



Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышей *db/db*

В. А. Приходько^{1,2}✉, Т. М. Матузок^{1,2}, А. Ю. Гришина¹, В. Е. Ковансков¹,
Ю. И. Сысоев^{3,4,5}, М. В. Титова⁶, Е. В. Попова⁶, А. М. Носов^{6,7},
Д. Ю. Ивкин¹, С. В. Оковитый^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева Российской академии наук» (ИМЧ РАН). 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, литера А

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Институт трансляционной биомедицины (ФГБОУ ВО СПбГУ, ИТБ). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

⁴ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус» (АНОО ВО «Университет «Сириус»). 354349, Россия, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский проспект, д. 1

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук» (ИФ РАН). 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук» (ИФР РАН). 127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

⁷ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ Контактное лицо: Приходько Вероника Александровна. E-mail: veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: В. А. Приходько – <https://orcid.org/orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

Т. М. Матузок – <https://orcid.org/0000-0002-0269-6078>;

А. Ю. Гришина – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;

В. Е. Ковансков – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>;

Ю. И. Сысоев – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>;

М. В. Титова – <https://orcid.org/0000-0002-4571-3712>;

Е. В. Попова – <https://orcid.org/0000-0002-4655-6974>;

А. М. Носов – <https://orcid.org/0000-0003-0297-9075>;

Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

С. В. Оковитый – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Статья поступила: 11.11.2024

Статья принята в печать: 24.12.2024

Статья опубликована: 26.12.2024

Резюме

Введение. Сахарный диабет II типа (СД-II) представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся инсулинорезистентностью, нарушенной толерантностью к глюкозе и гипергликемией. СД-II является доказанным фактором риска развития как периферических нейропатий, так и нарушений мышечной сократимости и функции. Производное бигуанида метформин, экспериментальное соединение малобен и препараты различных видов женьшеня (*Rapax spp.*) обладают значительным потенциалом для лечения СД-II и его скелетно-мышечных осложнений. В качестве теста для оценки мышечной сократимости и эффективности ее восстановления Gregory et al. был предложен протокол электростимуляционного утомления (ЭСУ), включающий измерение силы хвата перекладины после утомления двуглавой мышцы плеча высокочастотной электростимуляцией с помощью имплантированных электродов.

© Приходько В. А., Матузок Т. М., Гришина А. Ю., Ковансков В. Е., Сысоев Ю. И., Титова М. В., Попова Е. В., Носов А. М., Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В., 2025

© Prihodko V. A., Matuzok T. M., Grishina A. Yu., Kovanskov V. E., Sysoev Yu. I., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V., 2025

Цель. В настоящей работе нами была проведена оценка применимости модификации данного протокола для оценки миотропных эффектов метформина, малобена и экстрактов суспензионных культур клеток женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* С.А. Мей. (ЖОЭ), ж. вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. (ЖВЭ) и ж. японского *P. japonicus* (Т. Неез) С.А. Мей. (ЖЯЭ) у лептинрезистентных мышей *db/db*, являющихся одной из наиболее популярных современных моделей СД-II.

Материалы и методы. Эксперименты были выполнены на 60 молодых взрослых (2 мес.) мышах-самцах линии C57Bl/Ks-*db*/+m* (*db/db*) массой 45–50 г, рандомизированных на 6 групп: 1) контроль ($n = 10$; 0,9 % физиологический раствор); 2) ЖОЭ ($n = 10$; 50 мг/кг); 3) ЖВЭ ($n = 10$; 50 мг/кг); 4) ЖЯЭ ($n = 10$; 50 мг/кг); 5) малобен ($n = 10$; 60 мг/кг); 6) метформин ($n = 10$; 300 мг/кг). Все препараты вводили внутривенно с помощью зонда 1 р/д в течение 2 мес. По окончании периода лечения измеряли силу хвата (г) передними и всеми четырьмя конечностями с помощью аппарата Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия). Методом стимуляционной электронейромиографии анализировали амплитуду М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами, а также регистрировали изменение амплитуды М-ответов в течение 5 мин после проведения ЭСУ.

Результаты и обсуждение. По окончании периода лечения не наблюдали значимых межгрупповых различий в силе хвата и амплитуде М-ответов икроножной мышцы при ее стимуляции одиночными стимулами. Контролируемое ЭСУ мышцы приводило к снижению амплитуды ее М-ответа на 18,83–35,23 % от исходного уровня ($p < 0,01$ для всех групп), причем выраженность этого снижения была значимо меньше в группах ЖВЭ, ЖЯЭ и малобена по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Восстановительный период (5 мин) после ЭСУ характеризовался увеличением амплитуды М-ответа на 10,18–14,79 %, имевшим статистическую значимость во всех группах, кроме ЖОЭ ($p < 0,01$ в группах контроля, ЖВЭ и ЖЯЭ; $p < 0,05$ в группах малобена и метформина). Значимые отличия от контроля по результатам восстановительного периода в опытных группах не наблюдались.

Заключение. Предлагаемый протокол ЭСУ представляет собой функциональную пробу, позволяющую оценить эффективность восстановления электрической активности скелетной мышцы после ее контролируемого утомления. Применение описываемого протокола позволило выявить положительное влияние ЖВЭ, ЖЯЭ и малобена, но не ЖОЭ и метформина на краткосрочное восстановление сократимости икроножной мышцы после тетанизации у диабетических мышей *db/db*. Проба с ЭСУ чувствительна к миотропным эффектам препаратов метаболического действия, сравнительно малоинвазивна и подходит для использования в хроническом эксперименте.

Ключевые слова: электростимуляционное утомление, электронейромиография, сократимость мышц, миотропные препараты, сахарный диабет II типа, ожирение, мыши *db/db*, культуры клеток растений

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. А. Приходько, С. В. Оковитый – идея и планирование эксперимента. М. В. Титова, Е. В. Попова, А. М. Носов – выращивание культур клеток и подготовка биомассы. В. А. Приходько, Т. М. Матузок, А. Ю. Гришина, В. Е. Ковансков – проведение экспериментов и обработка данных. В. А. Приходько – подготовка иллюстраций. В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, Д. Ю. Ивкин, С. В. Оковитый – подготовка и редакция рукописи.

Финансирование. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения №075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках госпрограммы ГП-47 «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030) (тема № 0113-2019-0006) и проекта № 95445054 Санкт-Петербургского государственного университета. Культуры клеток были получены и поддерживались с использованием оборудования УНУ «Всероссийская коллекция культур клеток высших растений» при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 122042700045-3. Выращивание культур клеток в биореакторах и получение биомассы проводили с использованием оборудования УНУ «Опытный биотехнологический комплекс ИФР РАН» при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 122042600086-7.

Для цитирования: Приходько В. А., Матузок Т. М., Гришина А. Ю., Ковансков В. Е., Сысоев Ю. И., Титова М. В., Попова Е. В., Носов А. М., Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В. Применение метода электростимуляционного утомления для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия у мышей *db/db*. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2025;14(1):332–348. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997>

Use of an electrical stimulation-induced fatigue protocol to evaluate the myotropic effects of metabolic-active agents in *db/db* mice

Veronika A. Prikhodko^{1,2}✉, Tatyana M. Matuzok^{1,2}, Anna Yu. Grishina¹,
Vladislav E. Kovanskov¹, Yuriy I. Sysoev^{3,4,5}, Maria V. Titova⁶, Elena V. Popova⁶,
Aleksandr M. Nosov^{6,7}, Dmitry Yu. Ivkin¹, Sergey V. Okovityi^{1,2}

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² N. P. Bechtereva Institute of the Human Brain, RAS. 12A, Akademika Pavlova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

³ St Petersburg University. Institute of Translational Biomedicine. 7–9, Universitetskaya emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia

⁴ Sirius University of Science and Technology. 1, Olimpiyskiy Prospekt, federal territory "Sirius", Krasnodar region, 354349, Russia

⁵ I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. 6, Makarova emb., Saint-Petersburg, 199034, Russia

⁶ K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS. 35, Botanicheskaya str., Moscow, 127276, Russia

⁷ Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Veronika A. Prihodko. **E-mail:** veronika.prihodko@pharminnotech.com

ORCID: Veronika A. Prihodko – <https://orcid.org/0000-0002-4690-1811>;

Tatyana M. Matuzok – <https://orcid.org/0000-0002-0269-6078>;

Anna Yu. Grishina – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>;

Vladislav E. Kovanskov – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>;

Yuriy I. Sysoev – <https://orcid.org/0000-0003-4199-5318>;

Maria V. Titova – <https://orcid.org/0000-0002-4571-3712>;

Elena V. Popova – <https://orcid.org/0000-0002-4655-6974>;

Aleksandr M. Nosov – <https://orcid.org/0000-0003-0297-9075>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>;

Sergey V. Okovityi – <https://orcid.org/0000-0003-4294-5531>.

Received: 11.11.2024

Accepted: 24.12.2024

Published: 26.12.2024

Abstract

Introduction. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic condition characterized by insulin resistance, impaired glucose tolerance, and hyperglycaemia. T2DM is a proven risk factor for peripheral neuropathies as well as muscle contractility and function impairments. The biguanide metformine, experimental compound maloben, and preparations of various *Panax* species have a considerable potential for the treatment of T2DM and its skeletal muscle complications. As a test to evaluate muscle contractility and the effectiveness of its recovery, Gregory et al. have developed a protocol of electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) which includes measuring grip strength after fatiguing the *biceps brachii* muscle with high-frequency electrical stimulation using implantable electrodes.

Aim. In this work, we attempted to assess the applicability of a modification of said protocol in order to evaluate the myotropic effects of metformin, maloben, and extracts from suspension cell cultures of *Panax ginseng* C.A. Mey. (PGE), *P. vietnamensis* Ha & Grushv. (PVE), and *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey. (PJE) in the leptin-resistant *db/db* mice, one of the most popular modern T2DM models.

Materials and methods. The experiments were carried out in 60 young adult (2 months old) male C57Bl/Ks-*db*^{+/m} (*db/db*) mice weighing 45–50 g, randomized into 6 groups: 1) Control (*n* = 10; 0.9 % saline); 2) PGE (*n* = 10; 50 mg/kg); 3) PVE (*n* = 10; 50 mg/kg); 4) PJE (*n* = 10; 50 mg/kg); 5) maloben (*n* = 10; 60 mg/kg); 6) metformin (*n* = 10; 300 mg/kg). All drugs were administered via oral gavage using a feeding tube once daily for 2 months. Following the treatment period, forelimb and all-four limb grip strength (g) was assessed using the Grip Strength Meter (TSE Systems, Germany). Using stimulation electroneuromyography, we measured the compound muscle action potential (CMAP) amplitudes in the gastrocnemius induced by single-stimulus sciatic nerve stimulation, and assessed the dynamics of CMAP amplitudes during the first 5 min following the ESIF protocol completion.

Results and discussion. Following treatment period completion, no significant changes were observed between the groups in grip strength or gastrocnemius CMAP amplitude under single-stimulus stimulation. Controlled ESIF of the muscle caused a 18.83–35.23 % (relative to baseline) decrease in CMAP amplitudes (*p* < 0.01 for all groups) that was significantly smaller in the PVE, PJE, and maloben groups vs. control (*p* < 0.05). The post-ESIF recovery period was associated with a 10.18–14.79 % increase in CMAP amplitudes that was significant in all groups except PGE (*p* < 0.01 for control, PVE, and PJE; *p* < 0.05 for maloben and metformin). No significant differences from control were observed in any of the treatment groups regarding net recovery.

Conclusion. The proposed protocol represents a functional test suitable to assess the recovery effectiveness of electrical activity of a skeletal muscle following its controlled fatigue. Using the described protocol, we were able to detect beneficial effects of PVE, PJE, and maloben (but not PGE or metformin) on the recovery of gastrocnemius contractility following tetanization in diabetic *db/db* mice. The ESIF test is sensitive to the myotropic effects of metabolic agents, minimally invasive, and acceptable under chronic experiment conditions.

Keywords: electrical stimulation-induced fatigue, electroneuromyography, muscle contractility, myotropic agents, type II diabetes mellitus, obesity, *db/db* mice, plant cell cultures

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Veronika A. Prihodko, Sergey V. Okovityi – experiment design and planning. Maria V. Titova, Elena V. Popova, Aleksandr M. Nosov – cell culturing and biomass preparation. Veronika A. Prihodko, Tatyana M. Matuzok, Anna Yu. Grishina, Vladislav E. Kovanskov – experiment conduction and data analysis. Veronika A. Prihodko – visualization. Veronika A. Prihodko, Yuriy I. Sysoev, Dmitry Yu. Ivkin, Sergey V. Okovityi – manuscript writing and review.

Funding. The results of this work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of the Saint-Petersburg Chemical Pharmaceutical University" (agreement No. 075-15-2021-685) with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (MSHE RF), as part of State Program SP-47 "Scientific and

Technological Development of the Russian Federation" (2019–2030) (project 0113-2019-0006), and Project 95445054 of the Saint Petersburg State University. Cell cultures were obtained and maintained using the equipment of the the large-scale research facility "All-Russian Collection of Cell Cultures of Higher Plants" of the IPPRAS (ARCCC HP IPPRAS) and supported by the State Project 122042700045-3 of the MSHE RF. Bioreactor cultivation of plant cell suspensions and biomass production were carried out using the equipment of the large-scale research facility "Experimental Biotechnological Facility" of the IPPRAS (EBF IPPRAS) and supported by the State Project 122042600086-7 of the MSHE RF.

For citation: Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Grishina A. Yu., Kovanskov V. E., Sysoev Yu. I., Titova M. V., Popova E. V., Nosov A. M., Ivkin D. Yu., Okovityi S. V. Use of an electrical stimulation-induced fatigue protocol to evaluate the myotropic effects of metabolic-active agents in *db/db* mice. *Drug development & registration*. 2025;14(1):332–348. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1997>

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет II типа (СД-II) представляет собой хроническое эндокринологическое заболевание с чрезвычайно высокой медико-социальной значимостью. Согласно критериям, установленным рекомендациями Российской ассоциации эндокринологов (2022), диагноз СД-II подразумевает наличие повышенного уровня гликированного гемоглобина и/или нарушенной гликемии натощак, отражающее неадекватную регуляцию углеводного обмена организма инсулином. По последним данным, общемировая и российская распространенность СД-II находится на уровне 3,3–6,3 % населения и характеризуется неуклонным ростом [1–3].

В число состояний и заболеваний, имеющих подтвержденную патогенетическую взаимосвязь с СД-II, входит саркопения, характеризующаяся потерей мышечной массы и снижением мышечной функции, ведущими к снижению качества жизни, инвалидизации и повышенной смертности. Считается, что основными факторами развития саркопии у больных СД-II являются инсулинорезистентность и гиперинсулинемия, миостеатоз, хроническое системное воспаление и оксидативный стресс, а также накопление токсичных конечных продуктов гликирования [4].

Мыши C57Bl/Ks-*db*^{+/+}*m* (*db/db*) являются одной из наиболее распространенных генетически детерминированных *in-vivo*-моделей СД-II. Вследствие гомозиготности по миссенс-мутантному гену рецептора лептина эти мыши нечувствительны к эффектам лептина во всех тканях и органах. Начиная со второй недели жизни мыши *db/db* демонстрируют гиперфагию, гиперинсулинемию и гипергликемию с последующим формированием морбидного ожирения, тяжелого СД-II и сопутствующих органных поражений [5].

Известно, что мыши *db/db* предрасположены к развитию диабетической полинейропатии и патологии скелетных мышц. Согласно данным исследований,

для мышей этой линии характерны аксонально-демиелинизирующее поражение периферических нервов, ультраструктурные изменения нейромышечного синапса [6, 7], а также дисрегуляция нейрональных и сарколеммальных ионных токов [8–10], приводящие к нарушению процессов сокращения и релаксации скелетных мышц [11]. С молодого возраста мыши *db/db* подвержены замедленной регенерации мышечных волокон [12] и патологически повышенному протеолизу [13], что приводит к развитию мышечной атрофии со снижением моторных функций [14, 15]. Считается, что скелетно-мышечные осложнения, выявляемые у мышей *db/db*, с высокой точностью воспроизводят нарушения, наблюдаемые в клинической практике у пациентов с СД-II [16].

Для оценки функции нейромоторного аппарата может быть использован метод стимуляционной электромиографии (ЭНМГ), основанный на регистрации биоэлектрической активности скелетных мышц в ответ на электрическую стимуляцию нервов [17]. Различные разновидности метода ЭНМГ (поверхностная, игольчатая) обладают высокой чувствительностью в отношении диагностики и количественной оценки саркопии у мелких лабораторных животных, включая *Danio rerio* [18], мышей [19] и крыс [20]. Ранее с помощью стимуляционной игольчатой ЭНМГ были описаны фоновые нарушения нейромышечной передачи у мышей *db/db*, включавшие снижение максимальных амплитуд, увеличение латентности и длительности М-ответов скелетных мышц на электростимуляцию нервов [21].

В качестве дополнительного теста для оценки мышечной силы и эффективности ее восстановления Gregory et al. был предложен протокол электростимуляционного утомления (ЭСУ), включающий измерение силы хвата перекладины после утомления двуглавой мышцы плеча высокочастотной электростимуляцией с помощью имплантированных электродов [22]. Данный тест был впоследствии успешно применен для изучения молекулярных механизмов

ноцицепции [23], антиноцицептивных свойств тестостерона [24] и оценки миотропной активности новых производных хромон-3-альдегида [25]. Ввиду того, что тест ЭСУ представляется весьма перспективным для анализа миотропных эффектов фармакологических агентов различных групп, в настоящей работе нами была предпринята попытка модификации способа его использования с целью упрощения и уменьшения инвазивности процедуры. Кроме этого, предлагаемая модификация теста направлена на минимизацию влияния дополнительных факторов, с наличием которых ассоциирована оценка силы хвата конечностями у животных [26].

Несмотря на распространенность скелетно-мышечных и нейрональных нарушений среди больных СД-II, возможности их фармакологической коррекции изучены недостаточно. Потенциалом для терапии указанных нарушений могут обладать как препараты с прямой гипогликемизирующей активностью, так и средства с более широким спектром метаболического действия. До настоящего времени оценка наличия у подобных препаратов миотропных эффектов электрофизиологическими методами не проводилась или проводилась очень ограниченно.

Метформин – производное бигуанида, на сегодняшний день являющееся препаратом выбора для терапии СД-II благодаря своей выраженной гипогликемизирующей и инсулинсенситизирующей активности, наличию плейотропных эффектов и хорошему профилю безопасности [27]. В пилотном эксперименте [28], а также в клиническом исследовании ($n = 20$) [29] метформин продемонстрировал потенциальную эффективность при саркопении. Малобен (4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия) – экспериментальное соединение, показавшее в доклинических исследованиях наличие гипогликемической [30], антистеатозной, антиапоптотической и регенераторной активности у мышей с СД-II [31].

Женьшень (*Panax*) – род многолетних травянистых растений семейства аралиевых, включающий 12 видов, произрастающих в Азии и Северной Америке. Практически все виды рода *Panax* проявляют широкий спектр биологической активности, включая адаптогенную, антиоксидантную, вазодилатирующую и антиишемическую активность, благодаря чему их использование при метаболических и кардиоваскулярных заболеваниях считается перспективным [33]. Культуры клеток различных видов женьшеня, выращиваемые биотехнологическим способом в стерильных контролируемых условиях, являются перспективным лекарственным сырьем, обладающим рядом преимуществ перед выращенными на плантациях или собранными в природе растениями: отсутствием контаминантов (бактерий, грибов), стабильностью роста и биохимического состава вне зависимости от региона и сезонности, наличием стратегий по управлению биосинтезом целевых метаболитов и др. [33–35].

Таким образом, целью настоящего исследования стала оценка применимости модифицированного метода ЭСУ для выявления миотропных эффектов препаратов метаболического действия – экстрактов женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* C.A. Mey., ж. вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. и ж. японского *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey., метформина и малобена – у лептинрезистентных мышей *db/db*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Базельской декларацией и Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ. Эксперименты были выполнены на 60 молодых взрослых (2 мес.) мышах-самцах линии C57Bl/Ks-*db^{+/+}m (db/db)* массой 45–50 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область, Россия) одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней. Мыши получали «Полнорацционный комбикорм для лабораторных животных» (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воду, соответствующую требованиям ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Доступ к корму и воде был обеспечен *ad libitum*.

Непосредственно перед началом эксперимента мыши были рандомизированы на 6 групп:

- 1) контроль ($n = 10$; 0,9 % физиологический раствор);
- 2) женьшеня обыкновенного экстракт (ЖОЭ); «Экстракт MR.LT Ginseng», ООО «Торгово-Производственная Компания «Саморазвитие», Россия) ($n = 10$; 50 мг/кг);
- 3) ж. вьетнамского экстракт (ЖВЭ) ($n = 10$; 50 мг/кг);
- 4) ж. японского экстракт (ЖЯЭ) ($n = 10$; 50 мг/кг);
- 5) малобен ($n = 10$; 60 мг/кг; синтезирован отделом органического синтеза ФГБОУ ВО СПХФУ);
- 6) метформин ($n = 10$; 300 мг/кг; «Метформин-Акрихин», АО «АКРИХИН», Россия).

Все препараты вводили внутривентрально с помощью зонда 1 р/д в течение 2 мес.

Суспензионные культуры клеток женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* C.A. Mey., женьшеня вьетнамского *P. vietnamensis* Ha & Grushv. и женьшеня японского *P. japonicus* (T. Nees) C.A. Mey. были получены в Институте физиологии растений им К. А. Тимирязева РАН. Культуры выращивали в 20 л барботажных биореакторах (рабочий объем 15 л) при $26,0 \pm 0,5$ °C в темноте, при отъемно-доливном режиме культивирования, воздушная смесь подавалась со скоростью от 0,1 до 1,0 л/л·мин в зависимости от фазы роста культуры. Биомассу клеток собирали в точке достижения максимального накопления биомассы, отделяли от культуральной среды под вакуумом и высушивали до постоянного веса при 40 °C. Высушенную биомассу использовали для приготовления экстрактов. Для получения пробы биомассы каждого вида объединяли биомассу, полученную как минимум в трех циклах выращивания.

Экстракты из культур клеток ЖВЭ и ЖЯЭ были получены из лекарственного растительного сырья на кафедре фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ путем настаивания с 70%-м спиртом этиловым при соотношении сырья и экстрагента 1:20. В дальнейшем извлечения сгущали под вакуумом, высушивали при температуре не выше 37 °С и стандартизировали по сумме гинзенозидов. Эффективные дозы метформина [36], малобена [37] и препаратов женьшеня [38] были определены на основании литературных данных.

По окончании периода лечения у мышей измеряли силу хвата (г) передними и всеми четырьмя конечностями с помощью аппарата Grip Strength Meter (TSE Systems, Германия). Исследование биоэлектрической активности скелетных мышц проводили методом стимуляционной ЭНМГ с помощью 4-канального электронейромиографа «Нейро-МВП-8» и программы «Нейро-МВП.NET» 3.7.3.7 (ООО «Нейрософт», Россия). Перед проведением исследования животных наркотизировали хлоралгидратом (380 мг/кг, внутривенно; MilliporeSigma, США).

В режиме стимуляции одиночными стимулами регистрировали моторные ответы (М-ответы) икроножной мышцы *m. gastrocnemius* на стимуляцию седалищного нерва *n. ischiadicus* слева. Мышь фиксировали в положении лежа на брюшке; стимулирующие электроды устанавливали подкожно по обе стороны от седалищного бугра (анод – ростральнее, катод – каудальнее), пирующий электрод – подкожно перпендикулярно ходу *m. gastrocnemius* в ее наиболее широкой части, референтный электрод – подкожно в области ахиллова сухожилия (рисунок 1, А) [17].

Стимуляцию нервных волокон осуществляли при прямоугольной форме стимула и длительности 0,1 мс в диапазоне сил тока от 1 до 10 мА с последовательным увеличением с шагом 1 мА до достижения супра-максимальной величины. Для минимизации случайной погрешности для каждого животного проводили 3 повторные регистрации М-ответов с повторной установкой всех электродов. Измеряли средние значения максимальных амплитуд М-ответа (мВ), латентности (мс), длительности (мс) и площади (мВ · мс) М-ответа с максимальной амплитудой, а также силы тока (мА), вызывавшие М-ответы с минимальной (пороговая сила тока) и максимальной амплитудами.

В рамках протокола электростимуляционного утомления мышь фиксировали в положении лежа на брюшке; стимулирующие, пирующий, референтный и заземляющий электроды устанавливали как описано выше. Дополнительную пару стимулирующих электродов устанавливали поперек брюшка *m. gastrocnemius* в промежутке между пиющим и референтным электродами (рисунок 1, А).

Определяли фоновую амплитуду М-ответов мышцы на супрамаксимальную стимуляцию (10 мА) нерва, как описано выше, затем осуществляли стимуляцию мышцы по незначительно модифицированному протоколу Gregory et al. [22]: 3 трейна (серии) по 50 стимулов (10 мА, 100 Гц), 57 трейнов по 90 стимулов (10 мА, 40 Гц), 3 трейна по 50 стимулов (10 мА, 100 Гц). Повторно определяли амплитуду М-ответов на супрамаксимальную стимуляцию (10 мА) нерва через 1, 2, 3, 4 и 5 мин после окончания периода стимуляции (рисунок 1, Б).

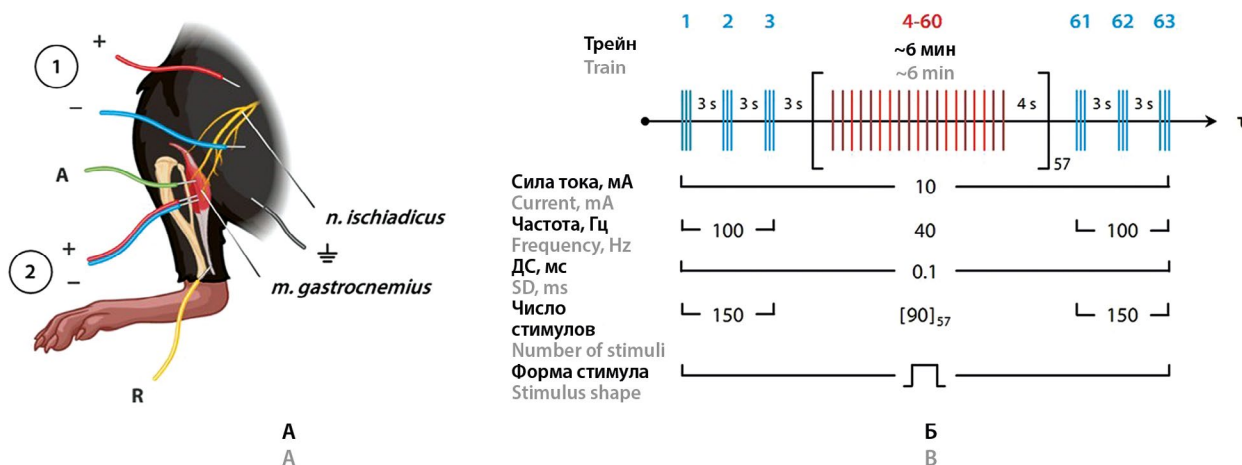


Рисунок 1. Расположение электродов и протокол электростимуляции.

А – расположение электродов при проведении исследования методом электростимуляционного утомления: 1 – участок стимуляции нерва; 2 – участок стимуляции мышцы; + – анод, – – катод; А – пирующий электрод; R – референтный электрод.

Б – протокол электростимуляции. ДС – длительность стимула

Figure 1. Electrode placement and electrical stimulation protocol.

А – Electrode placement during the electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) protocol:

1 – nerve stimulation pair; 2 – muscle stimulation pair; + – anode; – – cathode; A – active electrode; R – reference electrode.

Б – ESIF protocol. SD – stimulus duration

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью W-критерия Шапиро – Уилка. При нормальном распределении значимость различий в пределах одной группы в различных временных точках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, между группами – с помощью однофакторного дисперсионного ANOVA с *post-hoc*-тестом по Даннетту. При распределении, отличном от нормального, значимость различий в пределах одной группы оценивали с помощью теста Манна – Уитни, между группами – с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса с *post-hoc*-тестом по Данну. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$. Числовые данные на графиках представлены в виде средних арифметических; планки погрешностей отражают стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сила хвата переключины как передними, так и всеми четырьмя конечностями была одинакова во всех экспериментальных группах (рисунок 2).

Параметры М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами также не отличались у животных различных экспериментальных групп (рисунок 3).

Проведение ЭСУ приводило к снижению амплитуды М-ответа икроножной мышцы животных на 18,83–35,23 % от исходного уровня ($p < 0,01$ для всех групп). Величина падения амплитуды была значимо меньше (по модулю) в группах ЖВЭ, ЖЯЭ и малобе-

на по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для всех). Через 5 мин после окончания ЭСУ во всех группах было зафиксировано увеличение амплитуды М-ответа на 10,18–14,79 % (от исходных значений), имевшее статистическую значимость во всех группах, кроме ЖОЭ ($p < 0,01$ в группах контроля, ЖВЭ и ЖЯЭ; $p < 0,05$ в группах малобена и метформина). Значимые отличия от контроля по результатам восстановительного периода в опытных группах не наблюдались.

Амплитуда М-ответа в группе ЖВЭ во всех временных точках была значительно выше по сравнению с контрольными животными ($p < 0,05$ для всех точек); в группе ЖЯЭ – в точках 1, 2 и 3 мин ($p < 0,05$ для 1 и 3 мин, $p < 0,05$ для 2 мин); в группе малобена – в точках 1–4 мин ($p < 0,05$ для всех точек). Амплитуда М-ответа мышцы в группе метформина в течение восстановительного периода изменялась в диапазоне от 74,54 до 87,36 % от исходного значения, ни в одной из точек не отличаясь значимо от контрольной группы (рисунок 4, таблица 1).

В настоящей работе был изучен *in vivo* процесс восстановления сократимости икроножной мышцы в ответ на непрямую супрамаксимальную электростимуляцию в остром периоде после ее утомления тетанизацией. Во всех экспериментальных группах была показана устойчивая динамика, характеризующаяся падением амплитуды М-ответа мышцы на ~20–35 % по истечении ~6-минутного периода ЭСУ с последующим восстановлением на ~10–15 % от исходной величины в течение 5 мин. Качественно и количественно идентичный характер изменения амплитуды моторных ответов был определен нами ранее для взрослых беспородных мышей [39] и мышей линии C57Bl/6 (данные не опубликованы), не подвергавшихся какому-либо воздействию. Снижение силы сокращения

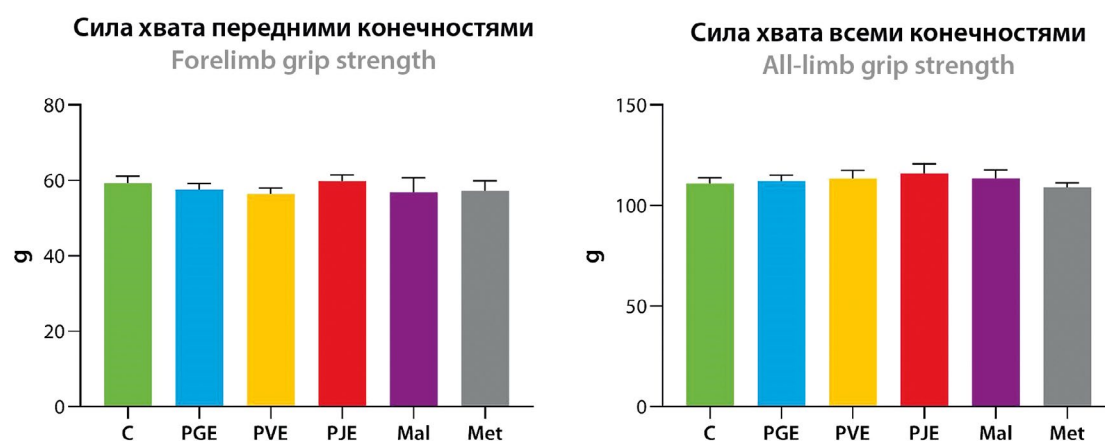


Рисунок 2. Сила хвата передними и всеми четырьмя конечностями.

C – контроль; PGE – женьшень обыкновенного экстракт; PVE – женьшень вьетнамского экстракт; PJE – женьшень японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин

Figure 2. Fore- and all-limb grip strength.

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin

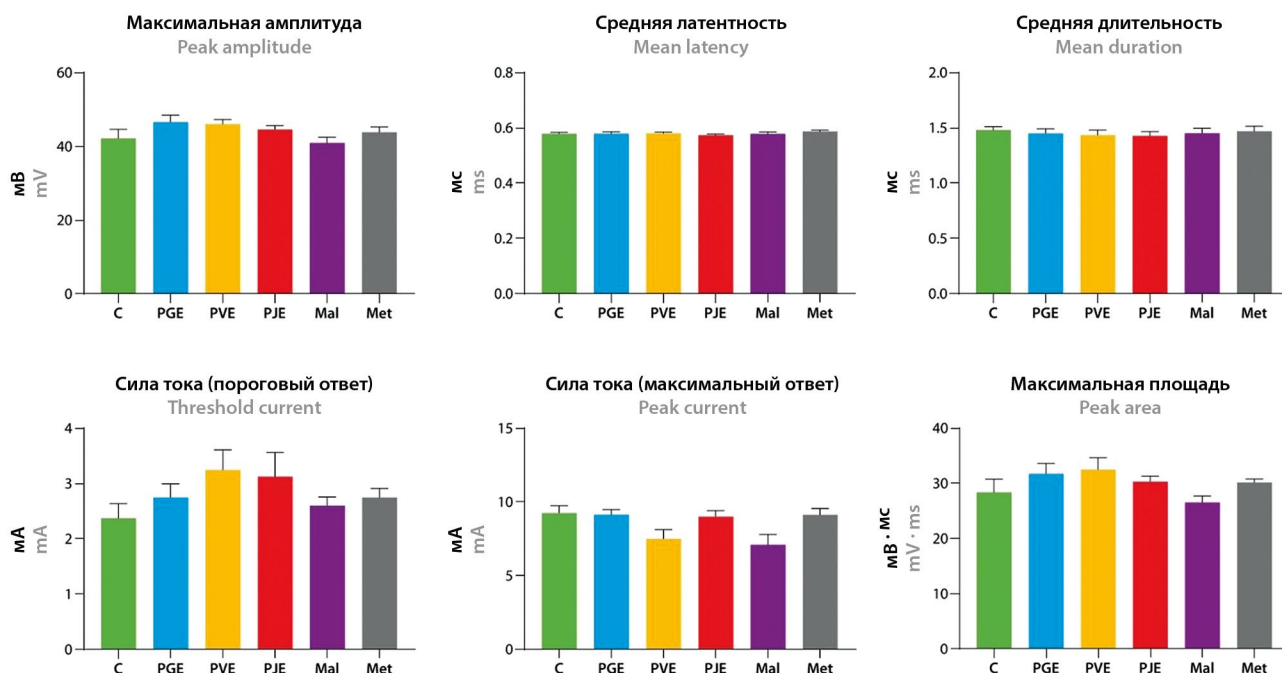


Рисунок 3. Параметры М-ответов икроножной мышцы на электростимуляцию седалищного нерва одиночными стимулами.

C – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин

Figure 3. Parameters of compound muscle action potentials in the gastrocnemius muscle to single-stimulus sciatic nerve electrical stimulation.

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin

Таблица 1. Изменение относительной амплитуды М-ответа икроножной мышцы в результате ее электростимуляционного утомления (ЭСУ) и в восстановительном периоде после ЭСУ

Table 1. Net change of relative compound muscle action potential amplitude in the gastrocnemius muscle resulting from its electrical stimulation-induced fatigue (ESIF) and during the post-ESIF recovery period

Группа Group	Изменение в результате ЭСУ Change induced by ESIF			Изменение от 1 до 5 мин после ЭСУ Change over 1 to 5 min following ESIF		
	Δ , %	<i>p</i> против себя <i>p</i> vs. self	<i>p</i> против К <i>p</i> vs. Control	Δ , %	<i>p</i> против себя <i>p</i> vs. self	<i>p</i> против К <i>p</i> vs. Control
C	-35.23 ± 2.21	**	–	$+14.62 \pm 3.00$	**	–
PGE	-33.49 ± 4.97	**	>0.05	$+12.74 \pm 1.88$	>0.05	>0.05
PVE	-21.50 ± 1.18	**	*	$+14.79 \pm 1.75$	**	>0.05
PJE	-20.01 ± 2.24	**	*	$+10.18 \pm 0.85$	**	>0.05
Mal	-18.83 ± 4.16	**	*	$+10.69 \pm 2.98$	*	>0.05
Met	-26.17 ± 3.77	**	>0.05	$+12.54 \pm 1.83$	*	>0.05

Примечание. C – контроль; PGE – женьшеня обыкновенного экстракт; PVE – женьшеня вьетнамского экстракт; PJE – женьшеня японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин.

Note. C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin.

при длительной (от 30 с) тетанизации (от 40 [40] до 80 Гц [41]) было ранее показано для изолированных мышечных волокон японской бурой лягушки [40] и мыши [42], а также мышц-разгибателей нижней конечности у здоровых добровольцев [41]. Таким об-

разом, наблюдаемая динамика, предположительно, является типичной для животных, подвергающихся ЭСУ, и отражает развитие и компенсацию краткосрочного мышечного утомления. Считается, что краткосрочное утомление, вызываемое продолжительной

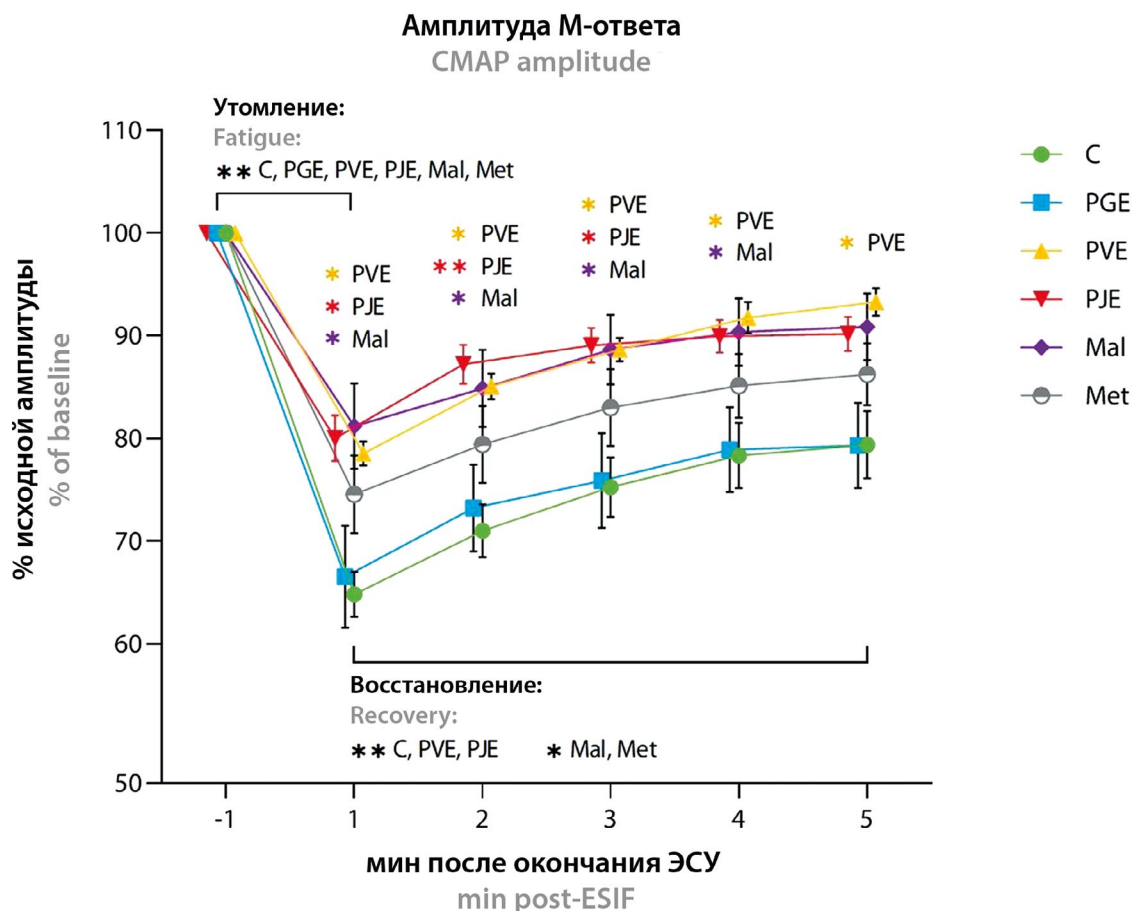


Рисунок 4. Динамика амплитуды М-ответа икроножной мышцы на супрамаксимальную стимуляцию седалищного нерва до (–1 мин) и после (1–5 мин) электростимуляционного утомления (ESIF).

C – контроль; PGE – женьшень обыкновенного экстракт; PVE – женьшень вьетнамского экстракт; PJE – женьшень японского экстракт; Mal – малобен; Met – метформин.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (против себя на участках «Утомление» и «Восстановление»; против контроля в остальных случаях)

Figure 4. Amplitude dynamics of the compound muscle action potentials (CMAP) invoked in the gastrocnemius muscle by supramaximal sciatic nerve stimulation before (–1 min) and after (1–5 min) electrical stimulation-induced fatigue (ESIF).

C – control; PGE – *Panax ginseng* extract; PVE – *P. vietnamensis* extract; PJE – *P. japonicus* extract; Mal – maloben; Met – metformin.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (vs. self in the “Fatigue” and “Recovery” blocks; vs. control elsewhere)

тетанической стимуляцией, происходит вследствие изменения величины ионных градиентов, приводящего к уменьшению амплитуды или даже исчезновению потенциала действия, в результате развивающейся гипоксии и ишемии ткани, а также, в меньшей степени, вследствие накопления продуктов обмена и истощения резерва макроэргов [43, 44].

Большинство известных методов оценки мышечной утомляемости выполняются в условиях *in vitro* [40, 45–47] или *ex vivo* [48–49], что делает невозможным их повторное применение у одного и того же экспериментального животного. Описанный нами протокол является минимально инвазивным и может быть использован многократно (при заме-

не хлоралгидрата, используемого только в терминальных экспериментах) в условиях хронического эксперимента. Кроме этого, оценка миотропных эффектов фармакологических агентов непосредственно в живом организме позволяет избежать возможного невоспроизведения результатов, полученных *in vitro*, что нередко наблюдается в области экспериментального изучения нейромышечных заболеваний [50–52].

Как и некоторые другие существующие методики моделирования краткосрочного мышечного утомления *in vivo* [53, 54], описанный протокол предполагает проведение интермиттирующей тетанизации в течение ~6 мин. Использование продолжительного пе-

риода тетанизации позволяет продлить и период восстановления сократимости мышцы, который может укладываться в несколько секунд при краткосрочной (до 30 с) тетанической стимуляции [43]. Наблюдение изменения амплитуды ответа мышцы в течение нескольких минут после окончания ЭСУ, в свою очередь, создает возможность для детального анализа и статистической обработки данных, получаемых в нескольких временных точках. Одновременно с этим весь описываемый протокол укладывается в 15 мин, что позволяет проводить исследование без необходимости длительной и/или повторной анестезии животного.

ЖВЭ и ЖЯЭ, но не ЖОЭ, оказывали значимое положительное влияние на динамику восстановления сократимости икроножной мышцы после ЭСУ. В экспериментальных и клинических исследованиях были ранее показаны стимуляция миогенеза и улучшение энергетического метаболизма скелетно-мышечных волокон [55], активация митохондриального биогенеза [56], уменьшение выраженности постнагрузочно-повреждения мышц [57] и облегчение восстановления их сократимости [58] при применении некоторых видов женьшеня (ж. обыкновенный [55, 59], ж. американский *Panax quinquefolius* L. [55, 57]) и его отдельных активных соединений (гинзенозидов Rc [56] и Rg1 [60]). Основными механизмами действия препаратов женьшеня считаются активация сигналинга Akt/mTOR, индукция миогенина и фактора детерминации миообластов MyoD, угнетение активности проатрофических факторов (атрогина-1, миостатина, активных форм кислорода) и экспрессии провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-6) [60].

В природе для растений ж. вьетнамского по сравнению с ж. обыкновенным характерно более высокое содержание вина-гинзенозида R2 (VR2) и протопанаксатриола, а также наличие дополнительных сапонинов – производных окотиллола [в том числе маджонозида R2 (MR2)] и даммарана [61]. Показано, что VR2 и MR2 обладают выраженной противовоспалительной активностью *in vitro* [62], а MR2 также ингибирует TNF- α -индуцированный апоптоз гепатоцитов [63] и стимулирует биогенез митохондрий в кардиомиоцитах [64], что гипотетически может опосредовать влияние этих соединений на скелетно-мышечную функцию. Состав ж. японского изучен в меньшей степени, однако также сообщается о присутствии в его частях некоторых уникальных соединений, таких как панаяпонол и псевдогинзенозид RT1-бутиловый эфир [65].

Для культуры клеток женьшеня японского, использованной в данной работе, было показано наличие широкого спектра гинзенозидов с суммарной концентрацией 7,54 % сухого веса. Среди них значительную часть составляют гинзенозиды группы олеаноловой кислоты R0 и ChIvA (43,84 и 16,25 мг/г сухо-

го веса соответственно). Также были найдены гинзенозиды группы протопанаксадиолов (Rb1, Rc, Rb2, Rb3, Rg3 и Rd), протопанаксатриолов (Re, Rf, Rg1, Rh1, R1) и их малонильные производные [34]. В культурах клеток женьшеня вьетнамского были идентифицированы 13 основных гинзенозидов групп протопанаксадиолов, олеаноловой кислоты, а также окотиллоловый гинзенозид винагинзенозид R1, в то время как для культуры клеток женьшеня обыкновенного было характерно преобладание гинзенозида R0 [34]. Таким образом, наблюдаемые различия в эффективности ЖОЭ, ЖВЭ и ЖЯЭ могут быть связаны с фитохимическими особенностями культур клеток данных видов.

Наряду с ЖВЭ и ЖЯЭ малобен повышал степень сохранения сократимости икроножной мышцы при использовании протокола ЭСУ. В проведенных ранее экспериментальных исследованиях это соединение уменьшало проявления миостеатоза при стеатозе печени [37], способствовало уменьшению накопления висцерального жира при алиментарном ожирении [31], а также ингибировало реакции апоптоза гепатоцитов при неалкогольном стеатогепатите [30]. Предположительно, антистеатотический и антиапоптотический эффекты малобена могут лежать в основе его положительного влияния на мышечную сократимость.

Несмотря на присутствие некоторой тенденции к улучшению, не было зафиксировано значимых отличий динамики восстановления мышечной сократимости между контрольными животными и особями, получавшими терапию метформинном. Литературные данные о влиянии метформина на функцию скелетных мышц неоднозначны. В работах, выполненных на грызунах с применением методик *in vivo* и *ex vivo*, сообщается как о положительном влиянии препарата на миогенез и анаболические процессы в мышцах [66], так и об уменьшении диаметра мышечных волокон, а также снижении силы хвата у животных, получавших метформин [67]. При этом отмечается, что мыши *db/db* могут быть менее чувствительны к миотропным эффектам метформина по сравнению с животными дикого типа [67].

Установлено, что прием метформина во время соблюдения постельного режима способствует уменьшению тяжести мышечной атрофии и миофиброза на момент восстановления подвижности [29]. В то же время результаты исследования, проведенного с участием здоровых добровольцев старше 65 лет, свидетельствуют о замедлении набора мышечной массы при прогрессивных тренировках с отягощением на фоне приема метформина [68]. Проведенный в 2021 г. метаанализ 15 клинических исследований не выявил положительного или отрицательного влияния препарата на мышечную массу и силу ввиду высокой гетерогенности имеющихся данных [69].

Характерным явлением, наблюдаемым нами в эксперименте, было отсутствие корреляции результатов оценки максимальной мышечной силы (силы хвата), а также параметров М-ответов икроножной мышцы на стимуляцию одиночными стимулами с результатами, полученными при применении ЭСУ. Использование тестов хвата перекладины и удержания на перевернутой сетчатой платформе для оценки мышечной функции у животных сопряжено с неизбежным искажением результата под влиянием поведенческого (мотивационного) фактора [26, 70]. Отмечается, что снижение мотивации к хвату перекладины или удержанию на платформе более характерно для возрастных животных [70]; вероятно, наличие депрессивноподобного фенотипа у взрослых мышей *db/db* [71, 72] может также способствовать снижению их мотивации к выполнению подобных тестов и затруднять оценку моторных функций в чистом виде. Дополнительной неконтролируемой переменной может быть наличие сенсорных нарушений, оказывающее значительное влияние на силу хвата [26] и характерное для мышей *db/db* [73].

Таким образом, отсутствие значимых эффектов ЖЯЭ, ЖВЭ и малобена на силу хвата перекладины при одновременном положительном влиянии на мышечную сократимость по данным ЭНМГ может быть связано с низкой специфичностью теста силы хвата и большим количеством переменных, оказывающих влияние на его конечный результат. Предлагаемый протокол исследования, в отличие от теста силы хвата [26], также минимизирует влияние оператора, поскольку выполняется в условиях однократной установки всех электродов и последующей регистрации сигнала в полуавтоматическом режиме.

Следует остановиться на основных недостатках описываемого протокола. Отсутствие корреляции данных ЭНМГ и результатов, полученных при измерении силы хвата, хотя и может быть объяснено значительным влиянием дополнительных факторов, может также указывать на то, что анализируемый нами параметр – амплитуда М-ответа – является скорее суррогатным и может не отражать полной картины моторной функции животных. Невозможность установления однозначного равенства между амплитудой сигнала и реальной эффективностью работы скелетных мышц является известным недостатком ЭНМГ-исследований [74].

Вследствие необходимости выполнения протокола в условиях общей анестезии важным представляется потенциальное влияние используемого анестетика, а также глубины наркоза на результат анализа. В различных исследованиях биоэлектрической активности скелетных мышц *in vivo* в качестве анестетиков используются изофлуран [17, 49], метоксифлуран [75], пентобарбитал-натрий [76], фентанил + дроперидол + диазепам, кетамин + ксилазин [75]. Имеется сообщение, что у человека гипнотические дозы хлоралгидрата (200–1000 мг/кг)

могут избирательно угнетать сократимость отдельных скелетных мышц (подбородочно-язычной, но не диафрагмы) [77], однако входит ли в число этих мышц икроножная – неизвестно.

В отличие от предлагаемой нами методики использование имплантируемых электродов для дальнейшей стимуляции мышцы у бодрствующего животного, как описано в работе А. В. Воронкова и соавторов [25], позволяет избежать необходимости повторной анестезии для каждого измерения. Решением проблемы также могут стать имплантируемые электромиографические системы, обеспечивающие возможность регистрации спонтанных и вызванных потенциалов в режиме реального времени у бодрствующих животных [78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный в работе протокол ЭСУ представляет собой малоинвазивную методику, позволяющую проводить динамический анализ сократимости скелетных мышц без значимого влияния поведенческого фактора со стороны экспериментального животного. Данный протокол может быть использован для выявления миотропных эффектов средств с различным характером фармакологической активности и подходит для использования в хроническом эксперименте.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сахарный диабет 2 типа у взрослых. Клинические рекомендации. М.: Общественная организация «Российская ассоциация эндокринологов»; 2022. 251 с.
2. Ye J., Wu Y., Yang S., Zhu D., Chen F., Chen J., Ji X., Hou K. The global, regional and national burden of type 2 diabetes mellitus in the past, present and future: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1192629. DOI: 10.3389/fendo.2023.1192629.
3. Khan M. A. B., Hashim M. J., King J. K., Govender R. D., Mustafa H., Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*. 2020;10(1):107–111. DOI: 10.2991/jegh.k.191028.001.
4. Chen H., Huang X., Dong M., Wen S., Zhou L., Yuan X. The Association Between Sarcopenia and Diabetes: From Pathophysiology Mechanism to Therapeutic Strategy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2023;16:1541–1554. DOI: 10.2147/DMSO.S410834.
5. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Regnier M., Delzenne N. M., Raes J., Muccioli G. G., Hul M. V., Cain P. D. Novel insights into the genetically obese (*ob/ob*) and diabetic (*db/db*) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
6. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (*db/db*)]. *Acta Neuropathologica*. 1978;41(2):85–89. DOI: 10.1007/BF00689757.
7. Sima A. A., Robertson D. M. Peripheral neuropathy in the diabetic mutant mouse. An ultrastructural study. *Laboratory Investigation*. 1979;40(6):627–632.

8. Lin-Shiau S.-Y., Liu S.-H., Lin M.-J. Use of ion channel blockers in the exploration of possible mechanisms involved in the myopathy of diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;348(3):311–318. DOI: 10.1007/BF00169161.
9. Zenker J., Poirot O., de Preux Charles A. S., Arnaud E., Médard J.-J., Lacroix C., Kuntzer T., Chrast R. Altered distribution of juxtaparanodal K_v1.2 subunits mediates peripheral nerve hyperexcitability in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(22):7493–7498. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-12.2012.
10. Eshima H., Tamura Y., Kakehi S., Nakamura K., Kurebayashi N., Murayama T., Kakigi R., Sakurai T., Kawamori R., Watada H. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca²⁺ handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice. *Journal of Applied Physiology*. 2019;126(1):170–182. DOI: 10.1152/jappphysiol.00048.2018.
11. Bayley J. S., Pedersen T. H., Nielsen O. B. Skeletal muscle dysfunction in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Muscle & Nerve*. 2016;54(3):460–468. DOI: 10.1002/mus.25064.
12. Nguyen M.-H., Cheng M., Koh T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *The Scientific World JOURNAL*. 2011;11:1525–1535. DOI: 10.1100/tsw.2011.137.
13. Wang X., Hu Z., Hu J., Du J., Mitch W. E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160–4168. DOI: 10.1210/en.2006-0251.
14. Kim K. W., Baek M.-O., Choi J.-Y., Son K. H., Yoon M.-S. Analysis of the Molecular Signaling Signatures of Muscle Protein Wasting Between the Intercostal Muscles and the Gastrocnemius Muscles in db/db Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6062. DOI: 10.3390/ijms20236062.
15. Wang M., Pu D., Zhao Y., Chen J., Zhu S., Lu A., Liao Z., Sun Y., Xiao Q. Sulforaphane protects against skeletal muscle dysfunction in spontaneous type 2 diabetic db/db mice. *Life Sciences*. 2020;255:117823. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117823.
16. Yu J., Loh K., Yang H.-Q., Du M.-R., Wu Y.-X., Liao Z.-Y., Guo A., Yang Y.-F., Chen B., Zhao Y.-X., Chen J.-L., Zhou J., Sun Y., Xiao Q. The Whole-transcriptome Landscape of Diabetes-related Sarcopenia Reveals the Specific Function of Novel lncRNA Gm20743. *Communications Biology*. 2022;5(1):774. DOI: 10.1038/s42003-022-03728-8.
17. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741.
18. Rutkove S. B., Chen Z.-Z., Pandeya S., Callegari S., Mourey T., Nagy J. A., Nath A. K. Surface Electrical Impedance Myography Detects Skeletal Muscle Atrophy in Aged Wildtype Zebrafish and Aged gpr27 Knockout Zebrafish. *Biomedicine*. 2023;11(7):1938. DOI: 10.3390/biomedicine11071938.
19. Chugh D., Iyer C. C., Wang X., Bobbili P., Rich M. M., Arnold W. D. Neuromuscular junction transmission failure is a late phenotype in aging mice. *Neurobiology of Aging*. 2020;86:182–190. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.022.
20. Padilla C. J., Harrigan M. E., Harris H., Schwab J. M., Rutkove S. B., Rich M. M., Clark B. C., Arnold W. D. Profiling age-related muscle weakness and wasting: neuromuscular junction transmission as a driver of age-related physical decline. *GeroScience*. 2021;43(3):1265–1281. DOI: 10.1007/s11357-021-00369-3.
21. Приходько В. А., Матузок Т. М., Оковитый С. В. Нарушения нейромышечной передачи у лептинрезистентных мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3):77–81. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-77-81.
22. Gregory N. S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., Sluka K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*. 2013;154(12):2668–2676. DOI: 10.1016/j.pain.2013.07.047.
23. Gregory N. S., Brito R. G., Oliveira Fusaro M. C. G., Sluka K. A. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1020–1030. DOI: 10.1007/s12035-014-9055-4.
24. Lesnak J. B., Inoue S., Lima L., Rasmussen L., Sluka K. A. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain*. 2020;161(12):2898–2908. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001985.
25. Воронков А. В., Поздняков Д. И., Руковицина В. М., Оганесян Э. Т. Влияние новых производных хромон-3-альдегида на развитие мышечной дисфункции в условиях эксперимента. *Крымский терапевтический журнал*. 2018;4:67–71.
26. Maurissen J. P. J., Marable B. R., Andrus A. K., Stebbins K. E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*. 2003;25(5):543–553. DOI: 10.1016/s0892-0362(03)00073-4.
27. Baker C., Retzik-Stahr C., Singh V., Plomondon R., Anderson V., Rasouli N. Should metformin remain the first-line therapy for treatment of type 2 diabetes? *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2021;12:2042018820980225. DOI: 10.1177/2042018820980225.
28. Lyu Q., Wen Y., He B., Zhang X., Chen J., Sun Y., Zhao Y., Xu L., Xiao Q., Deng H. The ameliorating effects of metformin on disarrangement ongoing in gastrocnemius muscle of sarcopenic and obese sarcopenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2022;1868(11):166508. DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166508.
29. Petrocelli J. J., McKenzie A. I., de Hart N. M. M. P., Reidy P. T., Mahmassani Z. S., Keeble A. R., Kaput K. L., Wahl M. P., Rondina M. T., Marcus R. L., Welt C. K., Holland W. L., Funai K., Fry C. S., Drummond M. J. Disuse-induced muscle fibrosis, cellular senescence, and senescence-associated secretory phenotype in older adults are alleviated during re-ambulation with metformin pre-treatment. *Aging Cell*. 2023;22(11):e13936. DOI: 10.1111/acer.13936.
30. Бажанова Е. Д., Оковитый С. В., Белых М. А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дифензоата натрия и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у мышей с сахарным диабетом и ожирением. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(5):17–20. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20.
31. Белых М. А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо)дифензоата натрия на проявления экспериментального неалкогольного стеатогепатита. *Биомедицина*. 2021;17(3):95–99. DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-95-99.
32. Li Z., Ji G. E. Ginseng and obesity. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jgr.2016.12.005.
33. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Kochkin D. V., Galishev B. A., Popova E. V., Ivkin D. Y., Luzhanin V. G., Krasnova M. V., Demakova N. V., Nosov A. M. Effect of phytopreparations based on bioreactor-grown cell biomass of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and

- Panax japonicus* on carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2021;13(11):3811. DOI: 10.3390/nu13113811.
34. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivkin D. Y., Krasnova M. V., Vasilevskaya E. R., Fedulova L. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Popova E. V., Nosov A. M. The hypoglycemic and hypocholesterolemic activity of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* cell culture biomass in rats with high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*. 2023;15(3):656. DOI: 10.3390/nu15030656.
35. Titova M. V., Popova E. V., Ivanov I. M., Fomenkov A. A., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Klychnikov O. I., Metalnikov P. S., Tyurina T. M., Paek K.-Y. Toxicological evaluation of ginsenoside-rich cell culture biomass of *Panax japonicus* produced in a large-scale bioreactor system. *Industrial Crops and Products*. 2024;208:117761. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117761.
36. Spruss A., Kanuri G., Stahl C., Bischoff S. C., Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest*. 2012;92(7):1020–1032. DOI: 10.1038/labinvest.2012.75.
37. Белых М. А., Оковитый С. В. Оценка эффективности нового производного малоновой кислоты в качестве антистеатозного средства при высокожировой диете у мышей. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(5):28–29.
38. Attele A. S., Zhou Y.-P., Xie J.-T., Wu J. A., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P. A., Polonsky K. S., Yuan C.-S. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*. 2002;51(6):1851–1858. DOI: 10.2337/diabetes.51.6.1851.
39. Приходько В. А., Алексеева Ю. С., Захлевная Д. А., Болотова В. Ц. Влияние экстракта живучки туркестанской на восстановление сократимости мышц после электростимуляционного утомления у мышей. В сб.: Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов IX Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2023». 28–29 сентября 2023. Воронеж. Воронеж: Воронежский государственный университет; 2023. С. 619–623. DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-619-623.
40. Inamura N., Fujisige A., Miyake S., Ono A., Tsuchiya T. The effects of temperature on the mechanical performance in fatigued single muscle fibers of the frog induced by twitch and tetanus. *The Japanese Journal of Physiology*. 2000;50(1):49–57. DOI: 10.2170/jjphysiol.50.49.
41. Fitch S., McComas A. Influence of human muscle length on fatigue. *The Journal of Physiology*. 1985;362(1):205–213. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015671.
42. Bruton J., Pinniger G. J., Lännergren J., Westerblad H. The effects of the myosin-II inhibitor N-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta Physiologica*. 2006;186(1):59–66. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2005.01499.x.
43. Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008;88(1):287–332. DOI: 10.1152/physrev.00015.2007.
44. Wan J.-J., Qin Z., Wang P.-Y., Sun Y., Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(10):e384. DOI: 10.1038/emm.2017.194.
45. Germinario E., Esposito A., Midrio M., Peron S., Palade P. T., Betto R., Danielli-Betto D. High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca^{2+} . *European Journal of Applied Physiology*. 2008;104(3):445–453. DOI: 10.1007/s00421-008-0796-5.
46. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics*. 2019;64(5):812–817. DOI: 10.1134/S0006350919050075.
47. Vesga-Castro C., Aldazabal J., Vallejo-Illarramendi A., Paredes J. Contractile force assessment methods for in vitro skeletal muscle tissues. *eLife*. 2022;11:e77204. DOI: 10.7554/eLife.77204.
48. Wineinger M. A., Walsh S. A., Abresch T. Muscle fatigue in animal models of neuromuscular disease. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002;81(11):S81–S98. DOI: 10.1097/00002060-200211001-00010.
49. Yamada T., Ashida Y., Tamai K., Kimura I., Yamauchi N., Naito A., Tokuda N., Westerblad H., Andersson D. C., Himori K. Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Research & Therapy*. 2022;24(1):156. DOI: 10.1186/s13075-022-02846-2.
50. Lindqvist J., Péniisson-Besnier I., Iwamoto H., Li M., Yagi N., Ochala J. A myopathy-related actin mutation increases contractile function. *Acta Neuropathologica*. 2012;123(5):739–746. DOI: 10.1007/s00401-012-0962-z.
51. Gineste C., De Winter J. M., Kohl C., Witt C. C., Giannesini B., Brohm K., Le Fur Y., Gretz N., Vilmen C., Pecchi E., Jubeau M., Cozzone P. J., Stienen G. J. M., Granzier H., Labeit S., Ottenheijm C. A. C., Bendahan D., Gondin J. *In vivo* and *in vitro* investigations of heterozygous nebulin knock-out mice disclose a mild skeletal muscle phenotype. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(4):357–369. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.12.011.
52. Gineste C., Ottenheijm C., Le Fur Y., Banzet S., Pecchi E., Vilmen C., Cozzone P. J., Koulmann N., Hardeman E. C., Bendahan D., Gondin J. Alterations at the cross-bridge level are associated with a paradoxical gain of muscle function *in vivo* in a mouse model of nemaline myopathy. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e109066. DOI: 10.1371/journal.pone.0109066.
53. Williams J. H., Ward C. W., Klug G. A. Fatigue-induced alterations in Ca^{2+} and caffeine sensitivities of skinned muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*. 1993;75(2):586–593. DOI: 10.1152/jappl.1993.75.2.586.
54. Moldovan M., Krarup C. Evaluation of Na^+/K^+ pump function following repetitive activity in mouse peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006;155(2):161–171. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.12.015.
55. Hwang J. H., Kang S. Y., Jung H. W. Effects of American wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng pharmacopuncture extracts on the regulation of C2C12 myoblasts differentiation through AMPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2022;25(6):192. DOI: 10.3892/mmr.2022.12708.
56. Kim A., Park S.-M., Kim N. S., Lee H. Ginsenoside Rc, an Active Component of *Panax ginseng*, Alleviates Oxidative Stress-Induced Muscle Atrophy via Improvement of Mitochondrial Biogenesis. *Antioxidants*. 2023;12(8):1576. DOI: 10.3390/antiox12081576.
57. Estaki M., Noble E. G. North American ginseng protects against muscle damage and reduces neutrophil infiltration after an acute bout of downhill running in rats. *Applied*

- Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2014;40(2):116–121. DOI: 10.1139/apnm-2014-0331.
58. Cristina-Souza G., Santos-Mariano A. C., Lima-Silva A. E., Costa P. L., Domingos P. R., Silva S. F., Abreu W. C., De-Oliveira F. R., Osiecki R. *Panax ginseng* Supplementation Increases Muscle Recruitment, Attenuates Perceived Effort, and Accelerates Muscle Force Recovery After an Eccentric-Based Exercise in Athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2022;36(4):991–997. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003555.
 59. Zhang H., Zhao C., Hou J., Su P., Yang Y., Xia B., Zhao X., He R., Wang L., Cao C., Liu T., Tian J. Red ginseng extract improves skeletal muscle energy metabolism and mitochondrial function in chronic fatigue mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1077249. DOI: 10.3389/fphar.2022.1077249.
 60. Ahmad S. S., Chun H. J., Ahmad K., Choi I. Therapeutic applications of ginseng for skeletal muscle-related disorder management. *Journal of Ginseng Research*. 2024;48(1):12–19. DOI: 10.1016/j.jgr.2023.06.003.
 61. Van Le T. H., Lee G. J., Long Vu H. K., Know S. W., Nguyen N. K., Park J. H., Nguyen M. D. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;63(11):950–954. DOI: 10.1248/cpb.c15-00369.
 62. Jeong J.-J., Van Le T. H., Lee S.-Y., Eun S.-H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D.-H. Anti-inflammatory effects of vinalginsenoside R2 and majonoside R2 isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*. 2015;28(1):700–706. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.025.
 63. Tran Q. L., Adnyana I. K., Tezuka Y., Harimaya Y., Saiki I., Kurashige Y., Tran Q. K., Kadota S. Hepatoprotective effect of majonoside R2, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta Medica*. 2002;68(5):402–406. DOI: 10.1055/s-2002-32069.
 64. Thu V. T., Yen N. T. H., Tung N. H., Bich P. T., Han J., Kim H. K. Majonoside-R2 extracted from Vietnamese ginseng protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via modulating mitochondrial function and biogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2021;36:127814. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127814.
 65. Chan H.-H., Hwang T.-L., Bhaskar Reddy M. V., Li D.-T., Qian K., Bastow K. F., Lee K.-H., Wu T.-S. Bioactive constituents from the roots of *Panax japonicus* var. *major* and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds. *Journal of Natural Products*. 2011;74(4):796–802. DOI: 10.1021/np100851s.
 66. Yousuf Y., Datu A., Barnes B., Amini-Nik S., Jeschke M. G. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):18. DOI: 10.1186/s13287-019-1480-x.
 67. Kang M. J., Moon J. W., Lee J. O., Kim J. H., Jung E. J., Kim S. J., Oh J. Y., Wu S. W., Lee P. R., Park S. H., Kim H. S. Metformin induces muscle atrophy by transcriptional regulation of myostatin via HDAC6 and FoxO3a. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021;13(1):605–620. DOI: 10.1002/jcsm.12833.
 68. Walton R. G., Dungan C. M., Long D. E., Tuggle S. C., Kosmac K., Peck B. D., Bush H. M., Villasante Tezanos A. G., McGwin G., Windham S. T., Ovalle F., Bamman M. M., Kern P. A., Peterson C. A. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13039. DOI: 10.1111/acer.13039.
 69. Соколова А. В., Климова А. В., Драгунов Д. О., Артюнов Г. П. Оценка влияния терапии метформином на величину мышечной массы и мышечной силы у больных с и без сахарного диабета. Метаанализ 15 исследований. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(3):4331. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4331.
 70. Deacon R. M. J. Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(76):2610. DOI: 10.3791/2610.
 71. Sharma A. N., Elased K. M., Garrett T. L., Lucot J. B. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiology & Behavior*. 2010;101(3):381–388. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
 72. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Cognitive and behavioural dysfunction in leptin-resistant mice. In: Proceedings of the 29th International Annual ISBS “Stress and Behavior” Neuroscience and Biological Psychiatry Conference. 18-19 May 2023. Saint Petersburg. 2023. P. 18.
 73. De Gregorio C., Contador D., Campero M., Ezquer M., Ezquer F. Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Biology Open*. 2018;7(9):bio036830. DOI: 10.1242/bio.036830.
 74. Roberts T. J., Gabaldón A. M. Interpreting muscle function from EMG: lessons learned from direct measurements of muscle force. *Integrative and Comparative Biology*. 2008;48(2):312–320. DOI: 10.1093/icb/icn056.
 75. Ingalls C. P., Warren G. L., Lowe D. A., Boorstein D. B., Armstrong R. B. Differential effects of anesthetics on in vivo skeletal muscle contractile function in the mouse. *Journal of Applied Physiology*. 1996;80(1):332–340. DOI: 10.1152/jappl.1996.80.1.332.
 76. Coelho Nepomuceno A., Landucci Politani E., Landucci Politani da Silva E., Salomone R., Losso Longo M. V., Grasi Salles A., Marques de Faria J. C., Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;31(8):542–548. DOI: 10.1590/S0102-865020160080000007.
 77. Hershenson M., Brouillette R. T., Olsen E., Hunt C. E. The effect of chloral hydrate on genioglossus and diaphragmatic activity. *Pediatric Research*. 1984;18(6):516–519. DOI: 10.1203/00006450-198406000-00006.
 78. Zealear D., Li Y., Huang S. An Implantable System For Chronic In Vivo Electromyography. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;21(158):10.3791/60345. DOI: 10.3791/60345.

REFERENCES

1. Type II diabetes mellitus in adults. Clinical guidelines. Moscow: Public organization “Russian Association of Endocrinologists”; 2022. 251 p.
2. Ye J., Wu Y., Yang S., Zhu D., Chen F., Chen J., Ji X., Hou K. The global, regional and national burden of type 2 diabetes mellitus in the past, present and future: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1192629. DOI: 10.3389/fendo.2023.1192629.
3. Khan M. A. B., Hashim M. J., King J. K., Govender R. D., Mustafa H., Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*. 2020;10(1):107–111. DOI: 10.2991/jegh.k.191028.001.
4. Chen H., Huang X., Dong M., Wen S., Zhou L., Yuan X. The Association Between Sarcopenia and Diabetes: From Pathophysiology Mechanism to Therapeutic Strategy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2023;16:1541–1554. DOI: 10.2147/DMSO.S410834.

5. Suriano F., Vieira-Silva S., Falony G., Roumain M., Paquot A., Pelicaen R., Regnier M., Delzenne N.M., Raes J., Muccioli G.G., Hul M.V., Cain P.D. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2021;9(1):147. DOI: 10.1186/s40168-021-01097-8.
6. Sima A.A., Robertson D.M. Peripheral neuropathy in mutant diabetic mouse [C57BL/Ks (db/db)]. *Acta Neuropathologica*. 1978;41(2):85–89. DOI: 10.1007/BF00689757.
7. Sima A.A., Robertson D.M. Peripheral neuropathy in the diabetic mutant mouse. An ultrastructural study. *Laboratory Investigation*. 1979;40(6):627–632.
8. Lin-Shiau S.-Y., Liu S.-H., Lin M.-J. Use of ion channel blockers in the exploration of possible mechanisms involved in the myopathy of diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;348(3):311–318. DOI: 10.1007/BF00169161.
9. Zenker J., Poirot O., de Preux Charles A. S., Arnaud E., Médard J.-J., Lacroix C., Kuntzer T., Chrast R. Altered distribution of juxtaparanodal K_v1.2 subunits mediates peripheral nerve hyperexcitability in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(22):7493–7498. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0719-12.2012.
10. Eshima H., Tamura Y., Kakehi S., Nakamura K., Kurebayashi N., Murayama T., Kakigi R., Sakurai T., Kawamori R., Watada H. Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca²⁺ handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice. *Journal of Applied Physiology*. 2019;126(1):170–182. DOI: 10.1152/jappphysiol.00048.2018.
11. Bayley J.S., Pedersen T.H., Nielsen O.B. Skeletal muscle dysfunction in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Muscle & Nerve*. 2016;54(3):460–468. DOI: 10.1002/mus.25064.
12. Nguyen M.-H., Cheng M., Koh T.J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *The Scientific World JOURNAL*. 2011;11:1525–1535. DOI: 10.1100/tsw.2011.137.
13. Wang X., Hu Z., Hu J., Du J., Mitch W. E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*. 2006;147(9):4160–4168. DOI: 10.1210/en.2006-0251.
14. Kim K.W., Baek M.-O., Choi J.-Y., Son K.H., Yoon M.-S. Analysis of the Molecular Signaling Signatures of Muscle Protein Wasting Between the Intercostal Muscles and the Gastrocnemius Muscles in db/db Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6062. DOI: 10.3390/ijms20236062.
15. Wang M., Pu D., Zhao Y., Chen J., Zhu S., Lu A., Liao Z., Sun Y., Xiao Q. Sulforaphane protects against skeletal muscle dysfunction in spontaneous type 2 diabetic db/db mice. *Life Sciences*. 2020;255:117823. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117823.
16. Yu J., Loh K., Yang H.-Q., Du M.-R., Wu Y.-X., Liao Z.-Y., Guo A., Yang Y.-F., Chen B., Zhao Y.-X., Chen J.-L., Zhou J., Sun Y., Xiao Q. The Whole-transcriptome Landscape of Diabetes-related Sarcopenia Reveals the Specific Function of Novel lncRNA Gm20743. *Communications Biology*. 2022;5(1):774. DOI: 10.1038/s42003-022-03728-8.
17. Pollari E., Prior R., Robberecht W., Van Damme P., Van Den Bosch L. In Vivo Electrophysiological Measurement of Compound Muscle Action Potential from the Forelimbs in Mouse Models of Motor Neuron Degeneration. *Journal of Visualized Experiments*. 2018;(136):57741. DOI: 10.3791/57741.
18. Rutkove S. B., Chen Z.-Z., Pandeya S., Callegari S., Mourey T., Nagy J. A., Nath A. K. Surface Electrical Impedance Myography Detects Skeletal Muscle Atrophy in Aged Wildtype Zebrafish and Aged gpr27 Knockout Zebrafish. *Biomedicines*. 2023;11(7):1938. DOI: 10.3390/biomedicines11071938.
19. Chugh D., Iyer C. C., Wang X., Bobbili P., Rich M. M., Arnold W. D. Neuromuscular junction transmission failure is a late phenotype in aging mice. *Neurobiology of Aging*. 2020;86:182–190. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.022.
20. Padilla C. J., Harrigan M. E., Harris H., Schwab J. M., Rutkove S. B., Rich M. M., Clark B. C., Arnold W. D. Profiling age-related muscle weakness and wasting: neuromuscular junction transmission as a driver of age-related physical decline. *GeroScience*. 2021;43(3):1265–1281. DOI: 10.1007/s11357-021-00369-3.
21. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Neuromuscular Joint Function Impairment in Leptin-Resistant Mice. *Journal Biomed*. 2023;19(3):77–81. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-77-81.
22. Gregory N. S., Gibson-Corley K., Frey-Law L., Sluka K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*. 2013;154(12):2668–2676. DOI: 10.1016/j.pain.2013.07.047.
23. Gregory N. S., Brito R. G., Oliveira Fusaro M. C. G., Sluka K. A. ASIC3 Is Required for Development of Fatigue-Induced Hyperalgesia. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(2):1020–1030. DOI: 10.1007/s12035-014-9055-4.
24. Lesnak J. B., Inoue S., Lima L., Rasmussen L., Sluka K. A. Testosterone protects against the development of widespread muscle pain in mice. *Pain*. 2020;161(12):2898–2908. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001985.
25. Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Rukovitsyna V. M., Oganessian E. T. Impact of new derivatives chromon-3-aldehyde in the development of muscle dysfunction in experimental conditions. *Crimean Journal of Internal Diseases*. 2018;4:67–71. (In Russ.)
26. Maurissen J. P. J., Marable B. R., Andrus A. K., Stebbins K. E. Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology*. 2003;25(5):543–553. DOI: 10.1016/s0892-0362(03)00073-4.
27. Baker C., Retzik-Stahr C., Singh V., Plomondon R., Anderson V., Rasouli N. Should metformin remain the first-line therapy for treatment of type 2 diabetes? *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. 2021;12:2042018820980225. DOI: 10.1177/2042018820980225.
28. Lyu Q., Wen Y., He B., Zhang X., Chen J., Sun Y., Zhao Y., Xu L., Xiao Q., Deng H. The ameliorating effects of metformin on disarrangement ongoing in gastrocnemius muscle of sarcopenic and obese sarcopenic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2022;1868(11):166508. DOI: 10.1016/j.bbdis.2022.166508.
29. Petrocilli J. J., McKenzie A. I., de Hart N. M. M. P., Reidy P. T., Mahmassani Z. S., Keeble A. R., Kaput K. L., Wahl M. P., Rondina M. T., Marcus R. L., Welt C. K., Holland W. L., Funai K., Fry C. S., Drummond M. J. Disuse-induced muscle fibrosis, cellular senescence, and senescence-associated secretory phenotype in older adults are alleviated during re-ambulation with metformin pre-treatment. *Aging Cell*. 2023;22(11):e13936. DOI: 10.1111/acer.13936.

30. Bazhanova E. D., Okovityi S. V., Belykh M. A. Effect of sodium 4,4'-(propanediamide)dibenzoate and metformin on the dynamics of apoptosis and proliferation of hepatocytes in mice with diabetes and obesity. *Experimental and clinical pharmacology*. 2018;81(5):17–20. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20.
31. Belykh M. A. Impact of 4,4'-(propanediamide)dibenzoate sodium on manifestations of experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Journal Biomed*. 2021;17(3):95–99. (In Russ.) DOI: 10.33647/2074-5982-17-3-95-99.
32. Li Z., Ji G. E. Ginseng and obesity. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jgr.2016.12.005.
33. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Kochkin D. V., Galishev B. A., Popova E. V., Ivkin D. Y., Luzhanin V. G., Krasnova M. V., Demakova N. V., Nosov A. M. Effect of phytopreparations based on bioreactor-grown cell biomass of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* on carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2021;13(11):3811. DOI: 10.3390/nu13113811.
34. Povydysh M. N., Titova M. V., Ivkin D. Y., Krasnova M. V., Vasilevskaya E. R., Fedulova L. V., Ivanov I. M., Klushin A. G., Popova E. V., Nosov A. M. The hypoglycemic and hypocholesterolemic activity of *Dioscorea deltoidea*, *Tribulus terrestris* and *Panax japonicus* cell culture biomass in rats with high-fat diet-induced obesity. *Nutrients*. 2023;15(3):656. DOI: 10.3390/nu15030656.
35. Titova M. V., Popova E. V., Ivanov I. M., Fomenkov A. A., Nebera E. A., Vasilevskaya E. R., Tolmacheva G. S., Kotenkova E. A., Klychnikov O. I., Metalnikov P. S., Tyurina T. M., Paek K.-Y. Toxicological evaluation of ginsenoside-rich cell culture biomass of *Panax japonicus* produced in a large-scale bioreactor system. *Industrial Crops and Products*. 2024;208:117761. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117761.
36. Spruss A., Kanuri G., Stahl C., Bischoff S. C., Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest*. 2012;92(7):1020–1032. DOI: 10.1038/labinvest.2012.75.
37. Belykh M. A., Okovityi S. V. Effectiveness assessment of a new malonic acid derivative as an antisteatotic agent in high-fat diet in mice. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2018;81(5):28–29. (In Russ.)
38. Attele A. S., Zhou Y.-P., Xie J.-T., Wu J. A., Zhang L., Dey L., Pugh W., Rue P. A., Polonsky K. S., Yuan C.-S. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*. 2002;51(6):1851–1858. DOI: 10.2337/diabetes.51.6.1851.
39. Prikhodko V. A., Alekseeva Yu. S., Zakhlevnaya D. A., Bolotova V. Ts. Effects of an *Ajuga turkestanica* extract on muscle contractility recovery following electrical stimulation-induced fatigue in mice. In: Ways and forms for pharmaceutical education improvement. Current issues in new drug development and research: Proceedings of the IX International scientific and methodological conference "Pharmeducation-2023". 28–29 September 2023. Voronezh. Voronezh: Voronezh State University; 2023. P. 619–623. (In Russ.) DOI: 10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-619-623.
40. Inamura N., Fujisige A., Miyake S., Ono A., Tsuchiya T. The effects of temperature on the mechanical performance in fatigued single muscle fibers of the frog induced by twitch and tetanus. *The Japanese Journal of Physiology*. 2000;50(1):49–57. DOI: 10.2170/jjphysiol.50.49.
41. Fitch S., McComas A. Influence of human muscle length on fatigue. *The Journal of Physiology*. 1985;362(1):205–213. DOI: 10.1113/jphysiol.1985.sp015671.
42. Bruton J., Pinniger G. J., Lännergren J., Westerblad H. The effects of the myosin-II inhibitor N-benzyl-p-toluene sulphonamide on fatigue in mouse single intact toe muscle fibres. *Acta Physiologica*. 2006;186(1):59–66. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2005.01499.x.
43. Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiological Reviews*. 2008;88(1):287–332. DOI: 10.1152/physrev.00015.2007.
44. Wan J.-J., Qin Z., Wang P.-Y., Sun Y., Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(10):e384. DOI: 10.1038/emm.2017.194.
45. Germinario E., Esposito A., Midrio M., Peron S., Palade P. T., Betto R., Danieli-Betto D. High-frequency fatigue of skeletal muscle: role of extracellular Ca^{2+} . *European Journal of Applied Physiology*. 2008;104(3):445–453. DOI: 10.1007/s00421-008-0796-5.
46. Khairullin A. E., Teplov A. Y., Grishin S. N., Farkhutdinov A. M., Ziganshin A. U. The thermal sensitivity of purinergic modulation of contractile activity of locomotor and respiratory muscles in mice. *Biophysics*. 2019;64(5):812–817. DOI: 10.1134/S0006350919050075.
47. Vesga-Castro C., Aldazabal J., Vallejo-Illarramendi A., Paredes J. Contractile force assessment methods for in vitro skeletal muscle tissues. *eLife*. 2022;11:e77204. DOI: 10.7554/eLife.77204.
48. Wineinger M. A., Walsh S. A., Abresch T. Muscle fatigue in animal models of neuromuscular disease. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2002;81(11):S81–S98. DOI: 10.1097/00002060-200211001-00010.
49. Yamada T., Ashida Y., Tamai K., Kimura I., Yamauchi N., Naito A., Tokuda N., Westerblad H., Andersson D. C., Himori K. Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Research & Therapy*. 2022;24(1):156. DOI: 10.1186/s13075-022-02846-2.
50. Lindqvist J., Pénilsson-Besnier I., Iwamoto H., Li M., Yagi N., Ochala J. A myopathy-related actin mutation increases contractile function. *Acta Neuropathologica*. 2012;123(5):739–746. DOI: 10.1007/s00401-012-0962-z.
51. Gineste C., De Winter J. M., Kohl C., Witt C. C., Gianne-sini B., Brohm K., Le Fur Y., Gretz N., Vilmen C., Pecchi E., Jubeau M., Cozzone P. J., Stienen G. J. M., Granzier H., Labeit S., Ottenheijm C. A. C., Bendahan D., Gondin J. *In vivo* and *in vitro* investigations of heterozygous nebulin knock-out mice disclose a mild skeletal muscle phenotype. *Neuromuscular Disorders*. 2013;23(4):357–369. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.12.011.
52. Gineste C., Ottenheijm C., Le Fur Y., Banzet S., Pecchi E., Vilmen C., Cozzone P. J., Koulmann N., Hardeman E. C., Bendahan D., Gondin J. Alterations at the cross-bridge level are associated with a paradoxical gain of muscle function *in vivo* in a mouse model of nemaline myopathy. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e109066. DOI: 10.1371/journal.pone.0109066.
53. Williams J. H., Ward C. W., Klug G. A. Fatigue-induced alterations in Ca^{2+} and caffeine sensitivities of skinned muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*. 1993;75(2):586–593. DOI: 10.1152/jappl.1993.75.2.586.

54. Moldovan M., Krarup C. Evaluation of Na⁺/K⁺ pump function following repetitive activity in mouse peripheral nerve. *Journal of Neuroscience Methods*. 2006;155(2):161–171. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.12.015.
55. Hwang J. H., Kang S. Y., Jung H. W. Effects of American wild ginseng and Korean cultivated wild ginseng pharmacopuncture extracts on the regulation of C2C12 myoblasts differentiation through AMPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2022;25(6):192. DOI: 10.3892/mmr.2022.12708.
56. Kim A., Park S.-M., Kim N. S., Lee H. Ginsenoside R_c, an Active Component of *Panax ginseng*, Alleviates Oxidative Stress-Induced Muscle Atrophy via Improvement of Mitochondrial Biogenesis. *Antioxidants*. 2023;12(8):1576. DOI: 10.3390/antiox12081576.
57. Estaki M., Noble E. G. North American ginseng protects against muscle damage and reduces neutrophil infiltration after an acute bout of downhill running in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2014;40(2):116–121. DOI: 10.1139/apnm-2014-0331.
58. Cristina-Souza G., Santos-Mariano A. C., Lima-Silva A. E., Costa P. L., Domingos P. R., Silva S. F., Abreu W. C., De-Oliveira F. R., Osiecki R. *Panax ginseng* Supplementation Increases Muscle Recruitment, Attenuates Perceived Effort, and Accelerates Muscle Force Recovery After an Eccentric-Based Exercise in Athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2022;36(4):991–997. DOI: 10.1519/JSC.0000000000003555.
59. Zhang H., Zhao C., Hou J., Su P., Yang Y., Xia B., Zhao X., He R., Wang L., Cao C., Liu T., Tian J. Red ginseng extract improves skeletal muscle energy metabolism and mitochondrial function in chronic fatigue mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1077249. DOI: 10.3389/fphar.2022.1077249.
60. Ahmad S. S., Chun H. J., Ahmad K., Choi I. Therapeutic applications of ginseng for skeletal muscle-related disorder management. *Journal of Ginseng Research*. 2024;48(1):12–19. DOI: 10.1016/j.jgr.2023.06.003.
61. Van Le T. H., Lee G. J., Long Vu H. K., Know S. W., Nguyen N. K., Park J. H., Nguyen M. D. Ginseng Saponins in Different Parts of *Panax vietnamensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;63(11):950–954. DOI: 10.1248/cpb.c15-00369.
62. Jeong J.-J., Van Le T. H., Lee S.-Y., Eun S.-H., Nguyen M. D., Park J. H., Kim D.-H. Anti-inflammatory effects of vinalginsenoside R₂ and majonoside R₂ isolated from *Panax vietnamensis* and their metabolites in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*. 2015;28(1):700–706. DOI: 10.1016/j.intimp.2015.07.025.
63. Tran Q. L., Adnyana I. K., Tezuka Y., Harimaya Y., Saiki I., Kurashige Y., Tran Q. K., Kadota S. Hepatoprotective effect of majonoside R₂, the major saponin from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta Medica*. 2002;68(5):402–406. DOI: 10.1055/s-2002-32069.
64. Thu V. T., Yen N. T. H., Tung N. H., Bich P. T., Han J., Kim H. K. Majonoside-R₂ extracted from Vietnamese ginseng protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via modulating mitochondrial function and biogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2021;36:127814. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127814.
65. Chan H.-H., Hwang T.-L., Bhaskar Reddy M. V., Li D.-T., Qian K., Bastow K. F., Lee K.-H., Wu T.-S. Bioactive constituents from the roots of *Panax japonicus* var. *major* and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds. *Journal of Natural Products*. 2011;74(4):796–802. DOI: 10.1021/np100851s.
66. Yousuf Y., Datu A., Barnes B., Amini-Nik S., Jeschke M. G. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1):18. DOI: 10.1186/s13287-019-1480-x.
67. Kang M. J., Moon J. W., Lee J. O., Kim J. H., Jung E. J., Kim S. J., Oh J. Y., Wu S. W., Lee P. R., Park S. H., Kim H. S. Metformin induces muscle atrophy by transcriptional regulation of myostatin via HDAC6 and FoxO3a. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021;13(1):605–620. DOI: 10.1002/jcsm.12833.
68. Walton R. G., Dungan C. M., Long D. E., Tuggle S. C., Kosmac K., Peck B. D., Bush H. M., Villasante Tezanos A. G., McGwin G., Windham S. T., Ovalle F., Bamman M. M., Kern P. A., Peterson C. A. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13039. DOI: 10.1111/acer.13039.
69. Sokolova A. V., Klimova A. V., Dragunov D. O., Arutyunov G. P. Effect of metformin therapy on muscle mass and strength in patients with and without diabetes. Meta-analysis of 15 studies. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(3):4331. (In Russ.) DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4331.
70. Deacon R. M. J. Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(76):2610. DOI: 10.3791/2610.
71. Sharma A. N., Elased K. M., Garrett T. L., Lucot J. B. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiology & Behavior*. 2010;101(3):381–388. DOI: 10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
72. Prikhodko V. A., Matuzok T. M., Okovityi S. V. Cognitive and behavioural dysfunction in leptin-resistant mice. In: Proceedings of the 29th International Annual ISBS “Stress and Behavior” Neuroscience and Biological Psychiatry Conference. 18-19 May 2023. Saint Petersburg. 2023. P. 18.
73. De Gregorio C., Contador D., Campero M., Ezquer M., Ezquer F. Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Biology Open*. 2018;7(9):bio036830. DOI: 10.1242/bio.036830.
74. Roberts T. J., Gabaldón A. M. Interpreting muscle function from EMG: lessons learned from direct measurements of muscle force. *Integrative and Comparative Biology*. 2008;48(2):312–320. DOI: 10.1093/icb/icn056.
75. Ingalls C. P., Warren G. L., Lowe D. A., Boorstein D. B., Armstrong R. B. Differential effects of anesthetics on in vivo skeletal muscle contractile function in the mouse. *Journal of Applied Physiology*. 1996;80(1):332–340. DOI: 10.1152/jappl.1996.80.1.332.
76. Coelho Nepomuceno A., Landucci Politani E., Landucci Politani da Silva E., Salomone R., Losso Longo M. V., Grassi Salles A., Marques de Faria J. C., Gemperli R. Tibial and fibular nerves evaluation using intraoperative electromyography in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2016;31(8):542–548. DOI: 10.1590/S0102-865020160080000007.
77. Hershenson M., Brouillette R. T., Olsen E., Hunt C. E. The effect of chloral hydrate on genioglossus and diaphragmatic activity. *Pediatric Research*. 1984;18(6):516–519. DOI: 10.1203/00006450-198406000-00006.
78. Zealear D., Li Y., Huang S. An Implantable System For Chronic In Vivo Electromyography. *Journal of Visualized Experiments*. 2020;21(158):10.3791/60345. DOI: 10.3791/60345.