

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, NAS of Ukraine / Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України  
 Ukraine, 03142, Kyiv, 42 Acad. Vernadskogo Ave. / Адреса: Україна, 03142, Київ, бульв. Академіка Вернадського 42  
 Tel.: +380672641530, +380509772633 / Тел.: +380672641530, +380509772633  
 E-mail: [sdybkova@gmail.com](mailto:sdybkova@gmail.com)

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 27.04.2025 / Стаття надійшла 27.04.2025 року  
 Accepted 13.08.2025 / Стаття прийнята до друку 13.08.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-122-128

UDC 577.12.084:612.592:615.21

Myrnyi V. H., Moisieieva N. M.

## MODULATION OF NITROGEN METABOLISM UNDER CHRONIC COLD STRESS IN GUINEA PIGS: THE ROLE OF DALARGIN AND NALOXONE IN MEDIATING A PROTECTIVE EFFECT

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine  
 (Kharkiv, Ukraine)

[ukrainanataliy@gmail.com](mailto:ukrainanataliy@gmail.com)

*Adaptation to cold stress is a critical process for maintaining viability under extreme low-temperature conditions. This process activates complex neurohumoral mechanisms that ensure thermogenesis, homeostasis, and functional stability of the organism. One of the key research areas is the study of synthetic neuropeptides, such as dalargin, which are capable of reducing cellular stress, preventing apoptosis, and promoting cell proliferation. However, the effects of this peptide on key markers of nitrogen metabolism, such as creatinine and urea, under prolonged cooling conditions remain insufficiently studied. The aim of this work was to assess the impact of dalargin on nitrogen metabolism markers (urea and creatinine) in guinea pigs under chronic cold stress (CCS) and to investigate the mechanisms underlying its protective effects. The experiment was conducted on guinea pigs, which were subjected to CCS through reduced ambient temperature. The results showed that CCS caused an increase in urea levels and a decrease in creatinine levels, indicating disturbances in nitrogen metabolism, enhanced catabolism, and impaired kidney function. Administration of dalargin led to a reduction in urea levels, but creatinine levels remained similar to those of the CCS group, indicating the selective nephroprotective effect of dalargin. To further explore the mechanisms of this action, the synthetic neuropeptide antagonist, naloxone, was used. The results demonstrated that naloxone administration partially reduced urea levels but did not restore the parameters to control levels. The data obtained confirm the role of opioid regulation in cold stress adaptation and indicate the potential of dalargin to correct nitrogen metabolism disturbances under CCS. These findings open prospects for the use of neuropeptides in the treatment of metabolic disorders under extreme temperature conditions.*

**Key words:** adaptation, cold stress, hypothermia, homeothermic animals, protein metabolism, blood biochemical parameters, dalargin, cryobiology.

### Connection of the publication with planned research works.

The study was conducted within the framework of research project "Investigation of the protective effects of synthetic neuropeptide analogs on the body of homeothermic animals and isolated cells exposed to cold stress," state registration number 2.2.6.136 (0121V100384).

### Introduction.

Metabolic adaptation of the organism to low temperatures is a highly relevant topic in contemporary experimental and clinical physiology, as it ensures the maintenance of homeostasis, energy balance, and viability under cold stress conditions. Investigating the molecular mechanisms underlying this adaptation is essential for developing effective strategies to prevent and correct disorders caused by extreme temperature exposure. It is well established that cold exposure activates complex neurohumoral mechanisms that induce a

restructuring of energy metabolism to support thermogenesis and maintain internal homeostasis [1, 2, 3, 4]. In recent years, increasing attention has been directed toward the role of neuropeptides as potential modulators of these adaptive responses. Of particular interest are dalargin, a synthetic analog of Leu-enkephalin, and naloxone, a competitive opioid receptor antagonist [5, 6]. Contemporary research highlights the cytoprotective and anti-inflammatory properties of opioid peptides in various models of cellular stress. For instance, the synthetic Leu-enkephalin analog D-Ala<sup>2</sup>-Leu<sup>5</sup>-enkephalin (DADLE), which selectively activates delta-opioid receptors, has been shown to enhance the viability of human mesenchymal stem cells under serum deprivation through activation of the delta-opioid receptor-phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B signaling pathway (DOR/PI3K/AKT) [7]. Moreover, DADLE has been demonstrated to reduce reactive oxygen species production, increase the expression of the anti-apoptot-

ic protein, and suppress the expression of pro-apoptotic proteins in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells subjected to oxidative stress [8]. Studies also show that opioid neuropeptides, particularly synthetic Leu-enkephalin (dalargin), help preserve proliferative potential, reduce apoptosis and necrosis, and thereby support cellular function and metabolic homeostasis under stress conditions [5, 6]. Despite the growing body of literature, the effects of dalargin and naloxone on energy metabolism under chronic cold stress (CCS), and the mechanisms underlying their protective actions, remain insufficiently explored. In particular, little is known about changes in nitrogen metabolites – creatinine and urea – which serve as indirect but informative markers of amino acid catabolism and general metabolic reprogramming. Analyzing these parameters provides deeper insight into the mechanisms of cold adaptation and the potential of neuropeptides to modulate systemic metabolism.

**The aim of the study.**

To evaluate the effects of dalargin and naloxone on nitrogen metabolism parameters – specifically, serum creatinine and urea concentrations – in guinea pigs under conditions of chronic cold stress, and to elucidate the mechanisms underlying their protective actions.

**Object and research methods.**

The study was conducted on sexually mature male guinea pigs of the Dunkin-Hartley strain, aged 5-6 months, with an average body weight of 600–800 g. The animals were housed under standard vivarium conditions at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine. All animal procedures were performed in accordance with the guidelines and recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, Strasbourg, 1986). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine (Protocol No. 5, dated 22.11.2022).

The animals were randomly divided into three groups: Intact group – animals not exposed to CCS, maintained at a constant temperature of 18°C; Control group – animals administered 0.5 mL of physiological saline subcutaneously 30 minutes prior to CCS induction; Dalargin group – animals administered dalargin at a dose of 100 µg/kg subcutaneously 30 minutes prior to CCS induction; The group of animals that received a combined subcutaneous injection of naloxone and dalargin at a dose of 100 µg/kg, administered 30 minutes prior to the induction of chronic cold stress (CCS). Forty-eight animals were involved in the experiment, divided into four groups of 12 animals each.

Chronic cold stress (CCS) was modeled according to the method described in [9], adapted for laboratory conditions by modifying the temperature regimen to ensure reproducibility of the stress response while maintaining ethical standards of animal care. The animals were alternately exposed to temperatures of 18°C and 4°C: initially for 1 hour, followed by a 5-day cycle of alternating 12 hours at 4°C and 12 hours at 18°C. On day 6, the stress exposure was terminated, and blood samples were collected via jugular vein puncture.

Urea concentration in blood serum was determined using an enzymatic method based on urease and gluta-

mate dehydrogenase (GLDH) with absorbance measured at 340 nm. Creatinine concentration was measured using a colorimetric method based on the reaction with picric acid at 520–540 nm. Standard diagnostic kits were used for the analysis (“Cormay Urea” and “Cormay Creatinine,” Poland) according to the manufacturer’s protocols. The results were expressed in mmol/L for urea and µmol/L for creatinine.

Data Analysis: Statistical analysis was performed using Statistica 10 (StatSoft, USA) and Excel (Microsoft, USA). Normality of distribution was assessed using the Shapiro–Wilk W-test. Experimental results are presented as mean ± standard deviation for data with normal distribution. Statistical significance of differences between groups was assessed using the Mann–Whitney U-test. Differences were considered statistically significant at p<0.05.

**Research results and their discussion.**

The results of the biochemical analysis presented in **table** demonstrate changes in the concentrations of the key nitrogen-containing metabolites – creatinine and urea – in the blood serum of guinea pigs under conditions of cold stress and following pharmacological correction using dalargin and naloxone.

In the intact group, the creatinine level was 38.50±1.4 µmol/L, corresponding to the physiological norm for this species. In animals subjected to chronic cold stress (CCS), a statistically significant 1.2-fold decrease in creatinine concentration was observed (p<0.01). This trend likely reflects a reduction in muscle activity or catabolic processes due to adaptation to prolonged cold exposure, aligning with literature reports on suppressed creatine metabolism under stress [10, 11]. Administration of dalargin did not lead to notable changes in creatinine levels, which remained similar to the CCS group, indicating that dalargin was ineffective in normalizing this parameter. At the same time, in the group of animals that received a combined administration of naloxone and dalargin under conditions of chronic cold stress (CCS), the creatinine level was 36.5 ± 0.5 µmol/L and did not differ statistically from the values of the intact control group. This may suggest that naloxone, as an opioid receptor antagonist, influences creatinine levels not through classical opioid mechanisms but indirectly – possibly by attenuating the effects of endogenous opioids that, in response to CCS, may contribute to hypercatabolism or vasoconstriction, thereby impairing renal perfusion. By blocking these effects, naloxone may stabilize renal function and reduce creatinine production or retention. In other words, under CCS, the effects of endogenous opioids may be not only protective but also dysregulatory, explaining why creatinine levels in the naloxone group were closer to physiological norms.

**Table – Creatinine and urea concentrations in animal blood serum under different experimental conditions**

Groups	Parameters	
	Creatinine, (µmol/L)	Urea, (mmol/L)
Intact group	38.50±1.4	6.25±0.12
Chronic cold stress (CCS)	31.17±0.4*	7.35±0.2*
CCS + dalargin	30.67±0.3*	5.73±0.1#
CCS + dalargin + naloxone	36.50±0.5#	7.15±0.6

**Notes:** \* – statistically significant compared to the intact group (p<0.05); # – statistically significant compared to CCS (p<0.05).

Unlike creatinine, urea levels changed in the opposite direction. In animals exposed to CCS, a statistically significant increase in urea concentration was recorded – up to  $7.35 \pm 0.2$  mmol/L ( $p < 0.05$ ) compared to intact controls – suggesting activation of protein catabolism or impairment of renal excretory function, both typical responses to stress [12]. Pre-treatment with dalargin significantly reduced urea levels – by 1.3 times compared to the CCS group ( $p < 0.05$ ), with the value even falling below that of the intact control. This effect may reflect the anti-stress action of dalargin, reduction in catabolic activity, and improvement in renal function under stress. A particularly noteworthy finding was observed in the naloxone group: urea levels remained elevated ( $7.15 \pm 0.6$  mmol/L), and although not statistically different from the intact group, they were significantly higher—by 1.3 times—compared to the dalargin-treated group ( $p < 0.05$ ). This suggests that the nephroprotective effect of dalargin is mediated via activation of opioid receptors, and that naloxone partially negates these beneficial effects, which is consistent with previous studies [5, 6]. Naloxone alone does not exert a protective effect on nitrogen metabolism under cold stress, nor does it compensate for stress-induced dysfunction or modulate catabolism or renal excretion.

These results confirm the important role of endogenous opioid peptides in regulating nitrogen metabolism and supporting the homeostatic response of the organism under prolonged cold stress. Specifically, CCS leads to altered concentrations of major markers of nitrogen metabolism – urea and creatinine – indicating disruptions in metabolic homeostasis and renal function. The obtained data align with previous findings [13, 14], which reported that stress, particularly low temperatures, can destabilize metabolism and reduce antioxidant activity in renal tissue, ultimately leading to impaired kidney function. In this context, the role of opioid neuropeptides, such as dalargin, can be considered a crucial element of the adaptive response aimed at stabilizing nitrogen metabolism and maintaining the functional activity of vital organs. Teległów A et al. [15] also confirmed the impact of prolonged cold stress on kidney function, particularly through a decrease in antioxidant defense. In a human who spent 50 days in extremely low temperatures, reduced levels of urea and creatinine in urine were found, indicating activation of cold adaptation

mechanisms. Yang Y. et al. [16] reported significant disturbances in lipid metabolism, gluconeogenesis, and the functional activity of the liver and kidneys in rats under cold stress, with elevated plasma creatinine indicating disrupted metabolic processes and renal function. In another study [17], researchers assessed leucine and urea metabolism in humans during short-term cold exposure. The results showed increased protein catabolism, which may affect urea levels in the body. Thus, our findings are consistent with the conclusions of Henry et al. [18], who emphasized the significance of endogenous opioid peptides, particularly enkephalins, in the regulation of stress resilience, especially under conditions of chronic cold stress. Enkephalins participate in neuroendocrine and metabolic adaptation, supporting homeostasis during stress. Dalargin, a synthetic analogue of Leu-enkephalin, exhibits anti-stress and nephroprotective effects under cold stress, stabilizing nitrogen metabolism and reducing protein catabolism. A comparison with naloxone suggests that dalargin's protective effects are mediated via activation of opioid receptors, facilitating adaptation to stress. These findings support the rationale for further exploration of opioid modulation of metabolic processes under stress conditions and the potential of dalargin as an adaptogenic agent for use in cold or other extreme environments.

#### Conclusions.

Chronic cold stress disrupts nitrogen metabolism in guinea pigs, as evidenced by increased urea and decreased creatinine concentrations in blood serum. Dalargin reduces urea levels but does not normalize creatinine, whereas the effects of naloxone support the involvement of opioid regulation in cold adaptation.

#### Prospects for further research.

The results obtained outline promising directions for further investigation into the role of the opioid system in the mechanisms of metabolic adaptation to cold stress. Future studies should evaluate the effects of dalargin under combined stress conditions (e.g., cold combined with hypoxia) and in pathologies associated with disturbances in protein and nitrogen metabolism. Special attention should be paid to the potential of dalargin as an adaptogenic agent under wartime conditions, where maintaining physiological resilience to extreme stressors is particularly relevant.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-122-128

УДК 577.12.084:612.592:615.21

Мирний В. Г., Моїсєєва Н. М.

## МОДУЛЯЦІЯ АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛІЗМУ ПІД ВПЛИВОМ ХРОНІЧНОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ У МОРСЬКИХ СВИНОК: РОЛЬ ДАЛАРГІНУ ТА НАЛОКСОНУ В РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОТЕКТОРНОГО ЕФЕКТУ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

[ukrainanataliy@gmail.com](mailto:ukrainanataliy@gmail.com)

*Адаптація організму до холодного стресу є важливим процесом для підтримання життєздатності в екстремальних умовах низьких температур. Цей процес активує складні нейрогуморальні механізми, які забезпечують термогенез, гомеостаз та стабільність функцій організму. Одним із ключових напрямків досліджень є вивчення синтетичних нейропептидів, таких як даларгін, які здатні знижувати клітинний стрес, запобігати апоптозу та сприяти проліферації клітин. Однак вплив цього пептиду на рівень основних маркерів азотистого обміну, таких як креатинін та сечовина, при тривалому охолодженні залишається недостатньо вивченим. Метою цієї роботи було оцінити вплив даларгіну на показники азотистого обміну (сечовина і креатинін) у морських свинок за умов хронічного холодного стресу (ХХС)*

та визначити шляхи реалізації протекторної дії цього пептиду. Для проведення експерименту було використано морських свинок, яким моделювали ХХС через зниження температури навколишнього середовища. Результати показали, що ХХС спричиняв підвищення сечовини та зниження креатиніну, що вказує на порушення азотистого обміну, посилення катаболізму та зниження функції нирок. Введення даларгіну призвело до зниження рівня сечовини, однак рівень креатиніну залишався на рівні тварин, підданих ХХС, що вказує на вибірковість його нефропротекторної дії. Для з'ясування механізмів цієї дії було використано антагоніст синтетичного нейропептиду – налоксон. Результати досліджень показали, що введення налоксону частково зменшувало рівень сечовини, проте не забезпечувало повного відновлення показників до рівня інтактного контролю. Отримані дані підтвердили роль опіоїдної регуляції в адаптації до холодного стресу та вказують на здатність даларгіну коригувати порушення азотистого обміну при ХХС. Це відкриває перспективи для використання нейропептидів у лікуванні метаболічних порушень за умов екстремальних температур.

**Ключові слова:** адаптація, холодний стрес, гіпотермія, гомойотермні тварини, білковий метаболізм, біохімічні показники крові, даларгін, кріобіологія.

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.**

Дослідження виконано в рамках НДР «Дослідження захисної дії синтетичних аналогів нейропептидів на організм гомойотермних тварин та ізольовані клітини, піддані холодному стресу», номер державної реєстрації 2.2.6.136 (0121V100384).

**Вступ.**

Метаболічна адаптація організму до дії низьких температур є актуальним напрямом сучасної експериментальної та клінічної фізіології, оскільки забезпечує збереження гомеостазу, енергетичної рівноваги та життєздатності в умовах холодного стресу. Дослідження молекулярних механізмів цієї адаптації має важливе значення для розробки ефективних підходів до профілактики й корекції порушень, спричинених впливом екстремальних температур. Встановлено, що охолодження активує складні нейрогуморальні механізми, які забезпечують перебування енергетичного обміну з метою підтримання термогенезу та стабільності внутрішнього гомеостазу [1, 2, 3, 4]. Протягом останнього десятиліття у фокусі досліджень перебуває роль нейропептидів як потенційних модуляторів цих адаптивних реакцій. Особливу увагу привертають даларгін – синтетичний аналог лей-енкефаліну, та налоксон – конкурентний антагоніст опіоїдних рецепторів [5, 6]. Сучасні дослідження демонструють цитопротекторні та протизапальні властивості опіоїдних пептидів у моделях клітинного стресу. Зокрема, доведено, що синтетичний аналог лей-енкефаліну – D-Аланін<sup>2</sup>-лейцин<sup>5</sup>-енкефалін (DADLE), який вибірково активує дельта-опіоїдні рецептори, сприяє підвищенню життєздатності мезенхімальних стовбурових клітин людини в умовах дефіциту сироватки за рахунок активації сигнального шляху дельта-опіоїдного рецептора–фосфоінзитид-3-кінази–протеїнкінази B (DOR/PI3K/AKT) [7]. Крім того, показано, що DADLE зменшує утворення активних форм кисню, підвищує рівень антиапоптотичного білка і пригнічує експресію проапоптотичних білків у мезенхімальних стовбурових клітинах пуповинної крові людини, які зазнали оксидативного стресу [8]. В дослідженнях [5, 6] доведено, що нейропептиди опіоїдної дії, зокрема синтетичний лей-енкефалін (даларгін), здатні зберігати проліферативний потенціал клітин і знижувати рівень апоптозу й некрозу, тим самим сприяючи підтриманню клітинних функцій і метаболічного гомеостазу за стресових умов. Незважаючи на зростаючу кількість публікацій, досі

недостатньо вивченим залишається вплив даларгіну та налоксону на показники енергетичного обміну в умовах хронічного холодного стресу і шляхи реалізації їхньої протекторної дії. Зокрема, малодослідженими є зміни рівнів азотистих метаболітів – креатиніну та сечовини, які виступають непрямими, але інформативними маркерами катаболізму амінокислот і загальної метаболічної перебудови. Аналіз цих параметрів дозволяє глибше зрозуміти механізми адаптації до тривалого охолодження та потенційний корекційний вплив нейропептидів на системний метаболізм.

**Мета дослідження.**

Оцінити вплив даларгіну та налоксону на показники азотистого обміну, зокрема на концентрацію креатиніну та сечовини в сироватці крові морських свинок за умов хронічного холодного стресу, а також з'ясувати механізми реалізації цього впливу.

**Об'єкт і методи дослідження.**

Дослідження проведено на статевозрілих самцях морських свинок лінії Dunkin-Hartley віком 5-6 місяців із середньою вагою 600-800 г. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Всі маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до правил і рекомендацій European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes/Council of Europe (Strasbourg, 1986). Комітет із біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 5 від 22.11.2022 р.).

Тварини були поділені на три групи: 1) інтактна група (тварини, яких не піддавали дії хронічного холодного стресу (ХХС) і утримували при температурі 18°C); 2) контрольна група (тварини, яким вводили 0,5 мл фізіологічного розчину під шкіру за 30 хв до моделювання ХХС); 3) група тварин, яким вводили препарат даларгін у дозі (100 мкг/кг) під шкіру за 30 хв до моделювання ХХС; 4) група тварин, яким вводили одночасно препарати налоксон і даларгін у дозі (100 мкг/кг) під шкіру за 30 хв до моделювання ХХС. До експерименту було залучено 48 тварин, розподілених на чотири групи по 12 тварин у кожній.

Моделювання ХХС здійснювали за методикою [9], адаптованою до умов лабораторії шляхом модифікації температурного режиму, що забезпечило відтворюваність стресової відповіді при збереженні етичних стандартів утримання тварин: яких по черзі утримували при температурі 18 та 4°C спочатку про-

тягом однієї години, а потім протягом 5 діб – 12 годин при температурі 4°C і 12 годин при 18°C. Стресове навантаження припиняли на 6-й день і проводили забір крові шляхом пункції яремної вени.

Концентрацію сечовини в сироватці крові визначали ензиматичним методом з використанням уреаз та ГДГ при 340 нм, а креатиніну – колориметричним методом за реакцією з пікриновою кислотою при 520-540 нм. Аналіз проводили з використанням стандартних наборів («Cormay Urea», «Cormay Creatinine», Польща) згідно з інструкціями виробника. Результати виражали в ммоль/л (сечовина) та мкмоль/л (креатинін).

Для статистичного аналізу даних використовували програми Statistica 10 («StatSoft», США) та Excel (Microsoft, США). Нормальність розподілу визначали за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлкі. Результати експериментів представлені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення для даних з нормальним розподілом. Статистичну значимість відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні (для усіх даних). Відмінності вважали статистично значимими при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Результати біохімічного аналізу, представлені в таблиці, демонструють зміни концентрації основних азотвмісних метаболітів – креатиніну та сечовини – у сироватці крові морських свинок за умов холодового стресу та під впливом фармакологічної корекції за допомогою даларгіну і налоксону.

**Таблиця – Концентрація креатиніну та сечовини в сироватці крові тварин за різних умов експерименту**

Групи	Показники	
	Креатинін, (мкмоль/л)	Сечовина, (ммоль/л)
Інтактна група	38,50±1,4	6,25±0,12
Хронічний холодовий стрес (ХХС)	31,17±0,4*	7,35±0,2*
ХХС + даларгін	30,67±0,3*	5,73±0,1#
ХХС + даларгін+налоксон	36,50±0,5#	7,15±0,6

**Примітки:** \* – статистично значуще відносно інтактної групи ( $p < 0,05$ ); # – статистично значуще відносно ХХС ( $p < 0,05$ ).

У тварин інтактної групи рівень креатиніну становив 38,50±1,4 мкмоль/л, що відповідає фізіологічній нормі для даного виду. У групі тварин, які зазнавали хронічного холодового стресу (ХХС), відзначено статистично значиме зниження концентрації креатиніну у 1,2 рази ( $p < 0,01$ ). Така тенденція, ймовірно, відображає зниження м'язової активності або катаболічних процесів внаслідок адаптації до тривалого холоду, що узгоджується з даними літератури про гальмування метаболізму креатину при стресових впливах [10, 11]. Введення тваринам даларгіна не приводило до значних змін рівня креатиніну, який залишався на рівні, схожому з групою ХХС, що вказує на відсутність ефективності даларгіну в нормалізації цього показника. У той же час, у групі тварин, яким вводили одночасно налоксон і даларгін на фоні ХХС, рівень креатиніну становив 36,5±0,5 мкмоль/л і не відрізнявся статистично від значень інтактного контролю. Такий результат може свідчити про те, що налоксон, як антагоніст опіоїдних рецепторів, впливає на рівень креатиніну не через класичну опіоїдну регуляцію, а

опосередковано – наприклад, шляхом зменшення впливу ендогенних опіоїдів, які у відповідь на хронічний холодовий стрес могли сприяти гіперкатаболізму або вазоконстрикції, погіршуючи ниркову перфузію. Блокуючи цей вплив, налоксон потенційно стабілізує функцію нирок і знижує продукцію або зменшує затримку креатиніну. Іншими словами, в умовах ХХС дія ендогенних опіоїдів може мати не лише захисний, але й дисрегуляторний ефект, що пояснює, чому в групі з налоксоном рівень креатиніну був ближчим до фізіологічної норми.

На відміну від креатиніну, рівень сечовини зазнав протилежних змін. У тварин, підданих (ХХС), спостерігалось статистично значуще підвищення цього показника до 7,35 ± 0,2 ммоль/л ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактним контролем, що може свідчити про активацію білкового катаболізму або порушення ниркової екскреторної функції – типові реакції організму на стресові впливи [12]. Застосування даларгіну перед моделюванням ХХС сприяло значному зниженню рівня сечовини – у 1,3 раза порівняно з групою ХХС ( $p < 0,05$ ), причому цей показник був навіть нижчим за значення інтактної групи. Такий ефект може свідчити про антистресорну дію даларгіну, зниження катаболічної активності та покращення ниркової функції в умовах стресу. Особливу увагу привертає результат після застосування налоксону: рівень сечовини залишався підвищеним (7,15 ± 0,6 ммоль/л), і хоча відмінності щодо інтактної групи не були статистично значущими, у порівнянні з тваринами яким вводили даларгін значення було статистично значимо вищим – у 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Це вказує на те, що нефропротекторний ефект даларгіну реалізується через активацію опіоїдних рецепторів, а блокада цього механізму налоксоном частково нівелює позитивні зміни, що корелює з дослідженням [5, 6]. Налоксон сам по собі не чинить захисного впливу на метаболізм азотвмісних сполук при холодовому стресі тому і не компенсує дисфункцію, спричинену стресом, і не модулює катаболізм або ниркову екскрецію.

Одержані результати підтверджують важливу роль ендогенних опіоїдних пептидів у регуляції азотистого обміну та забезпеченні гомеостатичної відповіді організму на тривалий холодовий стрес. Зокрема, встановлено, що хронічний холодовий стрес призводить до змін у концентрації основних маркерів азотистого обміну – сечовини та креатиніну, що свідчить про порушення метаболічного гомеостазу і функціонального стану нирок. Отримані дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень [13, 14], в яких було показано, що стресові впливи, зокрема низька температура, спричиняють дестабілізацію обміну речовин та зниження антиоксидантної активності у нирковій тканині, що, у свою чергу, зумовлює порушення ниркової функції. У цьому контексті роль опіоїдних нейропептидів, таких як даларгін, може розглядатися як важливий елемент адаптаційної відповіді, спрямованої на стабілізацію азотистого обміну та підтримання функціональної активності життєво важливих органів. Автори Teległów A та співавт. [15] також підтвердили вплив тривалого холодового стресу на функцію нирок, зокрема через зниження антиоксидантного захисту. У людини, яка перебувала 50 днів при екстремально низьких температурах, виявлено зменшення рівнів сечовини та креатиніну

в сечі, що свідчить про активацію адаптаційних механізмів до холоду. Автори. Yang Y. et al. [16] показали суттєві порушення у метаболізмі ліпідів, глюконеогенезі, а також функціональній активності печінки і нирок у щурів під впливом холододового стресу. Автори виявили підвищення рівня креатиніну в плазмі, що вказує на порушення метаболічних процесів та функції нирок. В дослідженнях [17] оцінювали метаболізм лейцину та сечовини у людей під час короткочасного впливу холоду. Результати показали збільшення катаболізму білків, що може впливати на рівень сечовини в організмі. Таким чином отримані результати дослідження узгоджуються з висновками Henry et al. [18], які підкреслюють важливість ендогенних опіоїдних пептидів, зокрема енкефалінів, у регуляції стресостійкості організму, особливо в умовах хронічного холододового стресу. Енкефаліни беруть участь у нейроендокринній та метаболічній адаптації, підтримуючи гомеостаз під час стресу. Даларгін, синтетичний аналог лей-енкефаліну, проявляє антистресорну та нефропротекторну дію при холододовому стресі, стабілізуючи азотистий обмін і знижуючи білковий катаболізм. Порівняння ефектів з налоксоном дозволяє припустити, що протекторна дія даларгіну реалізується через активацію опіоїдних рецепторів, що сприяє адаптації організму до стресу. Ці результати

підтверджують доцільність подальших досліджень опіоїдної модуляції метаболічних процесів при стресових впливах і потенціал даларгіну як адаптогенного засобу для застосування в умовах холоду або інших екстремальних факторів.

#### Висновки.

Хронічний холододовий стрес зумовлює порушення азотистого обміну у морських свинок, що проявляється підвищенням сечовини та зниженням креатиніну в сироватці крові. Даларгін знижує рівень сечовини, але не нормалізує креатинін, тоді як ефекти налоксона підтверджують залучення опіоїдної регуляції в адаптацію до охолодження.

#### Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати окреслюють перспективи подальшого вивчення ролі опіоїдної системи в механізми метаболічної адаптації до дії холододового стресу. У майбутніх дослідженнях доцільно оцінити вплив даларгіну в умовах комбінованого стресу (наприклад, холод у поєднанні з гіпоксією) та при патологіях, що супроводжуються порушенням білкового й азотистого обміну. Особливої уваги заслуговує аналіз потенціалу даларгіну як адаптогенного засобу в умовах воєнного стану, коли зростає потреба у підтриманні фізіологічної стійкості організму до екстремальних навантажень.

### References / Література

- Gao R, Shi L, Guo W, Xu Y, Jin X, Yan S, et al. Effects of housing and management systems on the growth, immunity, antioxidation, and related physiological and biochemical indicators of donkeys in cold weather. *Animals*. 2022;12(18):2405.
- Gao Y, Liu Y, He J, Zhang Y, Wang T, Wu L, et al. Effects of heat waves and cold spells on blood parameters: a cohort study of blood donors in Tianjin, China. *Environ Health Prev Med*. 2024;29:25.
- Saeki K, Obayashi K, Kurumatani N. Platelet count and indoor cold exposure among elderly people: a cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *J Epidemiol*. 2017;27(12):562-7.
- Boutillier RG. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol*. 2001;204:3171-81.
- Gulevskyy OK, Moisieieva NM, Gorina OL. Vplyv ley-enkefalinu (dalarhinu) na rozvytok apoptozu i nekrozu leykotsytiv pisylya kholodovoho stresu. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022;32(1):14-23 DOI: <https://doi.org/10.15407/cryo32.01.014>. [in Ukrainian].
- Gulevskyy OK, Moisieieva NM, Gorina O. Preincubation of L929 line fibroblasts with synthetic leu-enkephalin Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg preserves their proliferative potential under cold stress. *Cytol Genet*. 2022;56(4):343-50.
- Reddy LVK, Sen D. DADLE enhances viability and anti-inflammatory effect of human MSCs subjected to 'serum free' apoptotic condition in part via the DOR/PI3K/AKT pathway. *Life Sci*. 2017;191:195-204.
- Mullick M, Venkatesh K, Sen D. D-Alanine<sup>2</sup>, Leucine<sup>8</sup> Enkephalin (DADLE)-mediated DOR activation augments human hUCB-BFs viability subjected to oxidative stress via attenuation of the UPR. *Stem Cell Res*. 2017;22:20-8.
- Namimatsu A, Go K, Hata T. Regulatory effect of neurotrophin on nasal mucosal hypersensitivity in guinea pigs caused by SART (intermittent exposure to cold) stress. *Jpn J Pharmacol*. 1992;59(3):371-7.
- Luszczek ER, Lexcen DR, Witowski NE, Determan C Jr, Mulier KE, Beilman G. Prolonged induced hypothermia in hemorrhagic shock is associated with decreased muscle metabolism: a nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *Shock*. 2014;41(1):79-84. DOI: [10.1097/SHK.0000000000000061](https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000061).
- Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, Erickson BK, Shinoda K, Cohen P, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell*. 2015;163(3):643-655. DOI: [10.1016/j.cell.2015.09.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035).
- Karabanova LV. Azotystyi obmin pry stressi riznoyi pryrody. *Visn Probl Biol Med*. 2018;1(142):112-7. [in Ukrainian].
- Hu L, Brito LF, Abbas Z, Sammad A, Kang L, Wang D, et al. Investigating the short-term effects of cold stress on metabolite responses and metabolic pathways in Inner-Mongolia Sanhe cattle. *Animals*. 2021;11(9):2493. DOI: [10.3390/ani11092493](https://doi.org/10.3390/ani11092493).
- Nwogueze BC, Ofili IM, Nnama TN, Aloamaka CP. Oxidative stress-induced by different stressors alters kidney tissue antioxidant markers and levels of creatinine and urea: the fate of renal membrane integrity. *Sci Rep*. 2023;13(1):13309. DOI: [10.1038/s41598-023-40454-5](https://doi.org/10.1038/s41598-023-40454-5).
- Telegiów A, Skowron B, Romanowski V. Laboratory analysis of the renal function changes under long-term exposure to extremely low ambient temperatures: case report. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2024;14(1):59-65. DOI: [10.1089/ther.2023.0086](https://doi.org/10.1089/ther.2023.0086).
- Yang Y, Wang Y, Zhang J, Han Z, Chen A, Pan S, et al. System responses to chronic cold stress probed via <sup>1</sup>H NMR spectroscopy in plasma and urine matrices. *Mol BioSyst*. 2015;11(5):1425-33.
- Goodenough RD, Berger EM, Frick GP. Leucine and urea metabolism in acute human cold exposure. *J Appl Physiol*. 1982;53(2):367-72. DOI: [10.1152/jap.1982.53.2.367](https://doi.org/10.1152/jap.1982.53.2.367).
- Henry MS, Gendron L, Tremblay ME, Drolet G. Enkephalins: Endogenous Analgesics with an Emerging Role in Stress Resilience. *Neural Plast*. 2017;2017:1546125. DOI: [10.1155/2017/1546125](https://doi.org/10.1155/2017/1546125).

### МОДУЛЯЦІЯ АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛІЗМУ ПІД ВПЛИВОМ ХРОНІЧНОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ У МОРСЬКИХ СВИНОК: РОЛЬ ДАЛАРГІНУ ТА НАЛОКСОНУ В РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОТЕКТОРНОГО ЕФЕКТУ

Мирний В. Г., Моїсєєва Н. М.

**Резюме.** У фізіології зростає інтерес до механізмів метаболічної адаптації організму до холододового стресу, що активує складні нейрогуморальні реакції для підтримання термогенезу та гомеостазу. Особливу увагу приділяють нейропептидам – даларгіну та налоксона, які знижують клітинний стрес, пригнічують апоптоз і підтримують проліферацію. Проте їхній вплив на рівні креатиніну та сечовини – ключових маркерів азотистого обміну – за умов тривалого охолодження досі вивчено недостатньо.

Метою роботи було оцінити вплив даларгіну на показники азотистого обміну (сечовина і креатинін) у морських свинок за умов хронічного холодного стресу (ХХС) та визначити шляхи реалізації протекторної дії цього пептиду.

Експеримент проведено на морських свинках, яким моделювали ХХС з подальшим введенням даларгіну або налоксону. Визначали концентрацію сечовини та креатиніну в сироватці крові стандартними біохімічними методами.

ХХС спричиняв статистично значиме зростання рівня сечовини та зниження креатиніну. Даларгін знижував рівень сечовини, але не нормалізував концентрацію креатиніну. Налоксон частково зменшував гіперуремію, однак не відновлював показники до рівня інтактного контролю. ХХС призводив до порушення азотистого обміну у морських свинок, що виявлялося достовірним підвищенням концентрації сечовини та зниженням рівня креатиніну в сироватці крові порівняно з інтактним контролем. Це вказує на посилення катаболізму та пригнічення функції нирок. Введення даларгіну сприяло зниженню гіперуремії, однак рівень креатиніну залишався на рівні тварин, підданих лише ХХС, що може свідчити про вибірковість його нефропротекторної дії. Налоксон також частково зменшував рівень сечовини, проте не забезпечував повної нормалізації досліджуваних показників.

Отримані дані підтвердили залучення опіоїдної регуляції до механізмів адаптації до тривалого охолодження, а також вказують на потенційну здатність даларгіну коригувати порушення азотистого обміну в умовах ХХС.

**Ключові слова:** адаптація, холодний стрес, гіпотермія, гомойотермні тварини, білковий метаболізм, біохімічні показники крові, даларгін, кріобіологія.

### MODULATION OF NITROGEN METABOLISM UNDER CHRONIC COLD STRESS IN GUINEA PIGS: THE ROLE OF DALARGIN AND NALOXONE IN MEDIATING A PROTECTIVE EFFECT

Myrnyi V. H., Moisieieva N. M.

**Abstract.** There is increasing interest in physiology regarding the mechanisms of metabolic adaptation of the body to cold stress, which triggers complex neurohumoral responses to maintain thermogenesis and homeostasis. Particular attention is paid to neuropeptides such as dalargin and naloxone, which reduce cellular stress, suppress apoptosis, and support cell proliferation. However, their effects on creatinine and urea levels – key markers of nitrogen metabolism – under prolonged cooling conditions remain insufficiently studied.

The aim of the study was to assess the effect of dalargin on nitrogen metabolism markers (urea and creatinine) in guinea pigs under chronic cold stress (CCS) and to identify the mechanisms underlying the protective action of this peptide.

The experiment was conducted on guinea pigs exposed to CCS and treated with either dalargin or naloxone. Urea and creatinine concentrations in blood serum were measured using standard biochemical techniques.

CCS caused a statistically significant increase in urea and a decrease in creatinine levels. Dalargin reduced urea levels but did not normalize creatinine concentrations. Naloxone partially alleviated hyperuremia, yet values did not return to control levels. CCS led to nitrogen metabolism disturbances in guinea pigs, manifested by increased urea and decreased creatinine compared to intact controls, indicating enhanced catabolism and impaired renal function. Dalargin reduced hyperuremia but had no effect on creatinine levels, suggesting selective nephroprotective action. Naloxone partially reduced urea but failed to normalize the studied parameters.

These findings confirm the involvement of opioid regulation in adaptation to prolonged cold exposure and highlight the potential of dalargin to modulate nitrogen metabolism disturbances under CCS conditions.

**Key words:** adaptation, cold stress, hypothermia, homeothermic animals, protein metabolism, blood biochemical parameters, dalargin, cryobiology.

#### ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Myrnyi V. H.: <https://orcid.org/0009-0001-2393-2295><sup>BCD</sup>

Moisieieva N. M.: <https://orcid.org/0000-0002-9845-2317><sup>AEF</sup>

#### Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

#### Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Moisieieva Natalia Mykolayivna / Моїсеєва Наталія Миколаївна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61015, Kharkiv, 23 Pereyaslavska str. / Адреса: Україна, 61015, м. Харків, вул. Переяславська 23

Tel.: +380994933006 / Тел.: +380994933006

E-mail: [ukrainanataliy@gmail.com](mailto:ukrainanataliy@gmail.com)

**A** – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 24.04.2025 / Стаття надійшла 24.04.2025 року

Accepted 12.08.2025 / Стаття прийнята до друку 12.08.2025 року