

METABOLIC COMPONENT OF ADAPTATION TO COLD STRESS IN IN VIVO AND IN VITRO EXPERIMENTS

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

ukrainanataliy@gmail.com

In the present work, a comprehensive study of metabolic and cellular responses to cold stress in in vivo and in vitro models was conducted, allowing the assessment of the effect of the synthetic neuropeptide dalargin on the formation of adaptive metabolic and cytoprotective responses. It was found that administration of dalargin significantly increased blood triglyceride concentrations, which were reduced under chronic cold stress, while the total cholesterol concentration remained decreased. This dynamic indicates the selective action of the peptide on rapidly mobilized energy lipids, whereas cholesterol is regulated by complex, long-term synthesis and degradation mechanisms. It is emphasized that maintaining triglyceride levels is critically important for ensuring the energy homeostasis of the organism under cold stress conditions.

In vitro, cold stress was found to reduce the mitotic index and viability of fibroblasts, whereas dalargin partially prevents the development of these negative changes.

Integration of in vivo and in vitro data provides grounds to conclude that dalargin acts as a selective metabolic and cytoprotective agent, ensuring rapid adaptation of lipid and energy metabolism, maintaining cellular activity and viability under stress conditions, and contributing to the stabilization of systemic homeostasis. The results highlight the potential of dalargin as an effective modulating factor for supporting metabolic and cellular adaptation under cold stress.

Key words: cryobiology, cold stress, hypothermia, homeothermic animals, metabolism, lipid metabolism, mitotic index, cell viability, neuropeptides.

Connection of the publication with planned research work.

The study was conducted within the framework of the SRW "Investigation of the protective effects of synthetic analogs of neuropeptides on the organism of homeothermic animals and isolated cells exposed to cold stress", state registration No. 2.2.6.136 (0121V100384).

Introduction.

The study of metabolic activity in cells and tissues in vivo and in vitro represents a key approach for a comprehensive understanding of organismal responses to cold stress at different levels of biological organization. In vivo models allow assessment of the integrated organismal response, including the interaction of neuroendocrine, metabolic, and thermoregulatory mechanisms, whereas in vitro approaches provide the opportunity for a detailed analysis of cellular adaptations, including the reorganization of energy metabolism, mitochondrial function, lipid homeostasis, and membrane structures [1]. The integration of these two levels of investigation forms a multiscale model, enabling evaluation of cold-induced responses from the systemic to the cellular level. Such an approach is particularly relevant in contemporary studies of stress-induced metabolic changes, allowing identification of specific regulatory mechanisms that may remain undetected in purely in vivo or in vitro conditions. With the growing interest in neurohumoral regulation of metabolism, the endogenous opioid system has received particular attention. As a key component of the anti-stress response, it is capable of modulating metabolic homeostasis, including the regulation of lipid metabolism and energy balance. In this context, evaluating the role of the opioid system through combined in vivo and in vitro studies allows integration of systemic

and cellular aspects of adaptation to cold. Special attention in these studies is focused on dalargin – a synthetic analog of Leu-enkephalin – which, according to the literature, exhibits anti-stress, protective, and metabolically modulatory effects, making it a promising tool for investigating opioid regulation of adaptive processes under cold exposure [2, 3].

It is well established that cold stress (CS) significantly affects lipid metabolism, as lipids serve as primary regulators of cellular energy supply and structural stability [1, 2, 3]. Triglycerides (TG) act as the main substrate for β -oxidation and thermogenesis, and their mobilization reflects the intensity of lipolysis and the overall metabolic activity of tissues [4]. Total cholesterol (TC) is an essential component of biological membranes, determining their fluidity and stability under low-temperature conditions, and also serves as a precursor for the synthesis of steroid hormones that regulate the stress response [5, 6].

Assessing cell viability and proliferative activity is crucial for understanding their adaptive potential under cold stress and allows an objective evaluation of dalargin's protective role as a modulator of cellular resilience, membrane integrity, and regenerative capacity.

The aim of the study.

To evaluate the impact of cold stress on the lipid profile in vivo and on cell proliferation and viability in vitro, and to determine the protective role of opioid peptides.

Object and research methods.

In vivo studies were conducted on sexually mature male Dunkin-Hartley guinea pigs, 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,

NAS of Ukraine. All procedures involving animals were performed in accordance with the rules and recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, Strasbourg, 1986) and approved by the Bioethics Committee of the Institute (Protocol No. 5, 22.11.2022)

Animals were divided into three groups: Intact group – animals not exposed to chronic cold stress (CCS) and maintained at 18°C; control group – animals administered 0.5 mL of saline subcutaneously 30 minutes prior to CCS; Dalargin-treated group – animals administered dalargin at a dose of 100 µg/kg subcutaneously 30 minutes prior to CCS. A total of 36 animals were included in the experiment, distributed into four groups of 12 animals each.

CCS was modeled according to the methodology [7], adapted to laboratory conditions by modifying the temperature regime to ensure reproducibility of the stress response while maintaining ethical standards of animal care: animals were alternately exposed to 18°C and 4°C, initially for one hour, followed by a 5-day cycle of 12 hours at 4°C and 12 hours at 18°C. Stress exposure was terminated on the 6th day, followed by blood collection via jugular vein puncture.

Serum triglyceride concentrations were determined using an enzymatic colorimetric method involving sequential action of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase, and peroxidase, resulting in a colored complex. A commercial kit Triglycerides liquicolor (Philiclit Diagnostics LLC, Ukraine) was used according to the manufacturer's instructions.

Total cholesterol concentration in serum was measured using an enzymatic colorimetric method involving cholesterol esterase, cholesterol oxidase, and peroxidase. A commercial kit Cholesterol total (Philiclit Diagnostics LLC, Ukraine) was used in accordance with the manufacturer's instructions. Optical density was measured spectrophotometrically at 500-550 nm.

In vitro studies were performed on L929 cells maintained for four passages. Prior to the experiment, the culture had been cryopreserved according to the institute's protocol and stored in the low-temperature cell bank of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine. Cells were cultured in DMEM/F12 medium (Biowest, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France), 200 IU/mL benzylpenicillin (Arterium, Ukraine), and 200 µg/mL streptomycin (Arterium, Ukraine), in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. For trypsinization, 0.25% trypsin solution (Sigma, USA) in Versene solution (PAA, USA) was applied for 5 minutes and then removed with DMEM/F12 medium.

Mitotic activity of L929 fibroblasts in monolayer (7th day of cultivation) was assessed 24 and 48 hours after cold stress exposure. Cultures were fixed in 96% ethanol, incubated in 1% hematoxylin solution (Sigma-Aldrich, USA), washed in PBS, and then stained with 1% eosin (Sigma-Aldrich, USA). Mitotic activity was evaluated using an inverted microscope, counting cells with morphological signs of mitosis among 500 analyzed fibroblasts. The mitotic index (MI) was calculated as: $MI = n / N \cdot 100\%$, where n is the number of cells that entered mitosis, and N is the total number of cells.

L929 cell viability was assessed using the trypan blue exclusion method, counting unstained (live) and stained (dead) cells according to the classical protocol [8].

Statistical analysis was performed using Statistica 10 (StatSoft, USA) and Excel (Microsoft, USA). Normality of distribution was assessed using the Shapiro-Wilk W-test. Results are presented as mean ± standard deviation for normally distributed data. Differences between groups were evaluated using the Mann-Whitney test, with statistical significance set at $p < 0.05$.

Research results and their discussion.

In vivo studies present the lipid profile results, demonstrating changes in triglyceride and cholesterol concentrations in guinea pig serum under cold stress and following pharmacological intervention with dalargin.

As shown in **table 1**, chronic cold stress (CCS) led to a pronounced twofold decrease in serum triglyceride (TG) levels compared to the intact group ($p < 0.05$). This pattern may result from the active utilization of TG as an energy source to support thermogenesis and adaptive processes in response to cold, as well as from increased β -oxidation of fatty acids in metabolically active tissues [9].

Administration of the synthetic neuropeptide dalargin caused a significant increase in TG levels compared to the CCS group ($p < 0.05$), indicating its regulatory effect on lipid metabolism (**table 1**). It is likely that the synthetic neuropeptide contributes to the attenuation of excessive lipolysis.

Table 1 – Serum Triglyceride and Total Cholesterol Concentrations in Animals under Different Experimental Conditions

Groups	Parameter	
	Triglycerides (mmol/L)	Total cholesterol (mmol/L)
Intact animals	1.03±0.04	1.54±0.09
Chronic cold stress (CCS)	0.53±0.03*	1.07±0.05*
CCS + dalargin	0.72±0.02*#	1.09±0.09*

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

These results are consistent with data demonstrating the potential for pharmacological correction of cold-induced changes in lipid metabolism [10]. It was also found that CCS led to a 1.4-fold decrease in total cholesterol (TC) levels in serum compared to the intact control group ($p < 0.05$). Administration of the synthetic neuropeptide dalargin did not affect or restore TC levels. Considering the normalization of triglycerides (TG) following dalargin treatment, this discrepancy is likely due to the intrinsic characteristics of metabolic regulation: TG are rapidly mobilized and actively oxidized, allowing dalargin to promptly influence their concentration by modulating lipolysis and β -oxidation of fatty acids. In contrast, cholesterol serves structural and signaling roles in membranes and acts as a precursor for steroid hormone synthesis; its regulation is slower and more complex, requiring time for synthesis and replenishment, which explains the absence of an immediate effect after a single peptide administration [10, 11].

It is well established that cell viability is a key indicator of metabolic potential, as only morphologically intact cells are capable of maintaining membrane stability, pro-

liferation, and recovery in response to stress conditions, including cold stress or exposure to neuropeptides [12]. Therefore, at the next stage of the study, the metabolic activity of cells in 2D cultures was assessed using the following parameters: cell viability and mitotic index (table 2).

Table 2 – Viability of Monolayer Cells after Cold Stress and Treatment with Dalargin in L929 Cell Cultures

Groups	Parameters		
	Viability, %	Mitotic index, %	
		24 hours	48 hours
Intact animals	98.0±0.2	11.9±1.13	10.7±1.13
Cold stress (CS)	65.1±0.5 *	7.51±0.91*	8.2±0.13 *
CS + dalargin	89.0±4.0 #	8.31±0.42*	9.78±1.33 #

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

The research results demonstrated that cold stress in a 2D culture caused a 1.5-fold decrease in the number of viable cells, whereas the addition of dalargin to the culture medium prevented these changes, maintaining the level of viable cells at the control level (table 2).

A decrease in the mitotic index of L929 fibroblasts 24 hours after cold stress and dalargin administration (by 1.6- and 1.4-fold, respectively, compared to intact parameters) correlated with reduced cell viability, indicating a close relationship between proliferative activity and cell survival and reflecting a slowing of mitosis under cold stress conditions, which is consistent with literature data [13]. After 48 hours, the mitotic activity of cells in cultures treated with dalargin recovered to the intact level, which may be a consequence of the cytoprotective effect of the neuropeptide, ensuring the maintenance of cellular homeostasis and functional activity under cold stress [2, 3].

Thus, the experiments demonstrated that administration of the synthetic neuropeptide dalargin contributed to the normalization of serum triglyceride (TG) levels, whereas the concentration of total cholesterol (TC) remained reduced. This dynamic indicates the high specificity of dalargin's metabolic action: the peptide rapidly corrects the levels of energy lipids, particularly triglycerides, which are critical for maintaining energy metabolism during cold stress [14, 15].

The decrease in total cholesterol despite the restoration of triglycerides can be explained by the complex nature of cholesterol regulation: it performs structural and signaling functions in cell membranes, serves as a precursor of steroid hormones, and is regulated by longer-term mechanisms of synthesis and degradation, which makes its rapid recovery after a single peptide administration unlikely. In contrast, triglycerides are rapidly mobilized energy substrates, and their levels can be promptly modulated through the regulation of lipolysis

and β -oxidation of fatty acids, which is supported by the results of our experiment. Therefore, the in vivo findings highlight the potential of dalargin as a selective metabolic modulator that ensures rapid adaptation of lipid metabolism to cold stress while maintaining the stability of the organism's energy homeostasis.

In vitro studies showed that dalargin maintains the mitotic index and cell viability during cold stress, demonstrating its cytoprotective and regulatory effects on the cell cycle. This effect is likely associated with dalargin's ability to modulate signaling pathways responsible for proliferation, apoptosis, and stress responses, as well as with the support of mitochondrial energy metabolism, which is critical under cold stress conditions [16, 17].

By drawing parallels between the tendency toward normalization of triglyceride levels in vivo and the maintenance of mitotic activity in vitro, it can be concluded that dalargin exerts a protective effect at both systemic and cellular levels under cold stress conditions. Thus, the integration of in vivo and in vitro data demonstrates that dalargin acts as a selective metabolic and cytoprotective agent capable of maintaining energy and lipid balance at the organism level and ensuring proliferative and metabolic activity of cells under stress conditions.

Conclusions.

The study demonstrated that dalargin effectively modulates metabolic and cellular responses to cold stress. In vivo, it promotes a tendency toward normalization of triglyceride levels, while the reduced cholesterol does not undergo rapid changes, indicating its selective action on mobile energy substrates. In vitro, dalargin restores the mitotic index and viability of fibroblasts, reducing the negative impact of cold on cellular metabolism. Taken together, the data confirm the cytoprotective and metabolically regulatory potential of dalargin under cold stress conditions.

Prospects for further research.

Further studies should be aimed at elucidating the molecular mechanisms of dalargin action under cold stress conditions, in particular its effects on opioid receptors, calcium homeostasis, and mitochondrial signaling pathways. It is advisable to investigate dose-dependent effects, long-term adaptive changes, and possible epigenetic shifts that contribute to cellular resistance to repeated stress. A promising direction is the study of dalargin interactions with other neuropeptides and lipid mediators, as well as evaluation of its effects on different cell types and tissues. At the applied level, testing dalargin as a potential cytoprotective and metabolic modulator in cryomedicine, regenerative technologies, and hypothermic exposure conditions remains relevant.

МЕТАБОЛІЧНА СКЛАДОВА АДАПТАЦІЇ ДО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO ТА IN VITRO

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

ukrainanataliy@gmail.com

У представлений роботі проведено комплексне дослідження метаболічних і клітинних реакцій на холодний стрес у моделях *in vivo* та *in vitro*, що дозволило оцінити вплив синтетичного нейропептиду даларгіну на формування адаптаційних метаболічних і цитопротекторних відповідей. Встановлено, що введення даларгіну сприяло значущому підвищенню концентрації тригліцеридів у крові тварин, зниженого за умов хронічного холодного стресу, тоді як концентрація загального холестерину залишалася зниженою. Така динаміка свідчить про селективну дію пептиду на швидко мобілізовані енергетичні ліпіди, тоді як холестерин регулюється складними тривалими механізмами синтезу та деградації. Підкреслено, що підтримка рівня тригліцеридів критично важлива для забезпечення енергетичного гомеостазу організму в умовах холодного стресу.

In vitro встановлено, що холодний стрес знижує мітотичний індекс і життєздатність фібробластів, тоді як даларгін частково запобігає розвитку цих негативних змін.

Інтеграція даних *in vivo* та *in vitro* дозволяє зробити висновок, що даларгін виступає як селективний метаболічний та цитопротекторний агент, який забезпечує швидку адаптацію ліпідного та енергетичного обміну, підтримує клітинну активність і життєздатність у стресових умовах і сприяє стабільності гомеостазу організму. Отримані результати підкреслюють потенціал даларгіну як ефективного модулюючого чинника для підтримки метаболічної та клітинної адаптації в умовах холодного стресу.

Ключові слова: кріобіологія, холодний стрес, гіпотермія, гоміотермні тварини, метаболізм, ліпідний обмін, мітотичний індекс, життєздатність клітин, нейропептиди.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано в рамках НДР «Дослідження захисної дії синтетичних аналогів нейропептидів на організм гоміотермних тварин та ізолювані клітини, піддані холодному стресу», номер державної реєстрації № 2.2.6.136 (0121V100384).

Вступ.

Дослідження метаболічної активності клітин і тканин *in vivo* та *in vitro* є ключовими інструментами для комплексного розуміння реакцій організму на холодний стрес на різних рівнях біологічної організації. Моделі *in vivo* дозволяють оцінити інтегровану відповідь організму, включаючи взаємодію нейроендокринних, метаболічних та терморегуляторних механізмів, тоді як підходи *in vitro* забезпечують можливість деталізованого аналізу клітинних адаптацій, зокрема перебудови енергетичного обміну, мітохондріальної функції, ліпідного гомеостазу та мембранних структур [1]. Поєднання цих двох рівнів дослідження формує багаторівневу модель, що дозволяє оцінювати реакцію на холод від системного до клітинного рівня. Такий підхід є особливо актуальним у сучасних дослідженнях стрес-індукованих метаболічних змін і дозволяє визначати специфічні механізми регуляції, які залишаються непомітними у виключно *in vivo* або *in vitro* умовах. У зв'язку з ростом інтересу до нейрогуморальної регуляції метаболізму особливу увагу привертає ендогенна опіоїдна система. Як ключовий компонент антистресової відповіді, вона здатна модулювати метаболічний гомеостаз, зокрема регулювати ліпідний обмін та енергетичний баланс. У цьому контексті оцінка ролі опіоїдної системи у поєднанні *in vivo* і *in vitro* дозволяє інтегрувати системні та клітинні аспекти адаптації до холоду.

Особливу увагу у дослідженнях привертає даларгін – синтетичний аналог лей-енкефаліну, який, за літературними даними, демонструє антистресову, протекторну та метаболічно-модулюючу дію, що робить його перспективним інструментом для вивчення опіоїдної регуляції адаптаційних процесів під впливом холоду [2, 3].

Відомо, що холодний стрес (ХС) суттєво впливає на ліпідний метаболізм, оскільки саме ліпіди виступають базовими регуляторами енергетичного забезпечення та структурної стабільності клітин [1, 2, 3]. Тригліцериди (ТГ) слугують головним джерелом субстратів для β-окиснення та термогенезу, а їх мобілізація відображає інтенсивність ліполізу й загальну метаболічну активність тканин [4]. Загальний холестерин (ЗХС) є важливим компонентом біомембран, визначає їхню рідинність і стабільність у низькотемпературних умовах, а також виступає попередником для синтезу стероїдних гормонів, що регулюють стресову відповідь [5, 6].

Дослідження життєздатності та проліферативної активності клітин є ключовими для розуміння їх адаптивного потенціалу в умовах холодного стресу та дають змогу об'єктивно оцінити протекторну дію даларгіну як модулятора клітинної стійкості, мембранної цілісності й відновлювальної здатності.

Мета дослідження.

Оцінити вплив холодного стресу на ліпідний профіль *in vivo* та проліферацію і життєздатність клітин *in vitro* та визначити протекторну роль опіоїдних пептидів.

Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження *in vivo* 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 холодового 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; До експерименту було залучено 36 тварин, розподілених на чотири групи по 12 тварин у кожній.

Моделювання ХХС здійснювали за методикою [7], 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 протягом 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 тригліцеридів у сироватці крові визначали ферментативним колориметричним методом, що включає послідовну дію ліпази, гліцеролкінази, гліцерол-3-фосфатоксидази та пероксидази, з утворенням фарбового комплексу. Використовували комерційний набір «Triglycerides liquicolor», виробник: ТОВ «Філісіт-Діагностика», Україна, відповідно до інструкції виробника.

Концентрацію загального холестерину в сироватці визначали за допомогою ферментативного колориметричного методу, що включає послідовну дію холестеринестерази, холестериноксидази та пероксидази. Використовували комерційний набір «Cholesterol total», виробник: ТОВ «Філісіт-Діагностика», Україна, згідно з інструкцією виробника. Оптичну щільність розчинів вимірювали спектрофотометрично при 500-550 нм.

Дослідження in vitro виконані на клітинах лінії L929, підтриманої протягом 4 пасажів. До цього культура була кріоконсервована згідно з протоколом та зберігалася у низькотемпературному банку Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. Клітинну лінію підтримували з використанням живильного середовища DMEM/F12 («Biowest», Франція), доповненого 10% фетальною телячою сироваткою («Biowest», Франція), 200 Од/мл бензилпенициліном («Arterium», Україна) та 200 мкг/мл стрептоміцином («Arterium», Україна), у зволоженому інкубаторі з 5% CO₂ при 37°C. Для трипсинізації використовували 0,25% розчин трипсину («Sigma», США) у розчині Версену («РАА», США), витримували 5 хвилин та відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12.

Оцінка мітотичної активності фібробластів L929 у складі моношару (7-ї доби культивування): через 24 та 48 годин після дії холодового стресу клітинні куль-

тури фіксували у 96% етанолі, після чого інкубували у 1% розчині гематоксиліну (Sigma-Aldrich, США) з подальшим промиванням у PBS. Завершальним етапом здійснювали фарбування клітин 1% розчином еозину (Sigma-Aldrich, США). Мітотичну активність клітин оцінювали за допомогою інвертованого мікроскопу. Підраховували кількість клітин з морфологічними ознаками мітозу серед 500 проаналізованих фібробластів. Мітотичний індекс (MI) визначали за формулою $MI = n / N \cdot 100\%$, де n – число клітин, що вступили у мітоз, N – загальна кількість клітин.

Життєздатність фібробластів L929 визначали методом ексклюзії трипанового синього, який полягає у підрахунку незабарвлених (живих) та забарвлених (мертвих) клітин згідно з класичним протоколом [8].

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.

У дослідженнях in vivo представлено результати ліпідного профіля, які демонструють зміни концентрації тригліцеридів і холестерину – у сироватці крові морських свинок за умов холодового стресу та під впливом фармакологічної корекції даларгину.

З представлених у **таблиці 1** результатів видно, що ХХС призводив до вираженого зниження у 2 рази концентрації тригліцеридів (ТГ) у сироватці порівняно з інтактною групою ($p < 0,05$). Така динаміка може бути наслідком активного використання ТГ як джерела енергії для підтримки термогенезу та адаптаційних процесів у відповідь на холод, а також підвищену інтенсивність β-окиснення жирних кислот у метаболічно активних тканинах [9].

Введення синтетичного нейропептиду даларгину призводило до значущого ($p < 0,05$) збільшення вмісту ТГ порівняно з групою ХХС, що свідчить про його регуляторну дію на ліпідний метаболізм (**табл. 1**). Ймовірно, синтетичний нейропептид сприяє зменшенню надмірного ліполізу.

Таблиця 1 – Концентрація тригліцеридів та загального холестерину в сироватці крові тварин за різних умов експерименту

Групи	Показник	
	Тригліцериди, (ммоль/л)	Холестерин загальний, (моль/л)
Інтактні тварини	1,03±0,04	1,54±0,09
Хронічний холодовий стрес (ХХС)	0,53±0,03*	1,07±0,05*
ХХС+даларгін	0,72±0,02*#	1,09±0,09*

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

Ці результати узгоджуються з даними, що показують можливість фармакологічної корекції холодоіндукованих змін у ліпідному обміні [10]. Також було встановлено, що ХХС призводив до зниження вмісту

загального холестерину (ЗХС) у сироватці на 1,4 раза порівняно з інтактною контрольною групою ($p < 0,05$). Введення синтетичного нейропептиду даларгіну не впливало і не призвело до відновлення рівня ЗХС. Враховуючи дані щодо нормалізації тригліцеридів (ТГ) після введення даларгіну, така відмінність, ймовірно, зумовлена внутрішньою специфікою метаболічної регуляції: ТГ швидко мобілізуються та активно окиснюються, що дозволяє даларгіну оперативно впливати на їх концентрацію через модифікацію ліполізу та β -окиснення жирних кислот. У протилежність цьому, холестерин виконує структурні та сигнальні функції у мембранах, а також слугує попередником для синтезу стероїдних гормонів; його регуляція відбувається повільніше та складніше, потребуючи часу для синтезу й відновлення запасів, що пояснює відсутність швидкого ефекту після одноразового введення пептиду [10, 11].

Відомо, що життєздатність клітин виступає ключовим показником їхнього метаболічного потенціалу, адже лише морфологічно цілісні клітини здатні підтримувати стабільність мембран, здійснювати проліферацію та відновлення у відповідь на стресові умови, зокрема холодний стрес або вплив нейропептидів [12]. Тому на наступному етапі роботи була досліджена метаболічна активність клітин у складі 2D культур за наступними показниками: життєздатності і мітотичного індексу клітин (табл. 2).

Результати досліджень продемонстрували, що холодний стрес у 2D-культурі спричиняв зменшення кількості життєздатних клітин у 1,5 раза, тоді як введення даларгіну до культурального середовища запобігало цим змінам, підтримуючи рівень життєздатних клітин на рівні контролю (табл. 2).

Таблиця 2 – Життєздатність клітин моношару після холодного стресу та додавання у культуральне середовище клітин L 929 даларгіну

Групи	Показники		
	Життєздатність, %	Мітотичний індекс, %	
		24 год	48 год
Інтактні тварини	98,0 $\pm$ 0,2	11,9 $\pm$ 1,13	10,7 $\pm$ 1,13
Холодовий стрес (ХС)	65,1 $\pm$ 0,5 *	7,51 $\pm$ 0,91*	8,2 $\pm$ 0,13 *
ХС+даларгін	89,0 $\pm$ 4,0 #	8,31 $\pm$ 0,42*	9,78 $\pm$ 1,33 #

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

Зменшення мітотичного індексу фібробластів L929 через 24 години після холодного стресу та додавання даларгіну (у 1,6 і 1,4 раза відповідно порівняно з інтактними показниками) корелювало зі зниженням життєздатності клітин, що вказує на тісний взаємозв'язок між проліферативною активністю та клітинною виживаністю і свідчить про уповільнення мітозу за умов холодного стресу, що узгоджується з даними літератури [13]. Через 48 годин мітотична активність клітин у культурі з додаванням даларгіну відновлювалась до рівня інтакту, що може бути наслідком цитопротекторної дії нейропептиду, який забезпечує підтримку клітинного гомеостазу та функціональної активності в умовах холодного стресу [2, 3].

Таким чином, у проведених експериментах доведено, що введення синтетичного нейропептиду даларгіну сприяло нормалізації рівня тригліцеридів (ТГ) у сироватці, тоді як концентрація загального холестерину (ЗХС) залишалася зниженою. Така динаміка свідчить про високу специфічність метаболічного впливу даларгіну: пептид оперативно коригує рівень енергетичних ліпідів, зокрема ТГ, що є критично важливим для підтримки енергетичного обміну під час холодного стресу [14, 15].

Зниження ЗХС, незважаючи на відновлення ТГ, можна пояснити комплексною природою регуляції холестерину: він виконує структурні та сигнальні функції у мембранах, є попередником стероїдних гормонів і регулюється тривалішими механізмами синтезу та деградації, що робить його швидке відновлення після одноразового введення пептиду малоймовірним. У той же час ТГ є швидко мобілізованими енергетичними субстратами, і їх рівень може оперативно коригуватися шляхом регуляції ліполізу та β -окиснення жирних кислот, що й підтверджується результатами нашого дослідження. Тобто, отримані дані в дослідженнях *in vivo* підкреслюють потенціал даларгіну як селективного метаболічного модулятора, який забезпечує швидку адаптацію ліпідного обміну до холодного стресу, одночасно підтримуючи стабільність енергетичного гомеостазу організму.

In vitro дослідження показали, що даларгін підтримує мітотичний індекс і життєздатність клітин під час холодного стресу, демонструючи його цитопротекторну та регуляторну дію на клітинний цикл. Такий ефект, ймовірно, пов'язаний із здатністю даларгіна до модуляції сигнальних шляхів, що відповідають за проліферацію, апоптоз і стресову відповідь, а також підтримкою енергетичного метаболізму мітохондрій, що критично важливо при холодному стресі [16, 17].

Проводячи паралелі між тенденцією до нормалізації рівня тригліцеридів *in vivo* та збереженням мітотичної активності *in vitro*, можна дійти висновку, що даларгін чинить протекторну дію як на системному, так і на клітинному рівнях за умов холодного стресу. Таким чином, інтеграція даних *in vivo* і *in vitro* демонструє, що даларгін виступає як селективний метаболічний та цитопротекторний агент, здатний підтримувати енергетичний та ліпідний баланс на рівні організму і забезпечувати проліферативну та метаболічну активність клітин у стресових умовах.

Висновки.

Дослідження показало, що даларгін ефективно модулює метаболічні та клітинні реакції на холодний стрес. У *in vivo* умовах він сприяє тенденції до нормалізації рівня тригліцеридів, при цьому знижений холестерин не зазнає швидких змін, що свідчить про його вибірккову дію на мобільні енергетичні субстрати. *In vitro* даларгін відновлює мітотичний індекс і життєздатність фібробластів, зменшуючи негативний вплив холоду на метаболізм клітин. Сукупність даних підтверджує цитопротекторний та метаболічно регуляторний потенціал даларгіну в умовах холодного стресу.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження мають бути спрямовані на з'ясування молекулярних механізмів дії даларгіну в умовах холодного стресу, зокрема його впливу на опіоїдні рецептори, кальцієвий гомеостаз та мітохон-

дріальні сигнальні шляхи. Доцільним є вивчення дози-залежних ефектів, тривалих адаптаційних змін та можливих епігенетичних зрушень, що формують стійкість клітин до повторного стресу. Перспективним напрямом є дослідження взаємодії даларгіну з іншими нейропептидами та ліпідними медіаторами,

а також оцінка його впливу на різні типи клітин і тканин. На прикладному рівні актуальним є тестування даларгіну як потенційного цитопротекторного та метаболічного модулятора у кріомедицині, регенеративних технологіях та умовах гіпотермічних впливів.

References / Література

1. Min H, Yang YY, Yang Y. Cold induces brain region-selective cell activity-dependent lipid metabolism. *Elife*. 2025;13:RP98353. DOI: [10.7554/eLife.98353](https://doi.org/10.7554/eLife.98353).
2. Gulevskyy OK, Moisieieva NM, Gorina OL. Influence leu-enkefalinu (dalarhinu) na rozvytok apoptozu i nekrozu leykotsytiv pislya kholodovoho stresu. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022;32(1):14-23. DOI: [10.15407/cryo32.01.014](https://doi.org/10.15407/cryo32.01.014). [in Ukrainian].
3. Gulevskyy OK, Moisieieva NM, Gorina OL. 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):343-350.
4. Poursharifi P, Madiraju SRM, Oppong A, Kajimura S, Nolan CJ, Blondin DP, et al. Glycerolipid Cycling in Thermogenesis, Energy Homeostasis and Signaling. *Physiological Reviews*. 2025; 105(4):2449-2499. DOI: [10.1152/physrev.00024.2024](https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2024).
5. Doole FT, Kumarage T, Ashkar R, Brown MF. Cholesterol stiffening of lipid membranes. *J Membr Biol*. 2022;255(4-5):385-405. DOI: [10.1007/s00232-022-00263-9](https://doi.org/10.1007/s00232-022-00263-9).
6. Khodadadi E, Khodadadi E, Chaturvedi P, Moradi M. Comprehensive insights into the cholesterol-mediated modulation of membrane function through molecular dynamics simulations. *Membranes (Basel)*. 2025;15(6):173. DOI: [10.3390/membranes15060173](https://doi.org/10.3390/membranes15060173).
7. 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):371-377.
8. Li PT, Lee YC, Elangovan N, Chu ST. Mouse 24p3 protein has an effect on L929 cell viability. *Int J Biol Sci*. 2007;3(2):100-107. DOI: [10.7150/ijbs.3.100](https://doi.org/10.7150/ijbs.3.100).
9. James I, Jain R, Wade G, Stevenson PC, Koulman A, Simcox J, et al. Systemic analysis shows that cold exposure modulates triglyceride accumulation and phospholipid distribution in mice. *PLoS One*. 2024;19(11):e0313205. DOI: [10.1371/journal.pone.0313205](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313205).
10. Chen W, Xu Z, You W, Zhou Y, Wang L, Huang Y, et al. Cold exposure alters lipid metabolism of skeletal muscle through HIF-1 α -induced mitophagy. *BMC Biol*. 2023;21:27. DOI: [10.1186/s12915-023-01514-4](https://doi.org/10.1186/s12915-023-01514-4).
11. Straat ME, Jurado-Fasoli L, Ying Z, Nahon KJ, Janssen LGM, Boon MR, et al. Cold exposure induces dynamic changes in circulating triacylglycerol species, dependent on intracellular lipolysis: A randomized cross-over trial. *EBioMedicine*. 2022;86:104349. DOI: [10.1016/j.ebiom.2022.104349](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104349).
12. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):12347-12360. DOI: [10.3390/s120912347](https://doi.org/10.3390/s120912347).
13. Rieder CL, Cole RW. Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell Cycle*. 2002;1(3):169-175. DOI: [10.4161/cc.1.3.118](https://doi.org/10.4161/cc.1.3.118).
14. Zachary I, Woll PJ, Rozengurt E. A role for neuropeptides in the control of cell proliferation. *Dev Biol*. 1987;124(2):295-308. DOI: [10.1016/0012-1606\(87\)90483-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90483-0).
15. Li H, Wu L, Li YQ. Opioid peptides modulate the response of neurons of the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn to GABA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(3):730-736. DOI: [10.1016/S0006-291X\(03\)01249-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01249-X).
16. Moisieieva N, Gorina O, Akhatova Y. Effect of dalargin on apoptosis of L929 fibroblasts during cold stress. *CryoLetters*. 2023;44(6):352-359.
17. Moisieieva NN, Moisieiev AI, Gorina OL, Akhatova YuS. Expediency of using a physical and mathematical model in cell engineering. *IFMBE Proc*. 2023;89:87-93.

МЕТАБОЛІЧНА СКЛАДОВА АДАПТАЦІЇ ДО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ IN VIVO ТА IN VITRO

Мирний В. Г., Моїсєєва Н. М.

Резюме. Метою було визначити протекторний потенціал синтетичного нейропептиду даларгіну як метаболічного та цитопротекторного модулюючого засобу та проаналізувати його вплив на різні рівні біологічної організації – організмів (in vivo) і клітинний (in vitro) – за умов холодового стресу. У тварин визначали рівні тригліцеридів і холестерину після холоду та введення даларгіну. У культурі фібробластів L929 оцінювали мітотичний індекс і життєздатність клітин під дією холодового стресу та даларгіну, використовуючи стандартні цитологічні методи.

Введення даларгіну призводило до значущого ($p < 0,05$) підвищення рівня тригліцеридів у тварин, які зазнали холодового стресу, при цьому не впливало на рівень загального холестерину, який був знижений під дією хронічного холодового стресу. У культурі фібробластів L929 даларгін сприяв стабілізації мітотичного індексу та підтримував високий рівень життєздатності клітин, зменшуючи порушення метаболічного потенціалу, індукованого холодом. Отримані дані свідчать про вибірккову метаболічну і цитопротекторну дію даларгіну та його здатність коригувати порушення ліпідного обміну і клітинної активності під час холодового стресу.

Синтетичний нейропептид даларгін проявляє виражений регуляторний ефект на ліпідний обмін і клітинну функцію, стабілізуючи життєздатність клітин при холодовому стресі. Результати підтверджують його перспективність як ефективного біомодулятора адаптаційних процесів у організмі, що може мати практичне значення для фармакологічної корекції негативних наслідків екстремальних температур.

Ключові слова: кріобіологія, холодовий стрес, гіпотермія, гоміотермні тварини, метаболізм, ліпідний обмін, мітотичний індекс, життєздатність клітин, нейропептиди.

METABOLIC COMPONENT OF COLD STRESS ADAPTATION IN IN VIVO AND IN VITRO EXPERIMENTS

Myrnyi V. H., Moisieieva N. M.

Abstract. The aim was to determine the protective potential of the synthetic neuropeptide dalargin as a metabolic and cytoprotective modulating agent and to analyze its effects at different levels of biological organization – organismal (in vivo) and cellular (in vitro) – under conditions of cold stress. In animals, triglyceride and cholesterol levels were measured after exposure to cold and administration of dalargin. In L929 fibroblast cultures, the mitotic index and cell viability were assessed under cold stress and dalargin exposure using standard cytological methods.

Administration of dalargin resulted in a significant ($p < 0.05$) increase in triglyceride levels in animals subjected to cold stress, while it had no effect on total cholesterol, which was reduced under chronic cold stress. In L929 fibroblast cultures, dalargin promoted stabilization of the mitotic index and maintained high cell viability, reducing cold-induced disturbances of metabolic potential. The obtained data indicate a selective metabolic and cytoprotective effect of dalargin and its ability to correct disturbances in lipid metabolism and cellular activity during cold stress.

The synthetic neuropeptide dalargin exhibits a pronounced regulatory effect on lipid metabolism and cellular function, stabilizing cell viability under cold stress. These results confirm its promise as an effective biomodulator of adaptive processes, with potential practical value for the pharmacological correction of the negative effects of extreme temperatures.

Key words: cryobiology, cold stress, hypothermia, homeothermic animals, metabolism, lipid metabolism, mitotic index, cell viability, neuropeptides.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

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

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

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 / Моїсєєва 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

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 24.07.2025 / Стаття надійшла 24.07.2025 року

Accepted 12.11.2025 / Стаття прийнята до друку 12.11.2025 року