннее восстановление структуры сна у голубей и крыс, отсутствие тахикардии у голубей, а также возвращение к контрольным

значениям числа лейкоцитов и увеличение резистентности мембран эритроцитов у крыс.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Депривация сна вызывает у голубей нарушение терморегуляции, а в период после депривации – существенные изменения временных и спектральных характеристик состояний сна и бодрствования. ЛПС- индуцированная эндотоксемия усиливает нарушения терморегуляции и структуры цикла сон-бодрствование, вызванные депривацией сна у голубей.
2. Увеличение содержания Hsp70 в мозге (путем введения в третий желудочек мозга) ослабляет нарушения терморегуляции и структуры цикла сон-бодрствование, вызванные депривацией сна: в период после депривации сна ускоряет снижение уровня сократительной активности мышц, времени бодрствования и наступление медленного сна и увеличивает его “отдачу”.
3. Белок теплового шока 70 кДа оказывает противовоспалительное действие у голубей и крыс в модели эндотоксемии, вызванной ЛПС: увеличение его содержания в крови (путем введения в вену) ослабляет лихорадочную реакцию, ускоряет восстановление цикла сон-бодрствование, нормализует число лейкоцитов в крови и повышает резистентность мембран эритроцитов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа имеет фундаментальное значение для понимания защитной роли белков теплового шока семейства 70 кДа при нарушении сна и эндотоксемии. Полученные в работе данные о способности экзогенного Hsp70 корректировать нарушения в системе терморегуляции и цикле сон-бодрствование, вызванные депривацией сна, могут служить основанием для апробации в клинике физических способов прекондиционирования (посещение сауны, прием теплых ванн) и известных лекарственных средств, увеличивающих содержание Hsp70 и других шаперонов в мозге и тканях организма, при лечении инсомнии и других расстройств сна. Данные о противовоспалительном действии экзогенного Hsp70 в модели эндотоксемии указывают на перспективность применения препаратов на основе Hsp70 при политерапии эндотоксемии, эндотоксического шока и сепсиса. Результаты исследования могут быть использованы в курсах лекций по физиологии для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских вузов.

### **Апробация работы**

Результаты исследования были представлены и обсуждены на 4-6-й и 8-10-й Всероссийских конференциях молодых ученых “Человек и его здоровье” (Санкт-Петербург, 2002-2004, 2006-2008); Всероссийской конференции “Механизмы терморегуляции и биоэнергетики” (Иваново, 2002); Всероссийской конференции молодых исследователей “Физиология и медицина” (Санкт-Петербург, 2005); 4-й Всероссийской конференции “Актуальные проблемы сомнологии” (Москва, 2004); на 2-4-й Всероссийских школах-конференциях (с международным участием) “Sleep as a window to the

world of wakefulness” (Москва, 2003, 2007; Ростов-на-Дону, 2005); на 8-12-й Международных конференциях “Stress and behavior” (Санкт-Петербург, 2004, 2005, 2007-2009); на 19-21-м Съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004; Москва, 2007; Калуга, 2010), на Scandinavian Physiological Society Annual Meeting, (Oulu, Finland, 2008) и Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies (Copenhagen, Denmark, 2010).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 25 работ, из которых статьи в рецензируемых журналах – 2, статьи в сборниках научных работ – 2, тезисы докладов – 21.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав, содержащих результаты исследования и их обсуждение, выводов и списка литературы, включающего 60 отечественных и 202 зарубежных источника. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, иллюстрирована 11 таблицами и 40 рисунками.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Электрофизиологические опыты выполнены на 20 взрослых голубях (*Columba livia*) обоего пола и 6 крысах-самцах линии Вистар. Исследования количественных характеристик крови и кислотной резистентности мембран эритроцитов выполнены на 92 крысах-самцах линии Вистар.

Хирургические операции выполнялись под общим нембуталовым наркозом (30 мг/кг для голубей, 50 мг/кг для крыс, внутрибрюшинно) за 7-10 дней до начала электрофизиологических экспериментов. Для идентификации состояний сна и бодрствования голубям и крысам вживляли электроды для регистрации электроэнцефалограммы, электроокулограммы и электромиограммы. Для осуществления центральных микроинъекций голубям имплантировали проводящую канюлю в 3-й желудочек мозга по следующим координатам: 6.5 мм роstralнее нулевой точки и 5.5 мм ниже поверхности черепа [Karten, Hodos, 1967]. Измерения температуры мозга и температуры кожи (неоперенной части ноги у голубей и хвоста у крыс) проводились с помощью предварительно откалиброванных минитермисторов (BetaTherm cat 2K7 MCD1, США). Точность измерения температур составляла 0.01 °С. У голубей все провода от термисторов и электродов подводились подкожно к “рюкзачку” на спине птицы, который закреплялся проволокой под каждым крылом. У крыс все провода шли к разъему, размещенному на голове и зафиксированному самотвердеющей пластмассой Протакрил-М. Переключение сигналов на кабель, идущий к предварительному усилителю, осуществлялось через подвижный коммутатор. Далее сигналы через блок аналоговой обработки и оцифровки поступали в компьютер для архивирования данных. Для регистрации и анализа электрофизиологических параметров использовали компьютерную систему SASR 8800 (США).

Для изучения числа эритроцитов и лейкоцитов, а также устойчивости мембран эритроцитов при эндотоксемии, у крыс брали кровь из хвостовой вены через 1 час и через 5 часов. Определение суммарного пула циркулирующих в крови эритроцитов и лейкоцитов осуществляли с использованием стандартной методики подсчета в камере Горяева. Анализ гемолитической резистентности эритроцитов производили по методу И.И. Гительзона и И.А. Терскова (1959) с использованием фотоэлектроколориметра КФК-2. Используемая длина волны составляла 670 нм. В качестве гемолитика использовали 0.004 N раствор HCl.

Тотальную депривацию сна у голубей проводили с помощью тактильных и звуковых стимулов в течение 5-и часов (4 часа светлой фазы и 1 час темной фазы).

Эндотоксемию у голубей вызывали с помощью внутривенного введения бактериального эндотоксина ЛПС (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich) за 4 часа до наступления неактивной фазы суток в дозе 5 мкг/кг и 100 мкг/кг. Крысам ЛПС вводили в начале неактивной фазы суток в дозе 100 мкг/кг.

В опытах использовали экзогенный Hsp70, состоящий из индуцибельной (Hsp70i) и конститутивной (Hsc70) изоформ в соотношении 3:2, полученный в лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН. Hsp70 выделяли из тканевых лизатов красных (медленных) волокон тазобедренной мышцы быка с использованием комбинации хроматографических процедур [Margulis, Welsh, 1991]. Степень очистки препарата (не менее 99%) проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для очистки от ЛПС препарат Hsp70 пропускали через колонку с полимиксин В-агарозным гелем (Sigma, США). Для проверки качества очистки Hsp70 от ЛПС использовали общепринятый LALA-тест (*Limulus polyphemus* amoebocyte lysate assay). Препарат Hsp70 вводили голубям в 3-й желудочек мозга в дозе 1.5 мкг/0.5-0.7 мкл в момент окончания депривации сна. Микроинъекции производили с помощью шприца объемом 5 мкл (Hamilton Company). Внутривенное введение Hsp70 голубям и крысам осуществляли в дозе 85 мкг/кг за 15 минут до инъекции ЛПС. В контрольных экспериментах использовали апирогенный физиологический раствор в объеме 0.2 мл и фосфатный буфер (pH 7.4) в объеме 0.5 мкл. Для исключения влияния примеси контаминантов в используемом препарате Hsp70 в экспериментах применялся термоденатурированный Hsp70 (Hsp70ден). Его получали посредством нагревания Hsp70 до 100°C в течение 5 мин на водяной бане.

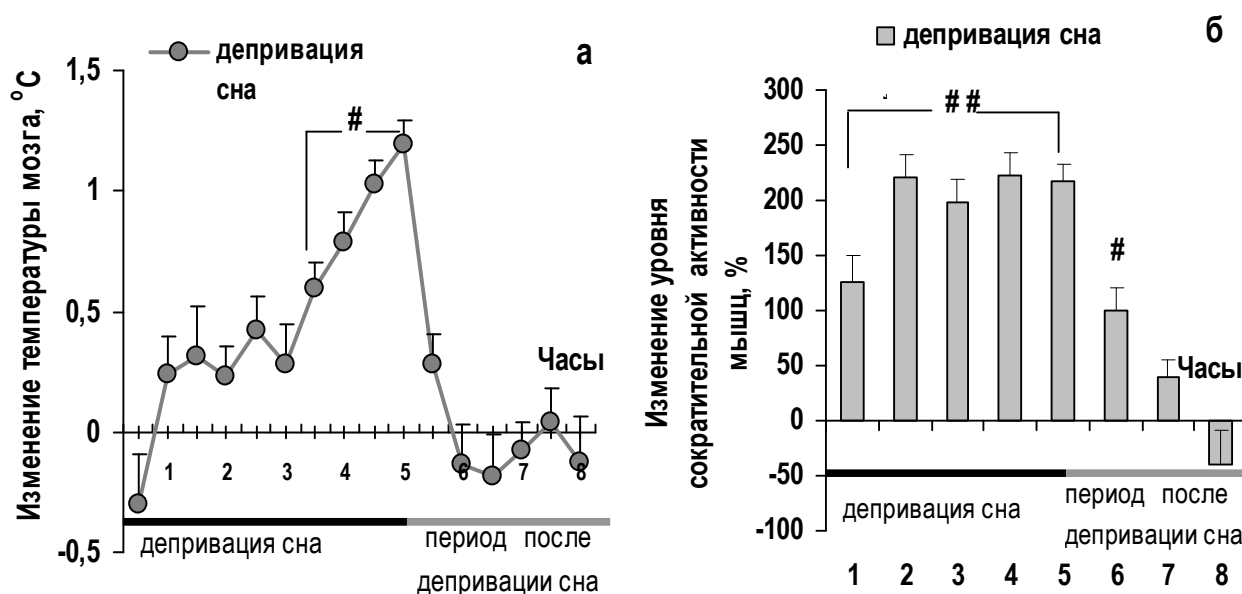
При статистической обработке показателей терморегуляции (температуры мозга, температуры кожи ноги и уровня сократительной активности мышц), мощности спектра и кислотной резистентности эритроцитов использовали непараметрический метод Вилкоксона. Временные характеристики состояний бодрствования и сна анализировали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA (LSD тест). Для анализа изменений числа лейкоцитов и эритроцитов использовали критерий Манна-Уитни для двух несвязанных выборок.



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние депривации сна на показатели терморегуляции и временные характеристики состояний бодрствования и сна у голубей

Опыты показали, что тотальная депривация сна у голубей вызывала повышение температуры мозга в течение 4-го и 5-го часов (рис. 1 а) и кожи ноги на  $1.1 \pm 0.2$  °С ( $p < 0.05$ ) в течение 5-го часа с момента начала эксперимента. В течение всего периода депривации сна наблюдалось увеличение уровня сократительной активности мышц (в среднем на 211%,  $p < 0.05$ ) (рис. 1 б).

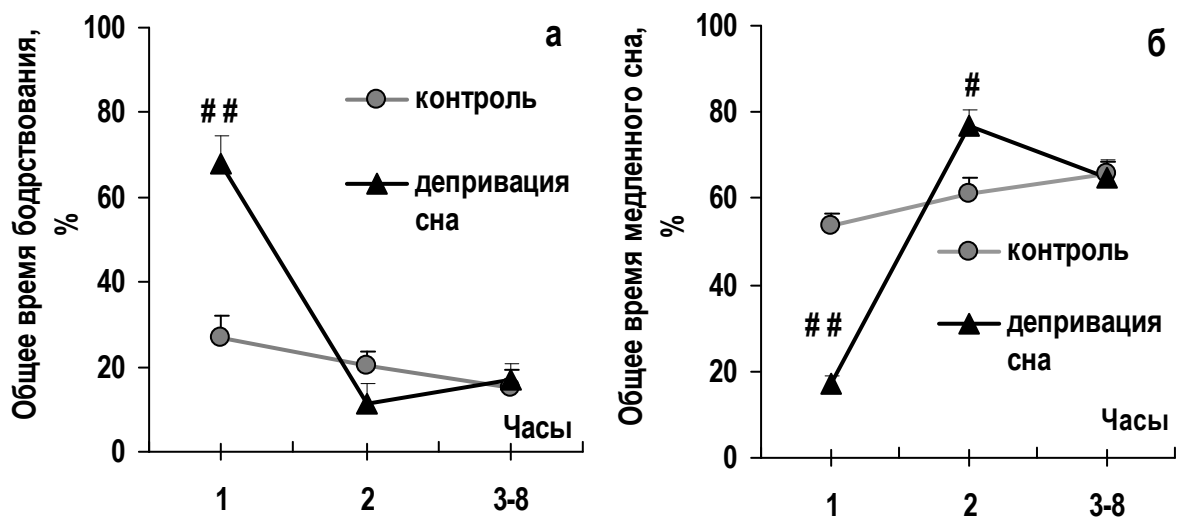


**Рис. 1.** Изменение температуры мозга (а) и уровня сократительной активности грудной мышцы (б) во время депривации сна и после депривации сна у голубей.

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , двумя решетками - при  $p < 0.001$ . На рисунке нулевая линия соответствует контролю.

Депривация сна практически полностью устраняла дремоту, медленный и быстрый сон по сравнению с контролем. Общее время (ОВ) бодрствования в течение каждого часа составляло в среднем 95% ( $p < 0.001$ ). В течение 1-го часа после депривации сна выявлено усиление сократительной активности мышц (рис. 1 б) и преобладание бодрствования (рис. 2 а); латентный период медленного сна увеличивался в среднем на  $14 \pm 5$  мин ( $p < 0.05$ ), а ОВ этого состояния уменьшалось (рис. 2 б). Восстановление медленного сна происходило с эффектом компенсаторного увеличения его ОВ (рис. 2 б) (за счет увеличения длительности эпизодов с  $47 \pm 2$  с до  $60 \pm 3$  с,  $p < 0.05$ ) и представленности волн дельта-диапазона на ЭЭГ на 10% ( $p < 0.05$ ). В последующие часы ОВ медленного сна не отличалось от контрольных значений (рис. 2 б), однако, наблюдалось увеличение мощности волн дельта-диапазона на ЭЭГ во время медленного сна в среднем на 9.6% ( $p < 0.05$ ) до 8-го часа, что свидетельствовало об увеличении интенсивности сна. “Отдача” быстрого сна начиналась на 1 час позже по сравнению с медленным сном, в период с 3-го по 6-й час, и проявлялась увеличением ОВ быстрого сна за счет увеличения числа его эпизодов.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что развитие гипертермии во время депривации сна связано с увеличением сократительного термогенеза. Нарушения сна (инсомния) и терморегуляции, выявленные в этих опытах, могут быть связаны с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, вызванной процедурой депривации сна. Увеличение активности этих систем приводит к повышению уровня гормонов стресса (катехоламинов и кортикостерона) [Meerlo et al., 2008], обладающих калоригенным эффектом [Пастухов, Хаскин, 1979] и участвующих в механизмах поддержания бодрствования [Vazquez-Palacios et al., 2001]. Компенсаторное увеличение ОБ медленного сна и его интенсивности, а также “отдача” быстрого сна, наблюдаемые со 2-го часа после депривации сна, могут указывать на снижение уровня кортикостерона и катехоламинов. По мнению клиницистов, глубокий сон является мощным антистрессовым фактором [Ekstedt, 2005; Вейн и др., 2001; Левин, 2007] и способствует восстановлению физиологических функций организма после перенесенного стрессорного воздействия. Именно во время медленного сна снижается в крови уровень гормонов стресса [Born, Horst, 2000].



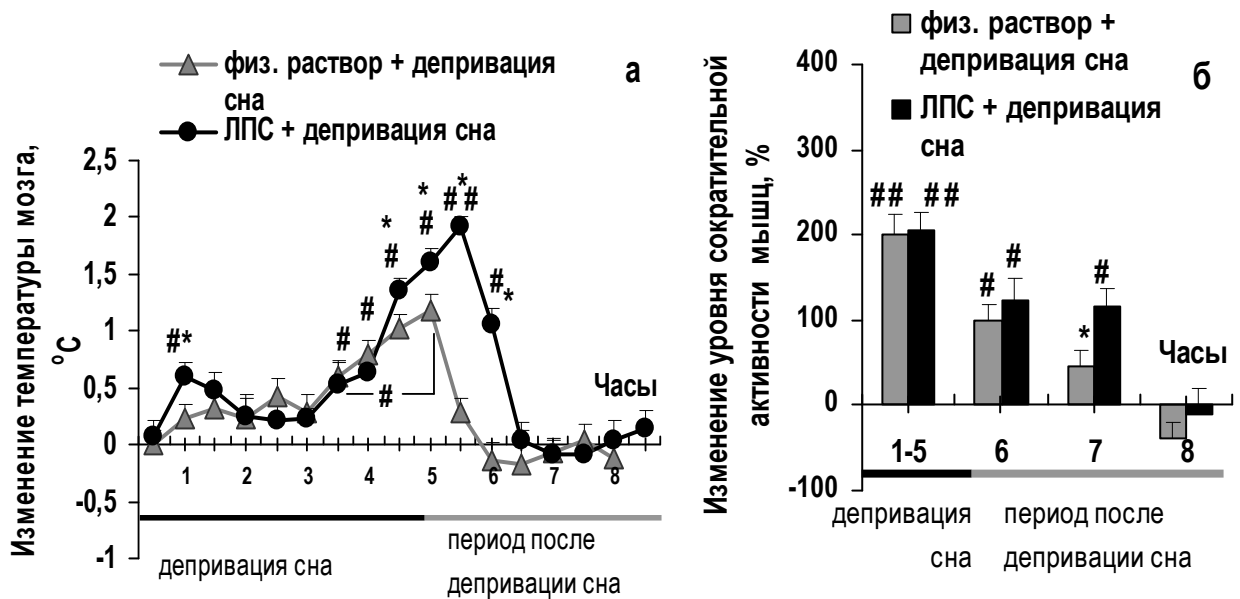
**Рис. 2.** Изменение общего времени бодрствования (а) и медленного сна (б) в период после депривации сна у голубей.

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , двумя решетками - при  $p < 0.001$ .

## 2. Изменение показателей терморегуляции и временных характеристик состояний бодрствования и сна при депривации сна в условиях эндотоксемии у голубей

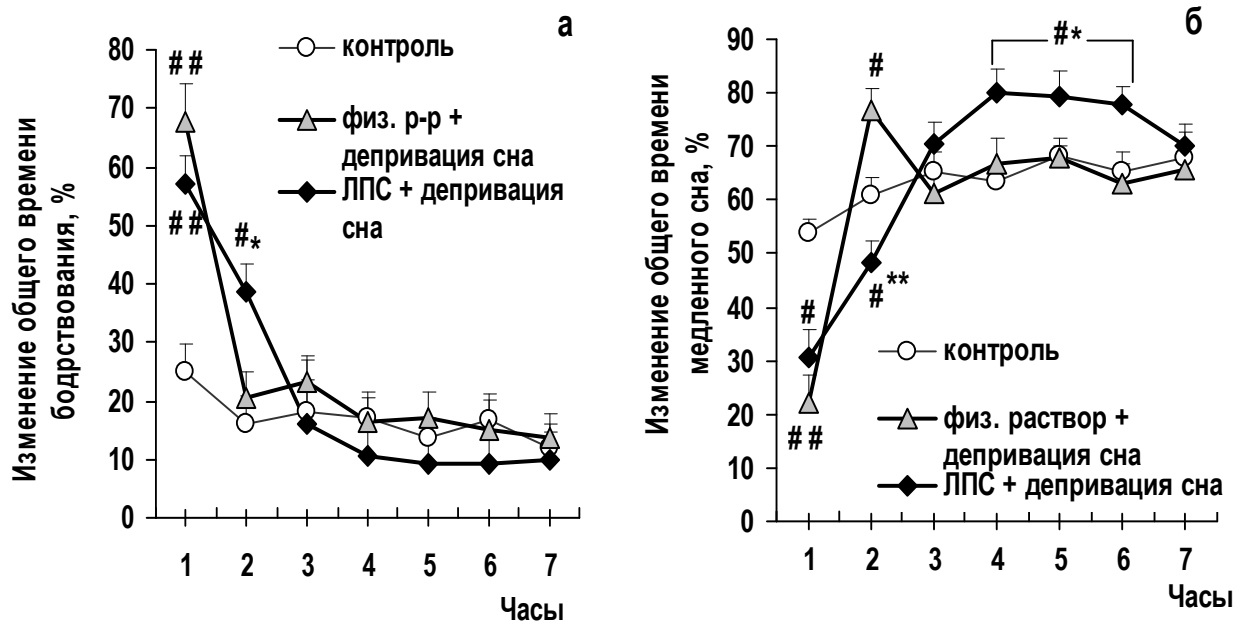
Проведение депривации сна при эндотоксемии, вызванной внутривенным введением ЛПС в дозе 5 мкг/кг, вызывало усиление гипертермии у голубей, которая сохранялась и в течение 1-го часа после депривации (рис. 3 а). В этих экспериментах отмечено также более длительное увеличение уровня сократительной активности мышц (на 1 час) (рис. 3 б) и периферической вазодилатации (на 2 часа) по сравнению с одной депривацией сна. Проведение депривации сна во время эндотоксемии продлеvalo нарушения в цикле сон-

бодрствование, характерные для 1-го часа после депривации сна. Преобладание бодрствования и уменьшение ОВ медленного сна и быстрого сна сохранялось на 1 час дольше, чем после одной депривации сна (рис. 4 а, б). В этих опытах обнаружена более поздняя (на 2 часа) и более продолжительная “отдача” медленного сна (рис. 4 б). Увеличение ОВ медленного сна в этот период происходило за счет увеличения длительности его эпизодов (в среднем с  $45 \pm 3$  с до  $61 \pm 2$  с  $p < 0.05$ ). Эффекта “отдачи” быстрого сна после проведения депривации сна в условиях эндотоксемии не наблюдалось, напротив, в период со 2-го по 6-й час ОВ быстрого сна уменьшалось за счет уменьшения числа его эпизодов по сравнению с одной депривацией сна.



**Рис. 3. Изменение температуры мозга (а) и уровня сократительной активности мышц (б) при депривации сна в условиях эндотоксемии у голубей.**

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , двумя решетками - при  $p < 0.001$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при проведении депривации сна во время эндотоксемии по сравнению с одной депривацией сна при  $p < 0.05$ . На рисунке нулевая линия соответствует контролю.



**Рис. 4.** Изменение общего времени бодрствования (а) и медленного сна (б) в период после депривации сна в условиях эндотоксемии у голубей.

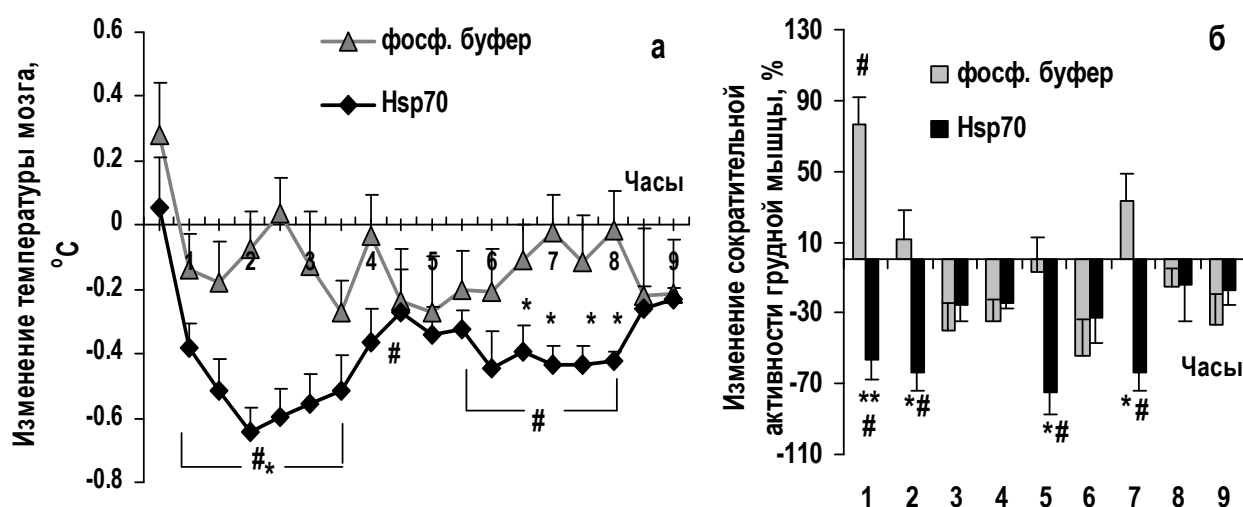
Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , двумя решетками - при  $p < 0.001$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при проведении депривации сна во время эндотоксемии по сравнению с одной депривацией сна при  $p < 0.05$ , двумя звездочками - при  $p < 0.001$ .

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эндотоксемия усугубляет нарушения показателей терморегуляции и сна, вызываемые депривацией сна. Усиление гипертермии в этих экспериментах, по-видимому, связано с суммацией температурных эффектов депривации сна и эндотоксемии. Увеличение латентного периода восстановления показателей терморегуляции и цикла сон-бодрствование, вероятно, связаны с более сильной активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при проведении депривации сна в условиях эндотоксемии.

### 3. Влияние Hsp70 на изменение показателей терморегуляции и временных характеристик состояний сна и бодрствования в период после депривации сна

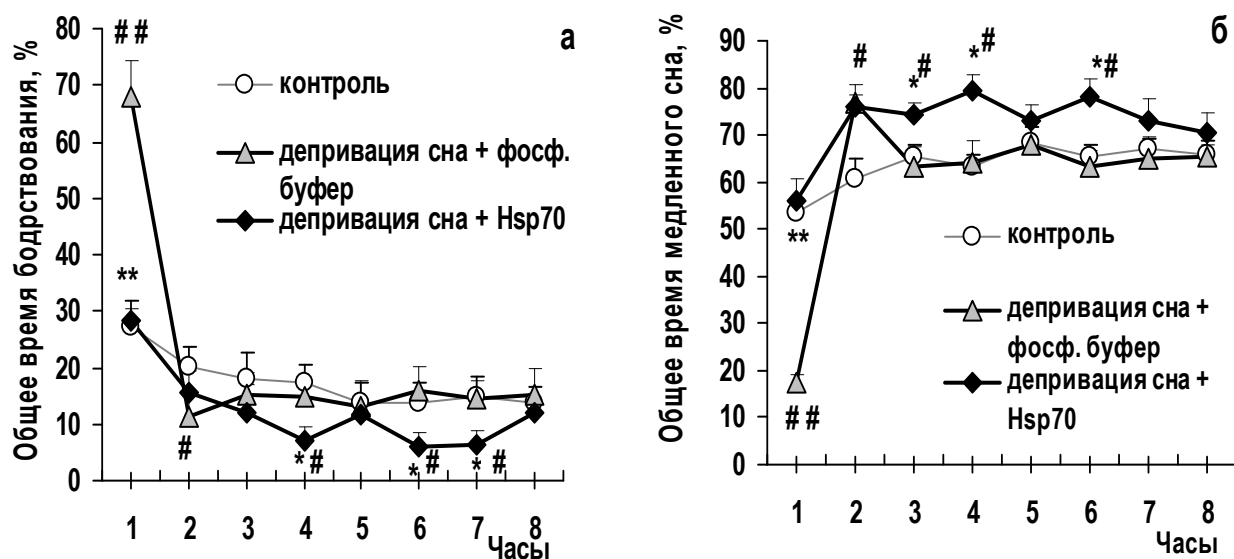
Введение Hsp70 в третий желудочек мозга в момент окончания процедуры депривации сна предотвращало повышение уровня сократительной активности мышц, характерное для 1-го часа после депривации сна. Сократительная активность мышц после введения Hsp70 снижалась ниже контрольных значений уже в 1-й час после депривации и сохранялась на низком уровне в течение последующих часов (рис. 5 б). Кроме того, Hsp70 вызывал длительное снижение температуры мозга (рис. 5 а) и ускорял восстановление цикла сон-бодрствование, нарушенного депривацией сна (рис. 6 а, б). Об этом свидетельствовало, во-первых, резкое снижение ОВ бодрствования (рис. 6 а) (в связи с уменьшением длительности его эпизодов с  $89 \pm 3$  с до  $48 \pm 4$  с ( $p < 0.001$ )) и восстановление до контрольных значений ОВ медленного и быстрого сна в

течение 1-го часа после депривации сна; во-вторых, уменьшение в 3.7 раза латентного периода наступления первого эпизода медленного сна.



**Рис. 5.** Влияние Hsp70 на изменение температуры мозга (а) и уровня сократительной активности грудной мышцы (б) в период после депривации сна у голубей.

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , звездочкой обозначены достоверные изменения при введении Hsp70 по сравнению введением фосфатного буфера при  $p < 0.05$ , двумя звездочками - при  $p < 0.001$ . На рисунке нулевая линия соответствует контролю.



**Рис. 6.** Влияние Hsp70 на изменение общего времени бодрствования (а) и медленного сна (б) в период после депривации сна у голубей.

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ , двумя решетками - при  $p < 0.001$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при введении Hsp70 по сравнению введением фосфатного буфера при  $p < 0.05$ , двумя звездочками - при  $p < 0.001$ .

Введение Hsp70 вызывало усиление эффекта “отдачи” медленного сна, о чем свидетельствовало более продолжительное увеличение ОВ медленного сна (за счет увеличения длительности его эпизодов с  $50 \pm 4$  с до  $72 \pm 5$  с,  $p < 0.05$ ) по сравнению с депривацией сна (рис. 6 б). В этих опытах отмечено ослабление феномена “отдачи” быстрого сна. В период с 3-го по 8-й час после депривации

сна выявлено уменьшение ОВ быстрого сна, которое происходило за счет уменьшения числа его эпизодов.

Для того, чтобы исключить возможность влияния контаминантов в препарате Hsp70 на изучаемые показатели, были выполнены эксперименты с денатурированным Hsp70 (Hsp70ден). Выяснено, что введение Hsp70ден в третий желудочек мозга после окончания депривации сна не корректировало нарушения сна и терморегуляции, вызванные депривацией сна. Эти данные свидетельствуют, что защитные эффекты Hsp70 при депривации сна не связаны с его контаминацией ЛПС или другими примесями.

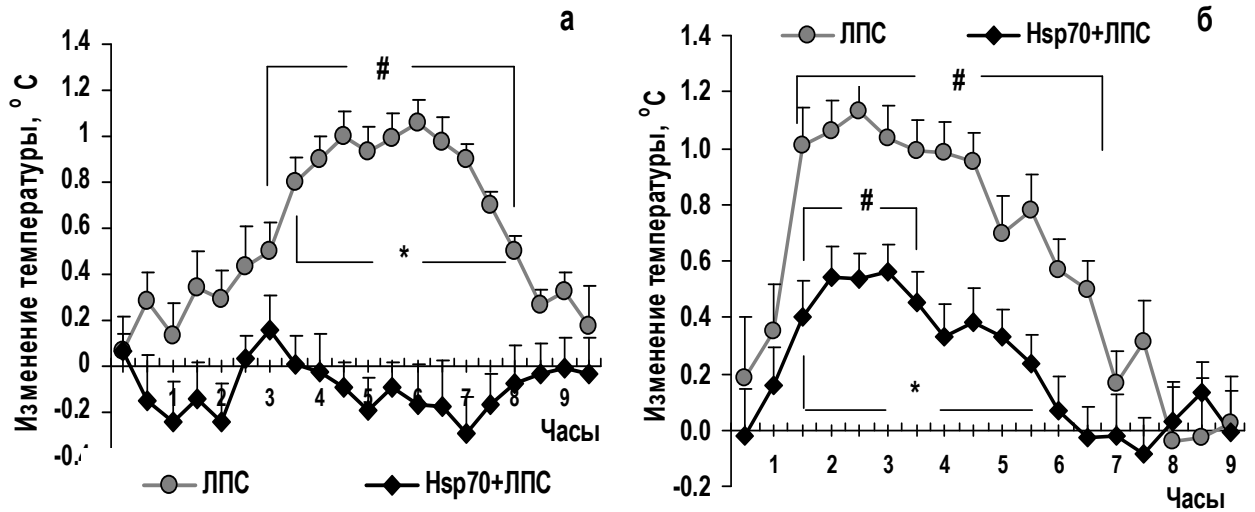
Проведенные эксперименты показали, что введение Hsp70 в третий желудочек мозга в момент окончания депривации сна вызывает у голубей в сравнении с контролем более быстрое наступление медленного сна и увеличение его “отдачи”, что сопровождается характерным для медленного сна длительным снижением уровня сократительной активности мышц и температуры мозга. Увеличение “отдачи” медленного сна, вероятно, связано с суммированием сомногенного эффекта Hsp70 и эффекта “отдачи” медленного сна в ответ на длительное бодрствование, и может отражать усиление стресс-лимитирующей функции медленного сна. Сомногенный эффект Hsp70 связан со способностью Hsp70 преодолевать ликворээнцефалический барьер, проникать в нейроны и синапсы преоптической области гипоталамуса, участвующей в контроле медленного сна и терморегуляции [Ekimova et al., 2010]. Хорошо известно, что активация ГАМК(А)- рецепторов способствует сну. Предшествующее введение антагониста ГАМК(А)- рецепторов бикакуллина в вентро-латеральную преоптическую область гипоталамуса у голубей приводит к угнетению сомногенного и терморегуляторного эффектов Hsp70 и увеличению бодрствования [Пастухов, Екимова, 2005]. Можно полагать, что реализация сомногенного эффекта Hsp70 в наших опытах достигается за счет ГАМК(А)- опосредованного растормаживания “сон-позитивных” популяций нейронов в преоптической области гипоталамуса. Раннее наступление сна в постдепривационный период при введении Hsp70 может быть связано со способностью экзогенного Hsp70 снижать в крови уровень гормонов стресса. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что введение Hsp70 в 3-й желудочек мозга крысам сразу после иммобилизационного стресса вызывает значительное снижение содержания кортикостерона в плазме крови в сравнении с контрольной группой [Маньковская, Пастухов, 2005].

#### **4. Сравнительное исследование эффектов Hsp70 на терморегуляцию, сон и клетки крови при эндотоксемии у голубей и крыс**

##### **4.1. Изменения показателей терморегуляции и временных характеристик состояний сна и бодрствования при эндотоксемии у голубей и крыс**

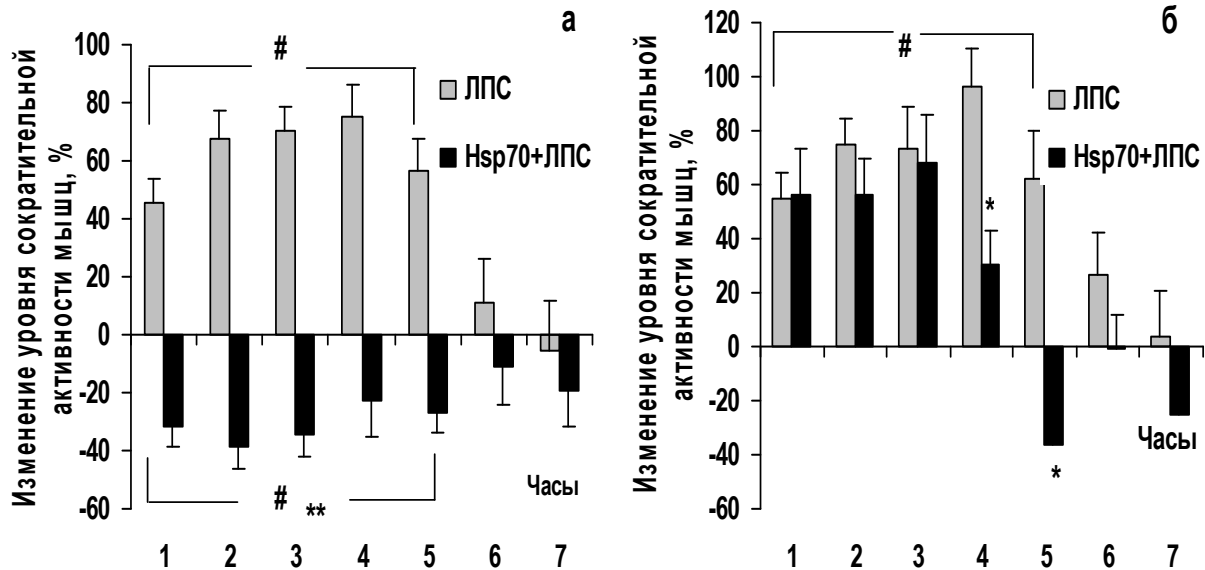
У голубей при эндотоксемии, вызванной введением ЛПС в дозе 85 мкг/кг, наблюдалось повышение температуры мозга (рис. 7 а), а также развитие

периферической вазоконстрикции в течение первых 3-х часов после начала опыта. В течение 7-го и 8-го часов вазоконстрикция сменялась на вазодилатацию.



**Рис. 7.** Влияние Hsp70 на изменение температуры мозга при эндотоксемии у голубей (а) и крыс (б)

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при введении Hsp70 по сравнению с действием одного эндотоксина при  $p < 0.05$ . На рисунке нулевая линия соответствует контролю.



**Рис. 8.** Влияние Hsp70 на изменение уровня сократительной активности мышц при эндотоксемии у голубей (а) и крыс (б).

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p < 0.05$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при введении Hsp70 по сравнению с действием одного эндотоксина при  $p < 0.05$ . На рисунке нулевая линия соответствует контролю.

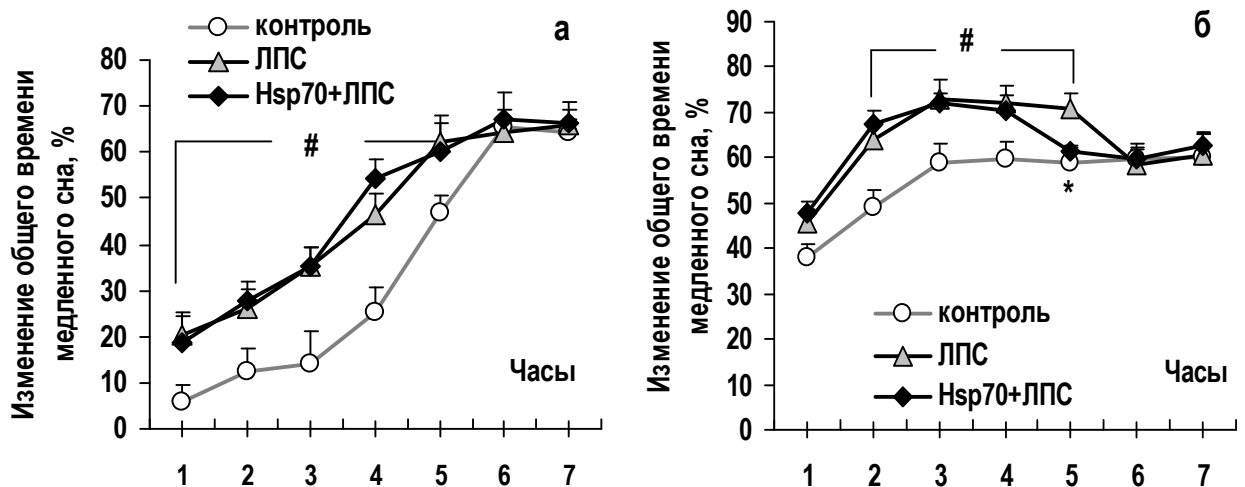
В период с 1-го по 5-й час с момента введения ЛПС наблюдалось увеличение сократительной активности мышц в среднем на 62 % ( $p < 0.05$ ) (рис.

8 а), а с 1-го по 6-й час – увеличение частоты сердечных сокращений на 22.5% ( $p<0.05$ ).

При эндотоксемии у крыс температура мозга повышалась раньше, чем у голубей (рис. 7 б). Как и у голубей, у крыс наблюдалось бифазное изменение периферической вазомоторной реакции, проявляющееся сначала развитием вазоконстрикции, а затем - вазодилатации. Эндотоксемия у крыс также приводила к усилению сократительной активности мышц (в среднем на 78 %,  $p<0.05$ ) в течение 5-и часов (рис. 8 б).

У голубей в течение 5-и часов с момента начала эндотоксемии наблюдалось уменьшение ОВ бодрствования (за счет снижения длительности эпизодов с  $114\pm 5$  с до  $79\pm 3$  с,  $p<0.05$ ) и увеличение ОВ медленного сна (рис. 9 а) за счет увеличения числа эпизодов. В период с 4-го по 9-й час происходило уменьшение ОВ быстрого сна за счет уменьшения числа эпизодов.

При эндотоксемии у крыс уменьшение ОВ бодрствования (за счет уменьшения длительности с  $85\pm 4$  с до  $55\pm 3$  с,  $p<0.05$ ) и увеличение ОВ медленного сна (за счет увеличения числа эпизодов) (рис. 9 б) происходило на 1 час позже, чем у голубей, и наблюдалось в период со 2-го по 5-й час. Со 2-го по 6-й час происходило уменьшение ОВ быстрого сна за счет уменьшения длительности его эпизодов (с  $82\pm 3$  с до  $55\pm 5$  с,  $p<0.05$ ).



**Рис. 9. Влияние Hsp70 на изменение общего времени медленного сна у голубей (а) и крыс (б) при эндотоксемии.**

Достоверные изменения по сравнению с контролем обозначены решеткой при  $p<0.05$ ; звездочкой обозначены достоверные изменения при введении Hsp70 по сравнению с действием одного эндотоксина при  $p<0.05$ .

Таким образом, сравнительное изучение изменений показателей лихорадочной реакции во время эндотоксемии у голубей и крыс выявило как общие черты, так и ряд особенностей. Показано, что повышение температуры мозга при эндотоксемии у голубей происходит позже, чем у крыс. И у голубей, и у крыс повышению температуры мозга способствует усиление сократительной активности мышц и уменьшение теплоотдачи. Эндотоксемия у голубей характеризуется более ранним увеличением ОВ медленного сна и



более длительным уменьшением ОВ быстрого сна по сравнению с крысами. Увеличение ОВ медленного сна при эндотоксемии и у голубей, и у крыс реализуется путем увеличения числа его эпизодов.

#### **4.2. Влияние Нsp70 на показатели терморегуляции и временные характеристики состояний сна и бодрствования при эндотоксемии у голубей и крыс**

Введение голубям Нsp70 в вену за 15 мин до введения эндотоксина ЛПС предотвращало повышение температуры мозга (рис. 7 а) (этому способствовало значительное снижение уровня сократительной активности мышц (рис. 8 а)), а также устраняло развитие вазодилатации и приводило к восстановлению частоты сердечных сокращений до контрольных значений. Однако, периферическая вазоконстрикция в период с 1-го по 3-й час сохранялась.

У крыс, в отличие от голубей, предварительное введение Нsp70 уменьшало повышение температуры мозга (рис 7 б) и продолжительность периода вазодилатации (на 3 часа) при эндотоксемии. Восстановление уровня сократительной активности мышц после введения Нsp70 происходило на 2 часа раньше, чем при действии одного ЛПС (рис. 8 б).

Эксперименты показали, что у голубей после введения Нsp70 не наблюдалось значимых изменений ОВ бодрствования и медленного сна (рис. 9 а) по сравнению с действием одного ЛПС. Исключение составило лишь более раннее (на 1 час) восстановление ОВ быстрого сна. Увеличение ОВ медленного сна после введения Нsp70 происходило за счет увеличения длительности эпизодов в среднем на  $15 \pm 3$  с ( $p < 0.05$ ) по сравнению с действием одного ЛПС, а число эпизодов медленного сна восстанавливалось до контрольных значений.

У крыс предварительное введение Нsp70 способствовало более раннему восстановлению ОВ бодрствования и медленного сна (рис. 9 б) (на 1 час) и ОВ быстрого сна (на 2 часа), чем в условиях одной эндотоксемии. Как и у голубей, ОВ медленного сна у крыс после предварительного введения Нsp70 возрастало за счет увеличения длительности эпизодов медленного сна в среднем с  $96 \pm 6$  с до  $122 \pm 4$  с ( $p < 0.05$ ), а число эпизодов восстанавливалось до контрольных значений. Восстановление ОВ быстрого сна происходило за счет увеличения длительности эпизодов с  $73 \pm 2$  с до  $104 \pm 5$  с ( $p < 0.05$ )

Для исключения влияния контаминантов в препарате Нsp70 на физиологические показатели при эндотоксемии у голубей и крыс были выполнены эксперименты с использованием Нsp70ден. Опыты показали, что введение в вену Нsp70ден не корректировало лихорадочную реакцию и нарушенную структуру сна, вызванные эндотоксемией. Эти данные свидетельствуют, что защитные эффекты Нsp70 при эндотоксемии не связаны с его контаминацией.

Таким образом, полученные данные указывают на способность Нsp70 ослаблять системную воспалительную реакцию у голубей и крыс, вызванную ЛПС- индуцированной эндотоксемией. Об этом свидетельствуют снижение температуры мозга, уровня сократительной активности мышц и нормализация частоты сердечных сокращений, а также появление более длительных эпизодов

медленного сна и более раннее восстановление до контрольных значений временных характеристик состояний сна и бодрствования. Можно предположить, что защитное действие экзогенного Hsp70 на показатели терморегуляции и цикл сон-бодрствование обусловлено его способностью взаимодействовать с рецепторными комплексами мембран иммунокомпетентных клеток (нейтрофилов и макрофагов), такими как CD14, TLR2/4, CD11b/CD18 и др. [Dybdahl et al., 2002; Calderwood et al., 2007; Rozhkova et al., 2010]. Вероятно, это взаимодействие может приводить к модулированию активности этих клеток и ослаблению провоспалительного сигнала. Раннее восстановление структуры сна и появление более длительных эпизодов медленного сна у голубей и у крыс при введении Hsp70 могло быть результатом снижения активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, возрастающей при эндотоксемии [Гриневич и др., 2003; Маньковская, Пастухов, 2005].

#### **4.3. Влияние Hsp70 на количественные характеристики крови и кислотную резистентность мембран эритроцитов при эндотоксемии у крыс.**

Опыты показали, что введение бактериального эндотоксина ЛПС вызывало у крыс увеличение суммарного пула циркулирующих в крови эритроцитов с  $(7.3 \pm 0.3) \cdot 10^{12}$  1/л до  $(9.5 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$  1/л ( $p < 0.05$ ) и с  $(7.6 \pm 0.2) \cdot 10^{12}$  1/л до  $(9.9 \pm 0.1) \cdot 10^{12}$  1/л ( $p < 0.05$ ) через 1 час и через 5 часов, соответственно. Число лейкоцитов через 1 час после введения ЛПС повысилось с  $(6.3 \pm 0.2) \cdot 10^9$  1/л до  $(10.7 \pm 0.3) \cdot 10^9$  1/л ( $p < 0.05$ ), а через 5 часов - с  $(6.5 \pm 0.2) \cdot 10^9$  1/л до  $(11.8 \pm 0.3) \cdot 10^9$  1/л ( $p < 0.05$ ). Кроме того, при эндотоксемии наблюдалось снижение устойчивости мембран эритроцитов. Об этом свидетельствует более раннее наступление пика их распада (через 1 час на  $47 \pm 5$  с раньше,  $p < 0.05$ ; через 5 часов на  $44 \pm 3$  с раньше,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (введение физиологического раствора).

Введение Hsp70 вызывало уменьшение количества эритроцитов по сравнению с действием одного ЛПС, и через 1 час, и через 5 часов, однако, число этих клеток продолжало превышать контрольные значения. Число лейкоцитов через 1 час уменьшалось по сравнению с действием одного ЛПС, а через 5 часов достигало контрольного уровня. Изучение кислотной резистентности эритроцитов через 1 час после введения Hsp70 выявило увеличение устойчивости их мембран, о чем свидетельствовал тот факт, что пик распада эритроцитов в этих условиях наступал в то же время, что и в контроле. Через 5 часов у половины крыс также наблюдалось отчетливое увеличение кислотной резистентности эритроцитов, однако, у другой половины достоверного улучшения этого показателя не происходило.

Увеличение числа эритроцитов во время эндотоксемии является, по-видимому, стресс-реакцией на действие ЛПС и процедуру инъекции и может реализовываться за счет выброса эритроцитов из депо или уменьшения объема плазмы крови [Maslova et al., 2005, 2007; Леонова и др., 2009]. Менее

значительное увеличение числа эритроцитов после предварительного введения Hsp70, возможно, связано со способностью Hsp70 ослаблять активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [Маньковская, Пастухов, 2005]. Увеличение числа лейкоцитов является одним из важнейших маркеров воспалительного процесса [Aird, 2003]. В наших опытах Hsp70 предотвращал развитие лейкоцитоза, вызванного эндотоксемией. Это указывает на способность Hsp70 ослаблять системную воспалительную реакцию, вызванную эндотоксемией. Уменьшение резистентности мембран эритроцитов при эндотоксемии связано с тем, что ЛПС, попадая в кровь, встраивается в мембрану эритроцита и нарушает её структуру [Strýčková, 1978]. Данные литературы свидетельствуют, что Hsp70 может включаться в мембраны лизосом и способствовать их стабилизации [Petersen et al., 2010]. Не исключено, что в наших опытах повышение устойчивости мембран эритроцитов при введении Hsp70 может быть обусловлено стабилизацией структурно-функциональных свойств мембраны при встраивании в неё шаперона Hsp70. Кроме того, повышение устойчивости мембран пула эритроцитов, циркулирующих в крови, наблюдается при увеличении в ней молодых форм эритроцитов, обладающих более “прочной” мембраной, чем старые эритроциты [Maslova et al., 2005, 2007]. Способен ли Hsp70 мобилизовать в кровь молодые формы эритроцитов пока не ясно. Это требует отдельного изучения.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что тотальная депривация сна у голубей приводит к нарушению терморегуляции (развивается гипертермия), а в период после депривации - нарушению сна. В течение 1-го часа после депривации обнаружено преобладание активного бодрствования и уменьшение сна, а в последующие часы - компенсаторное увеличение ОВ и интенсивности медленного сна, а затем ОВ быстрого сна. Эндотоксемия усиливает нарушения в терморегуляции и цикле сон-бодрствование, вызванные депривацией сна у голубей. В ходе исследований выяснено, что экзогенный Hsp70 способен корректировать нарушения в терморегуляции и цикле сон-бодрствование, вызванные депривацией сна у голубей. Введение Hsp70 в 3-й желудочек мозга сразу после депривации сна устраняет нарушения в организации цикла сон-бодрствование (уже в первый час после микроинъекции) и способствует усилению эффекта “отдачи” медленного сна и поддержанию низкого уровня сократительной активности мышц. Характер физиологических эффектов Hsp70 в период после депривации сна позволяет предполагать, что Hsp70 обладает сомногенным и стресс-лимитирующим действием. Проведенный сравнительно-физиологический анализ эффектов ЛПС у голубей и крыс показал, что ЛПС-индуцированная эндотоксемия вызывает сходные изменения терморегуляторных показателей лихорадочной реакции (вазоконстрикция периферических сосудов, увеличение сократительной активности мышц и температуры мозга) и архитектуры сна (увеличение медленного сна и угнетение быстрого сна) у этих животных.

Выяснено, что увеличение содержания Hsp70 в крови при эндотоксемии ослабляет лихорадочную реакцию и ускоряет восстановление структуры сна у крыс и голубей, а также приводит к нормализации числа лейкоцитов в крови и стабилизации мембран эритроцитов у крыс. Эти данные указывают на то, что Hsp70 оказывает противовоспалительное действие при эндотоксемии. Можно полагать, что механизмы реализации противовоспалительного действия Hsp70 при эндотоксемии являются общими для представителей млекопитающих и птиц.

## **ВЫВОДЫ**

1. В период депривации сна у голубей происходит почти полная замена сна активным бодрствованием, развитие гипертермии и повышение сократительной активности мышц; в течение первого часа после депривации преобладает бодрствование и сохраняется повышенный тонус мышц, а в последующие часы компенсаторно увеличиваются общее время и интенсивность медленного сна, а затем общее время быстрого сна (“отдача” сна).
2. Депривация сна в условиях эндотоксемии вызывает у голубей усиление гипертермии, продлевает нарушения в цикле сон-бодрствование и тонусе мышц, характерные для первого часа после депривации сна, задерживает “отдачу” медленного сна и подавляет “отдачу” быстрого сна.
3. Введение Hsp70 в третий желудочек мозга в момент окончания депривации сна вызывает у голубей в сравнении с контролем более быстрое наступление медленного сна и увеличение его “отдачи”, что сопровождается характерным для медленного сна длительным снижением уровня сократительной активности мышц и температуры мозга.
4. Эндотоксемия вызывает сходные изменения терморегуляторных показателей лихорадочной реакции (развитие периферической вазоконстрикции, повышение уровня сократительной активности мышц и температуры мозга) и структуры сна (увеличение общего времени медленного сна и уменьшение времени быстрого сна) у голубей и крыс; отмечен ряд особенностей эндотоксемии у голубей – раннее увеличение медленного сна, позднее повышение температуры мозга и продолжительное подавление быстрого сна.
5. Введение Hsp70 в вену значительно ослабляет системную воспалительную реакцию, вызванную эндотоксемией, на что указывают снижение температуры мозга, уменьшение уровня сократительной активности мышц, раннее восстановление цикла сон-бодрствование у голубей и крыс, а также отсутствие тахикардии у голубей и нормализация числа лейкоцитов в крови и повышение устойчивости мембран эритроцитов у крыс. У крыс отмечено менее выраженное снижение температуры мозга и сократительной активности мышц при действии Hsp70.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах

1. Лапшина К.В., Екимова И.В. Влияние депривации сна на показатели лихорадочной реакции и процесс восстановления сомато-висцеральных функций и сна в условиях эндотоксемии // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 2009. - Т. 96. - №2. - С. 161-171.
2. Лапшина К.В., Екимова И.В. Исследование защитных эффектов экзогенного белка теплового шока 70 кДа в модели депривации сна у голубя *Columba livia* // Журн. эвол. биохим. и физиол. - 2010. - Т. 46. - № 5. - С. 387-394

### Статьи в сборниках научных работ

1. Лапшина К.В., Екимова И.В. Взаимоотношение между сном и терморегуляцией при эндотоксемии у голубей // Проблемы термофизиологии в биологии и медицине. - Мн: ПЧУП “Бизнесофсет”. – 2004. - С. 79-84.
2. Лапшина К.В., Екимова И.В., Пастухов Ю.Ф. Влияние экзогенного белка теплового шока 70 кДа на сомато-висцеральные показатели и сон после эмоционального стресса // Проблемы термофизиологии в биологии и медицине. - Мн: ПЧУП «Бизнесофсет». – 2005. - С. 84-87.

### Тезисы

1. Лапшина К.В. Влияние депривации сна на развитие лихорадки у голубей // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. - Санкт-Петербург. – 2002. - С. 143-144.
2. Лапшина К.В., Екимова И.В. Лишение сна вызывает усиление лихорадки // Тез. конф. “Механизмы терморегуляции и биоэнергетики: взаимодействие функциональных систем”. – Иваново. – 2002. - С.35.
3. Лапшина К.В. Влияние депривации сна на температуру мозга и организацию цикла бодрствование-сон в условиях действия эндотоксина // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. - Санкт-Петербург. – 2003. - С. 96-97.
4. Ekimova I.V., Lapshina K.V., Pastukhov Iu.F., Hudik K.A., Andreeva L.I., Margulis V.A. Somnogenic effects of heat shock protein 70 during period after stress caused by sleep deprivation // Тез. конф. “Сон – окно в мир бодрствования”. – Москва. – 2003. - С.39.
5. Маргулис Б.А., Новоселова Т.В., Батюк А.М., Гужова И.В., Пастухов Ю.Ф., Екимова И.В., Лапшина К.В., Худик К.А., Маньковская Т.Н., Андреева Л.И., Шабанов П.Д., Морозова С.И. Защитные белки и пептиды как средство реабилитации от тяжелого эмоционального и физического стресса: разработка препаратов и проверка их эффективности в эксперименте // Тез. конф. “Фундаментальные науки – медицине”. – Москва. – 2003. - С. 154-156.
6. Лапшина К. В. Влияние белка теплового шока 70 кДа на временные характеристики состояний сна и бодрствования у голубей после депривации сна // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. - Санкт-Петербург. – 2004. - С. 156-157.
7. Lapshina K.V., Mankovskaja T.N., Hudik K.A. Effect of HSP70 kDa on somato-visceral characteristics before and after stress // Психофармакология и биологическая наркология. - Санкт-Петербург. – 2004. - С. 699-700.
8. Лапшина К. В. Влияние белка теплового шока 70 кДа на показатели терморегуляции после депривации сна у голубей // Тез. XIX Съезда физиол. Общества им. И.П. Павлова.- Екатеринбург. – 2004. – Т. 90.- № 8. - С. 46.

9. Екимова И.В., Лапшина К.В., Маньковская Т.Н., Худик К.А., Пастухов Ю.Ф. Сомногенное действие белка теплового шока 70 кДа и его значение для процесса реабилитации после стресса // Тез. конф. “Актуальные вопросы сомнологии”. – Москва. - 2004. С. 24.
10. Лапшина К.В. Изменение температуры мозга и временных характеристик цикла бодрствование-сон у голубей с различной устойчивостью к стрессу. Тез. конф. “Физиология и медицина”. - Санкт-Петербург. – 2005.- С.66.
11. Hudik K.A., Lapshina K.V., Eram S.Yu., Mankovskaja T.N. Effects of HSP70 kDa on spectral characteristics of non-rapid-eye-movement sleep in rats and pigeons // Психофармакология и биологическая наркология. - Санкт-Петербург. – Т. 2. – 2005. - С. 699-700.
12. Lapshina K.V., Ekimova I.V. Effect of intravenous injection of heat shock protein 70 KDA on the temporal characteristics of sleep-wake cycle in pigeons // Тез. конф. “Сон – окно в мир бодрствования”.- Ростов-на-Дону. – 2005.- С.58-59.
13. Лапшина К.В. Влияние белка теплового шока 70 кДа на изменение показателей терморегуляции при эндотоксемии у голубей // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. – Санкт-Петербург. - 2006. - С. 179–180.
14. Лапшина К.В. Эффекты белка теплового шока при экспериментальной эндотоксемии // Тез. XX Съезда физиол. Общества им. И.П. Павлова. - М., 2007. - С.302.
15. Лапшина К.В. Влияние белка теплового шока 70 кДа на изменение показателей лихорадочной реакции у крыс // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. – Санкт-Петербург. - 2007. - С. 235-236.
16. Lapshina K.V., Ekimova I.V. Effect of heat shock protein 70 kDa on thermoregulatory characteristics during the intoxication stress in rats and pigeons // Abstr. of the 10th Jubilee Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry “Stress and behavior”. - St.-Petersburg. - 2007. - P. 25-26.
17. Лапшина К.В. Влияние белка теплового шока 70 кДа на кислотно-резистентность эритроцитов и показатели терморегуляции при эндотоксемии у крыс // Тез. конф. “Человек и его здоровье”. – Санкт-Петербург. - 2008. - С. 192-193.
18. Lapshina K.V. Exogenous Hsp70 affects sleep and thermoregulation after the sleep deprivation in pigeons. Abstr. of the Scandinavian Physiological Society’s Annual Meeting. –Oulu. - 2008. - V.193. - Suppl. 664. - P.131.
19. Lapshina K., Khudik K. Effects of inducible and constitutive isoforms of heat shock protein 70 on thermoregulatory characteristics in pigeons // Abstr. of the 12th Multidisciplinary International Conference of Biological Psychiatry “Stress and behavior”.- St.-Petersburg. - 2009. - P. 41.
20. Lapshina K.V. Exogenous heat shock protein 70 kDa affects sleep and thermoregulatory characteristics during endotoxaemia in pigeons // Abstr. of the Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies. – Copenhagen. - 2010. - P. 81-82.
21. Лапшина К.В. Белок стресса HSP70 в восстановлении физиологических функций после насильственного лишения сна и при эндотоксемии // Тез. XXI съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова. - Калуга. - 2010. - С.343.