



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

Promocijas darba
kopsavilkums

Summary of
Doctoral Thesis

Ilona Vanaga

SKUJUKOKU POLIPRENOLU
FORMULĒJUMU
TERAPEITISKAIS POTENCIĀLS
STATĪNU IZRAISĪTAS MUSKUĻU
MIOPĀTIJAS MAZINĀŠANĀ

THERAPEUTIC POTENTIAL OF CONIFER-
DERIVED POLYPRENOL FORMULATIONS
IN MITIGATING STATIN-INDUCED
MUSCLE MYOPATHY

Rīga 2026



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

MEDICĪNAS UN DZĪVĪBAS ZINĀTŅU FAKULTĀTE

Ilona Vanaga

**SKUJUKOKU POLIPRENOLU
FORMULĒJUMU
TERAPEITISKAIS POTENCIĀLS
STATĪNU IZRAISĪTAS MUSKUĻU
MIOPĀTIJAS MAZINĀŠANĀ**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

zinātnes doktora grāda iegūšanai medicīnas bāzes zinātņu,
tai skaitā farmācijas nozarē,
farmaceitiskās farmakoloģijas apakšnozarē

Rīga 2026

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātē, Medicīnas un dzīvības zinātņu fakultātē (bijušajā Medicīnas fakultātē, Farmakoloģijas katedrā) Rīgā, Latvijā, laika posmā no 2016. līdz 2025. gadam.

Promocijas darbs sastāv no 8 nodaļām.

Promocijas darba forma: disertācija medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas nozarē, farmaceitiskās farmakoloģijas apakšnozarē.

Vadītāja: *Dr. med.*, prof. **Baiba Jansone**, Latvijas Universitāte.

Konsultante: *Dr. habil. biol.*, prof. **Ruta Muceniece**, Latvijas Universitāte.

Recenzenti:

- 1) *Dr. med.*, professore **Una Riekstiņa**, Latvijas Iniversitāte.
- 2) *Dr. pharm.*, professore **Dace Bandere**, Rīgas Stradiņa Universitāte.
- 3) *Dr. sc. (Tech.)*, vecākais pētnieks **Risto I. Korpinen**, Somijas Dabas resursu institūts (Natural Resources Institute Finland (Luke)).

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Latvijas Universitātes Medicīnas un veselības zinātņu promocijas padomes atklātā sēdē _____.

Šis promocijas darbs pieņemts aizstāvēšanai medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai 2026. gada _____ Latvijas Universitātes Medicīnas un veselības zinātņu promocijas padomē.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

Promocijas padomes priekšsēdētājs _____/
Dr. med., profesors **Valdis Pīrāgs**

Promocijas padomes sekretāre _____/
Dr. biol., asociētā profesore **Līga Plakane**

© Latvijas Universitāte, 2026

© Ilona Vanaga, 2026

ISBN 978-9934-36-566-9

ISBN 978-9934-36-567-6 (PDF)

ANOTĀCIJA

Poliprenoli ir garo ķēžu izoprēnsipirti, kas bagātīgi sastopami, piemēram, *Abies sibirica* (sibīrijas baltegles) un *Picea abies* (parastās egles) skužās. Pēc enzimātiskas reducēšanās par doliholiem, tie uztur olbaltumvielu N-glikozilēšanu, modulē membrānu plūstamību un samazina lipīdu peroksidāciju. Inhibējot 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzīma A (HMG-KoA) reduktāzi, statīni samazina endogēnos doliholus un CoQ₁₀; doliholu deficīts traucē N-glikozilēšanu un destabilizē muskuļu membrānas, savukārt CoQ₁₀ (ubihinona) deficīts mazina mitohondriju adenozintrifosfāta (ATP) veidošanos un antioksidatīvo aizsardzību – mehānismi, kas saistīti ar statīnu izraisītu miopātiju (SIM). Tādēļ pārbaudījam, vai perorāli lietoti skujkoku poliprenoli (doliholu prekursori) paši un kopā ar papildinošo CoQ₁₀ spēj atjaunot mevalonāta ceļa produktus un tādējādi mazināt SIM.

Ķīmiski-analitiskie pētījumi 80 % attīrītā sibīrijas baltegles ekstraktā uzrādīja desmit poliprenola homologus (Pren-11 → Pren-20), no kuriem dominējošais bija Pren-15 (~ 37 %). Izmantojot modificētu etanola injekcijas metodi, skuju ekstraktu izdevās izķīdināt fosfatidilholinā, iegūstot vienfāzes šķīdumu, kas satur multilamellāras liposomas (modālais diametrs 1,3 μm, > 70 % iekapsulēšanās efektivitāte, sešu mēnešu stabilitāte). Liposomu forma tika izstrādāta ar mērķi uzlabot poliprenolu vājo perorālo biopieejamību.

In vivo pētījumā egļu skuju poliprenoli (1, 10, 20 mg/kg dienā) novērsa atorvastatīna inducētu satvēriena spēka zudumu žurkām, neietekmējot to uzvedību vai plazmas holesterīna līmeni, savukārt atsevišķs imobilizācijas stresa modelis parādīja telpiskās atmiņas saglabāšanos un kortikosterona normalizēšanos.

Pirmajā atklātajā klīniskajā pilotpētījumā (n = 11) pacientiem ar apstiprinātu SIM astoņas nedēļas perorāli tika doti poliprenoli 4 mg dienā un CoQ₁₀ 100 mg dienā. Muskuļu sāpju un vājuma rādītāji samazinājās attiecīgi par 50 % un 40 %; četri dalībnieki apsvēra statīna devas paaugstināšanu. Laboratoriskie asins parametri saglabājās normas robežās, apliecinot labu panesamību; tomēr interpretāciju ierobežo neliels pacientu skaits un placebo kontroles trūkums.

Kopumā veiktie pētījumi parāda, ka skujkoku poliprenoli ir racionāls papildinājums statīnu terapijai: tie spēj atjaunot doliholu rezerves, uzlabo antioksidatīvo aizsardzību un, formulējot liposomās, sasniedz labāku biopieejamību. Šie rezultāti pamato randomizēta placebo kontrolēta pētījuma nepieciešamību, lai apstiprinātu klīnisko efektivitāti un noteiktu optimālo poliprenolu devu.

Atslēgvārdi: poliprenoli; doliholi; statīnu inducēta miopātija; mevalonāta vielmaiņas ceļš; liposomāla piegāde; terapeitiskā biopieejamība

SATURS

SATURS	4
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	8
1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS	13
1.1. Pētījuma problēma	13
1.2. Hipotēze	13
1.3. Poliprenoli: avoti, ķīmiskās īpašības un bioloģiskā nozīme	14
2. MATERIĀLI UN METODEDES	18
2.1. Poliprenolu analīze un kvantifikācija	18
2.1.1. UHPLC analīze	18
2.1.2. Paraugu sagatavošana UHPLC analīzei	18
2.1.3. Apgrieztās fāzes UHPLC analīze	18
2.1.4. Poliprenolu identifikācija ar TOF LC/MS	19
2.1.5. Proliposomāla poliprenolu šķīduma sagatavošana	19
2.1.6. Poliprenolu šķīdības noteikšana	19
2.1.7. Poliprenolu iekapsulācijas efektivitāte liposomās	19
2.1.8. Poliprenolu noteikšana liposomās ar HPLC	19
2.1.9. Paraugu sagatavošana mikroskopijai	20
2.1.10. Poliprenolus saturošu liposomu izmēru sadalījums	20
2.2. <i>In vivo</i> dzīvnieku eksperimenti	20
2.2.1. <i>In vivo</i> dzīvnieku eksperimentiem izmantotās vielas	20
2.2.2. Eksperimentālie dzīvnieki	20
2.2.3. Dzīvnieku eksperimentu ētika	20
2.2.4. Eksperimenta dizains	20
2.2.5. <i>In vivo</i> uzvedības metodes	21
2.2.6. Bioķīmiskā analīze	22
2.2.7. Statistiskā analīze	22
2.3. Poliprenolu drošuma un efektivitātes pilotpētījums	22
2.3.1. Dizains un pacienti	22
2.3.2. Datu vākšana	23
2.3.3. Statistiskā analīze	23
3. REZULTĀTI	24
3.1. Poliprenolu analīzes un kvantifikācijas rezultāti	24
3.1.1. Sibīrijas baltegles (<i>Abies sibirica</i> L.) poliprenolu homologu identifikācija	24

3.1.2. Šķīdība etanola/lecitīna sistēmās un PP iekapsulēšanās efektivitāte	25
3.1.3. Poliprenoliem pildītu liposomu morfoloģiskie novērojumi	27
3.2. Egles skuju poliprenolu pētījumi žurkās	28
3.2.1. Muskuļu spēks/tonuss un koordinācija	28
3.2.2. Vispārējā lokomotorā aktivitāte	29
3.2.3. Mācīšanās/atmiņa	30
3.2.4. Pretsāpju aktivitāte	30
3.2.5. Plazmas holesterīns un kreatīnkināze (CK)	31
3.3. Poliprenolu drošums un efektivitāte (pilotpētījums)	32
3.3.1. Sākotnējās raksturojuma iezīmes	32
3.3.2. Drošums	34
3.3.3. Muskuļu simptomi	36
3.3.4. Dinamometrija, slodzes tests un fiziskās aktivitātes	37
4. DISKUSIJA	39
4.1. Skujkoku poliprenolu bioķīmiskā raksturošana (raksts I)	40
4.2. Formulēšanas stratēģijas lipofilajiem poliprenoliem (raksts I) ..	40
4.3. Liposomālās poliprenolu piegādes sistēmas izstrāde (raksts I) ..	40
4.4. Poliprenolu liposomu optimizācijas turpmākie virzieni	40
4.5. Plašāks poliprenolu farmakoloģiskais potenciāls	41
4.6. Klīniskā izvērtēšana (raksts III)	42
4.7. Poliprenoli, statīni un CoQ ₁₀ : terapeitiskais krustpunkts	42
4.8. Pētījuma ierobežojumi	42
4.9. Pētījumu nepilnības un turpmākie pētījumi	43
4.10. Noslēguma piezīmes	43
5. SECINĀJUMI	44
5.1. Paveikta ķīmiskā raksturošana	44
5.2. Izstrādāta inovatīva liposomāla piegādes forma	44
5.3. Preklīniskā efektivitāte žurku SIM modelī	44
5.4. Pirmreizējs drošuma novērtējums cilvēkiem un koncepta pierādījums	44
5.5. Stratēģiskās terapeitiskās implikācijas	45
5.6. Turpmāko pētījumu virzieni	45
6. PATEICĪBAS	46
REFERENCES	96

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ADP	adenozīna difosfāts	AKT	proteīnkināze B
ALAT	alanīnaminotransferāze	AP	sārmainā fosfatāze
ASAT	aspartātamīnotransferāze	AT	atorvastatīns
ATP	adenozīna trifosfāts	BACE1	β-APP šķeļošie enzīmi 1
bpm	sitieni minūtē	CABG	koronārās artērijas šuntēšanas operācija
CDP-ribitol	citidīna difosfāta ribitols	CDP	citidīna difosfāts
CK	kreatīnkināze	CoQ10	koenzīms Q10 (ubihinons)
CRP	C-reaktīvais proteīns	DAD	diodes masīva detektors
DBP	diastoliskais asinsspiediens	DOLK	dolihola kināze
Dol-P	doliholfosfāts	EA	etilacetāts
DPM	dolihol-fosfāta manosilsintāze	ECG	elektrokardiogramma
FT3	brīvais trijodtironīns	ESI	elektrospreja jonizācija
GCT	germinālo šūnu audzējs	FT4	brīvais tiroksīns
GGOH	geranilgeraniols	GFR	glomerulārās filtrācijas ātrums
GPI	glikozilfosfatidilinozitols	GGT	gamma-glutamīltransferāze
GSHP	glutaciona peroksidāze	GSH	glutations
HIV	cilvēka imūndeficīta vīruss	HDL	augsta blīvuma lipoproteīns
HPLC	augstas veiktspējas šķidrums hromatogrāfija	HMG-CoA	metilglutaril-koenzīms A
IPP	izopentēnilpirofosfāts	HRMS	augstas izšķirtspējas masas spektrometrija

LC/MS	šķidrums hromatogrāfija- masas spektrometrija	LDL	zema blīvuma lipoproteīns
LDL-C	zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns	MLV	multilamelārie vezikulas
MDA	malondialdehīds	mTOR	rapamicīna mehāniskais mērķis (kināze mTOR)
MS	masspektrometrija	NLCs	nanostrukturētie lipīdu nesēji
NO	slāpekļa oksīds	PCSK9	proteīnu konvertāze subtilizīns/keksīns 9
PCI	perkutānā koronārā intervence	PP(s)	poliprenols(-i)
PDI	polidispersitātes indekss	Pren	poliprenolu homoloģu apzīmējums
PLGA	poli(pienskābes- ko-glikolskābes) polimērs	rpm	apgriezieni minūtē
PVD	Pārtikas un veterinārais dienests (Latvija)	SIM	statīnu inducēta miopātija
SLNs	cietie lipīdu nanodaļiņas	SOD	superoksīda dismutāze
SRD5A3	steroīdu 5-alfa reduktāze 3	TLC	pānslāņa hromatogrāfija
TEM	transmisijas elektronu mikroskopija	TOF	lidojuma laika (Time- of-Flight) metode
TSH	vairogdziedzeri stimulējošais hormons	25OH-D	25-hidroksivitamīns D
UHPLC	ultraaugstas veiktspējas šķidrums hromatogrāfija		

IEVADS

Statīnu terapija joprojām ir aterosklerotisko sirds un asinsvadu slimību profilakses stūrakmens, tomēr tās ilgtermiņa efektivitāti mazina statīnu inducēta miopātija (SIM), kas bieži kļūst par devas samazināšanas vai terapijas pārtraukšanas iemeslu. Pieaug pierādījumu skaits, kas SIM saista ar mevalonāta ceļa sekundāru inhibīciju, kā rezultātā tiek samazināts ne vien holesterīna, bet arī būtisko izoprenoīdu daudzums, kuri nodrošina mitohondriju bioenerģētiku un proteīnu N-glikozilāciju. Šajā kontekstā augu izcelsmes poliprenoli-garķežu izoprenoīdu spirti, kas bagātīgi sastopami skujkokos un ir doliholu prekursori, piedāvā ar biomehānismiem pamatotu iespēju atjaunot no dolihola atkarīgo glikoproteīnu biosintēzi. Komplementāra koenzīma CoQ₁₀ lietošana veido papildinošu stratēģiju, kas vērsta uz muskuļu funkcijas saglabāšanu, neapdraudot lipīdu līmeņa pazemināšanas efektu.

Šis promocijas darbs veido pārejas loku no ķīmijas līdz klīnikai. Pirmkārt, darbā noteikts reproducējams skujkoku poliprenolu ķīmiskas “pirkstu nospiedums” (Pren-11 → Pren-20, dominē Pren-15), izveidojot analītisko pamatu kvalitātes kontrolei un dozēšanai. Otrkārt, darbs risina poliprenolu hidrofobitātes problēmu, izstrādājot ar fosfatidilholīnu bagātu, etanola injekcijas metodē balstītu liposomu formu, kas nodrošina augstu inkapsulācijas pakāpi un piemērotību perorālai lietošanai. Treškārt, žurku modelī ar lielu devu atorvastatīna izraisītu miopātiju poliprenoli novērš snieguma pasliktināšanos žurkām stieņa karāšanās un satvēriena spēka testos, neuzrādot uzvedības izmaiņas un neietekmējot holesterīna līmeni, kas parāda dolihola krājumu atjaunošanu. Visbeidzot, izpētes rakstura astoņu nedēļu pirmais pilotpētījums cilvēkos pacientiem ar verificētu SIM izvērtē ikdienas poliprenolu lietošanu kombinācijā ar CoQ₁₀, parādot labu panesību, klīniski nozīmīgu sāpju un muskuļu vājuma vērtējumu samazinājumu un ļaujot daļai dalībnieku apsvērt statīnu devas paaugstināšanu. Kopumā šie pētījumi pozicionē skujkoku izcelsmes poliprenolus, atsevišķi un kopā ar CoQ₁₀, kā daudzsoļu papildterapiju statīnu panesības uzlabošanai, pamato II fāzes randomizētu klīnisko pētījumu uzsākšanu un paver plašākas iespējas tādu traucējumu terapijām, kuriem raksturīga izoprenoīdu nepietiekamība.

PROMOCIJAS DARBA MĒRĶI UN UZDEVUMI

Promocijas darba mērķis

Pierādīt, ka skujkoku izcelsmes poliprenoli – veicot to ķīmisko raksturošanu, liposomu formulēšanu, pirmsklīniskās efektivitātes pētījumu un klīnisko pilotpētījumu – spēj atjaunot mevalonāta ceļa atkarīgos starpproduktus un kalpot kā drošs un efektīvs papildterapijas līdzeklis statīnu terapijai raksturīgo ar muskuļiem saistīto blakņu (SIM) mazināšanai.

Promocijas darba uzdevumi:



- 1) Noteikt skujkoku poliprenolu ķīmisko profilu
 - izolēt un kvantificēt atsevišķos homologus (Pren-11 → Pren-20) no *Abies sibirica* un *Picea abies*, izmantojot UHPLC-DAD-MS, lai noteiktu frakcijas tīrību, prenoļu ķēdes garumu sadalījumu un dominējošos homologus.
- 2) Optimizēt poliprenolu perorālās ievadīšanas formu
 - izstrādāt uz fosfatidilholīna bāzes veidotas multilamelāras liposomas, izmantojot modificēto etanola injekcijas metodi; noteikt daļiņu izmēru, inkapsulācijas efektivitāti un stabilitāti.
- 3) Demonstrēt pirmsklīnisku efektivitāti pret statīnu inducētu miopātiju
 - žurku modeli ar augstas devas atorvastatīna saņemšanu novērtēt poliprenolu (1, 10, 20 mg/kg/dienā) aizsargefektu uz muskuļu spēku un uzvedības rādītājiem; noteikt seruma kreatīnkināzi, holesterīnu un ar stresu saistītos biomarķierus, lai raksturotu potenciālos iedarbības mehānismus.
- 4) Iegūt pirmos cilvēku drošuma un koncepta apstiprinājuma datus
 - veikt astoņu nedēļu atklātu pilotpētījumu pacientiem ar apstiprinātu SIM, lietojot poliprenolus 4 mg/dienā kopā ar CoQ₁₀ 100 mg/dienā; reģistrēt izmaiņas sāpju un muskuļu vājuma vērtējumos, gatavībā paaugstināt statīna devu un laboratoriskajos drošuma rādītājos.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

- 1) Mēs pirmoreiz parādām, ka eksogēni skujkoku izcelsmes poliprenoli spēj atjaunot dolihola rezervi, kas sekundāri izsīkst statīnu izraisītas mevalonāta ceļa blokādes dēļ. Žurku SIM modeļos šī bioķīmiskā “glābšana” pārtop pilnīgā satvēriena spēka un uz stieņa karāšanās laika normalizācijā, neraugoties uz lielu atorvastatīna devu.
- 2) Mēs izstrādājam jaunu metodi, kuras pamatā ir līdzšķīdināšana un modificēta etanola injekcijas pieeja etanola-fosfolipīdu sistēmā (multilamelāras liposomas), nodrošinot uzlabotu stratēģiju hidrofobu bioaktīvu savienojumu,

īpaši poliprenolu, iekapsulēšanai. Šī tehnoloģiskā pieeja uzlabo poliprenolu biopieejamību, tādējādi pārvarot tradicionālos ierobežojumus, kas saistīti ar vāju uzsūkšanos un šķīdību kuņģa-zarnu traktā.

- 3) Mūsu pirmais pilotpētījums uz cilvēkiem parāda, ka astoņu nedēļu ikdienas poliprenolu (4 mg) + CoQ₁₀ (100 mg) lietošana rezultējās ar 50 % muskuļu sāpju vērtējuma samazinājumu un ļāva 40 % simptomātisko pacientu apsvērt statīna devas palielināšanu; laboratoriskajos drošuma rādītājos un neuro-uzvedības izmaiņās novirzes nekonstatēja. Tas pamato poliprenolu preparātu kā reālistisku ilgtermiņa papildterapiju statīnus nepanesošiem pacientiem un placebo kontrolētu II fāzes pētījumu.
- 4) Tā kā poliprenoli (i) atjauno no dolihola atkarīgo glikozilāciju, (ii) stabilizē membrānu lipīdus un (iii) darbojas kā ķēdes garumam selektīvi antioksidanti, tie var būt daudzveidīgi pielietojami savienojumi. Darbā izstrādātā liposomu tehnoloģija ļauj tos iekapsulēt perorālos uztura bagātinātājos un standartizētās medikamentu formulācijās, kuru mērķis ir ne vien statīnu inducētas miopātijas (SIM), bet arī jebkura stāvokļa ar mevalonāta ceļa nepietiekamību vai oksidatīvu membrānu stresu (piem., ar vecumu saistīta sarkopēnija, nealkoholiskā taukainā aknu slimība) kupēšana.

<p>“SuperCell® HEPA” poliprenolus saturošas liposomu kapsulas</p> 	<p>Raksturošana un formulēšana UHPLC-HRMS: Pren-11...20 (dominē Pren-15) Etanola injekcijas fosfatidilholinā liposomas: FH ≥ 40 %, PP:PL > 1 : 15 Stabilas multilamelārās vezikulas (MLVs)</p>	<p>“Kardiopren” Poliprenola + Q₁₀ kapsulu ražošana klīniskai dozēšanai</p> 
	<p>Pirmsklīniskā efektivitāte TV 80 mg/kg → ~ 3 × ↓ karāšanās laiks stienī PP 1–20 mg/kg atjauno līdz kontroles līmenim PP 20 mg/kg ≈ 2 × kontroles karāšanās laiks; satvēriena spēks pilnībā atjaunots pie 20 mg/kg</p>	
	<p>Klīniskais pilotpētījums 8 nedēļas, atklāts dizains; PP 4 mg/dienā + CoQ₁₀ 100 mg/dienā Sāpes ↓ (p < 0,001), vājums ↓ (p = 0,018)</p>	

1. att. Grafiskais kopsavilkums.

Publikācijas

Šis promocijas darbs balstīts uz turpmāk minētajām publikācijām, kas tekstā apzīmētas ar romiešu cipariem.

Raksts I Vanaga, I., Gubernator, J., Nakurte, I., Kletnieks, U., Muceniece, R., Jansone, B. (2020) Identification of Abies sibirica L. Polyprenols

- and Characterisation of Polyphenol – Containing Liposomes. *Molecules* 25, 1801. <https://doi.org/10.3390/molecules25081801>.
- Raksts II** Jansone, B., Dzirkale, Z., Jekabsons, K., Pilipenko, V., Beitnere, U., Magure, I., Skumbins, R., Kletnieks, U., **Vanaga, I.**, Muceniece, R., Klusa, V. (2016). Spruce needle polyphenols protect against atorvastatin-induced muscle weakness and do not influence central nervous system functions in rats. *Proc. Latv. Acad. Sci., B Nat. exact appl. sci.*, 70. <https://doi.org/10.1515/prolas-2016-0003>
- Raksts III** Latkovskis, G., Saripo, V., Sokolova, E., Upite, D., **Vanaga, I.**, Kletnieks, U., Erglis, A. (2016). Pilot study of safety and efficacy of polyphenols in combination with coenzyme Q10 in patients with statin-induced myopathy. *Medicina*, 52, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2016.05.002>.

Citi raksti

Ušacka, L., Plakane, L., **Vanaga, I.**, Klētnieks, K., Jansone, B., Muceniece, R., Klētnieks, U., Pahirko L. (2022). Polyphenol liposomes improve the efficiency of oxygen usage in welltrained amateur athletes. *Proc. Latv. Acad. Sci., B Nat. exact appl. sci.*, 76 (1), 58–63.

Patenti

1. Vanaga, I., Rateniece, A., Kletnieks, U. A nutritional supplement for improvement of muscle strength and load tolerance. Latvian Patent No. LV 15 338 B. 17.04.2018.
2. I. Vanaga, U.Kletnieks. Nutritional supplement for heart health. Latvian Patent No. LV 15057 B. A23L1/30, A23L1/302, A61K36/13, A61K36/55. 20.12.2015.

Konferenču tēzes

1. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Jansone, B., Muceniece, R. Ancient survivors – conifer polyphenol studies for modern applications. 2nd Drug Discovery Conference, September 22–24, 2022, Riga, Latvia.
2. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Ancāns, J., Blāķe, I., Gubernator, J., Jansone, B. *In vitro* study to assess the safety profile of conifer needle extractives for potential topical applications. 76th University of Latvia International Scientific Conference on Medicine, February 23rd, 2018, Riga, Latvia.
3. **Vanaga, I.**, Nakurte, I., Rozenstoka, S., Steina, S., Suna, D., Kletnieks, U., Jansone, B. Characterization of *Abies Sibirica* L. needle polyphenols and safety of their liposome product in marathoners”. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Conference on Biodiversity. Athens, Greece, November 25–29, 2018.

4. **Vanaga, I.**, Ancans, J., Blake, I., Kletnieks, U., Gubernator, J. The effects of conifer polyphenol nanoemulsions on skin cell culture proliferation rate and gene expression levels of structural proteins, growth factor and inflammatory cytokines. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology . Kyoto, Japan, July 1–7, 2018.
5. **Vanaga, I.**, Gubernator, J., Kletnieks, U., Plakane, L., Plakane, L., Muceniece, R., Jansone, B. Physico-chemical characterization of polyphenol-loaded liposomes. 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets, October 19–20, 2017, Riga, Latvia. Abstract. *Intrinsic Activity*, 2017; 5(Suppl.2):A2.32. doi:10.25006/IA.5.S2-A2.32 doi:10.25006/IA.5.S2-A2.32
6. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Plakane, L., Plakane, L., Muceniece, R., Jansone, B. Development of polyphenol proliposomes. 75th Scientific Conference of the University of Latvia, February 24, 2017, Riga, Latvia.
7. **Vanaga, I.**, Nakurte, I., Korica, A. M., Polis, O., Muceniece, R., Jansone, B. Composition profiles of various conifer polyphenols. 75th Scientific Conference of the University of Latvia, February 24, 2017, Riga, Latvia.
8. **Vanaga, I.**, Nakurte, I., Jekabsons, K., Muceniece, R., Jansone, B., Klusa, V., Latkovskis, G., Saripo, V., Kletnieks, K., Kletnieks, U. Advances in research of polyphenol chemistry and biological activity. 6th Global Summit on Medicinal and Aromatic Plants, May 23–26, 2016, Riga, Latvia. Abstract book p. 18.
9. **Ilona Vanaga**, Ilva Nakurte, Ewa Swiezewska, Ausma Korica, Ugis Kletnieks, Ruta Muceniece. Separation of polyphenols isolated from *Picea abies* L. spruce needles by ultra-performance-liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry. 7th EU FP project Innovabalt and Latvian institute of organic synthesis, August 27–29, 2015, Riga, Latvia. Abstract OP53, 73.
10. Jansone, B., Dzirkale, Z., Jekabsons, K., Pilipenko, V., Beitnere, U., Skumbins, R., Kletnieks, K., **Vanaga, I.**, Muceniece, R., Klusa, V. Polyphenols isolated from *Picea abies* L. spruce needles influence atorvastatin-mediated muscle strength weakness in *Wistar* female rats. IUPHAR World Conference on the Pharmacology of Natural and Traditional Medicine, July 22–24, 2015, Singapore, Singapore. Abstract. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.* 29 (1), 113.
11. **Ilona Vanaga**, Baiba Jansone, Gustavs Latkovskis, Vita Saripo, Vija Klusa, Ruta Muceniece, Kaspars Jekabsons, Karlis Kletnieks. Polyphenol effects on blood biochemical parameters in Atorvastatin-induced myasthenia model rats and humans with statin-induced myopathies. NUGO: Mechanisms of a long-life health, September 7–9, 2015, Barcelona, Spain. Abstract book p. 133.

1. TEORĒTISKAIS PAMATOJUMS

1.1. Pētījuma problēma

Statīnu inducēta miopātija (SIM) ir viens no galvenajiem šķēršļiem ilgstošai lipīdu līmeņa pazemināšanas terapijai. Tās patoģenēzi arvien biežāk saista ar mevalonāta ceļa inhibīciju, kas nodrošina ne vien holesterīna sintēzes bloķēšanu, bet arī virknes bloķēšanu ar būtisku izoprenoīdu veidošanos, kuri nepieciešami mitohondriju bioenerģētikai un N-glikoproteīnu veidošanai. Līdz ar to šīs doktora disertācijas centrā ir leļupējie mevalonāta ceļa produkti – poliprenoli un koenzīms Q10.

Atšķirībā no CoQ₁₀, poliprenolu loma statīnu izraisītājā muskuļu patoloģijā līdz šim saņēmusi krietni mazāk uzmanības. Ņemot vērā to būtisko funkciju kā doliholu prekursoriem un to iesaisti glikoproteīnu biosintēzē, poliprenolu līmeņa samazinājums var sekmēt traucētu šūnu atjaunošanos un membrānu integritātes pavājināšanos muskuļu audos. Turklāt poliprenolu iespējamā antioksidatīvā un citoprotektīvā iedarbība liek domāt, ka to papildināšana varētu palīdzēt neitralizēt statīnu terapijas izraisīto oksidatīvo un metabolisko stresu [1], [2].

Ievēribas cienīgs ir fakts, ka poliprenolu un CoQ₁₀ kombinētais terapeitiskais potenciāls līdz šim nav ticis pētīts. Ņemot vērā, ka šie savienojumi darbojas komplementāros ceļos – viens galvenokārt sargā mitohondriju bioenerģētiku, bet otrs nodrošina pareizu proteīnu modifikāciju un membrānu stabilitāti – to lietošana varētu sniegt sinerģisku ieguvumu SIM mazināšanā.

1.2. Hipotēze

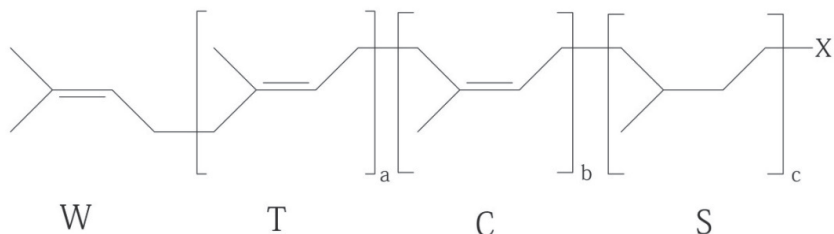
Skujkoku izcelsmes poliprenoli, formulēti perorālai uzņemšanai un, ja nepieciešams, kombinēti ar CoQ₁₀, var mazināt SIM, vienlaikus saglabājot lipīdu līmeņa pazemināšanas efektivitāti.

Šī doktora disertācija cenšas pamatot pieņēmumu, ka eksogēni, skujkoku izcelsmes poliprenoli – garķēžu izoprenoīdu spirti, kas dabiski bagātīgi sastopami *Abies sibirica* un *Picea abies* skujās – var *in vivo* pārveidoties par doliholiem un atbalstīt N-glikozilāciju un membrānu integritāti skeleta muskulī. Problēma nav tikai bioķīmiska: poliprenoli ir izteikti hidrofobi, tiem ir minimāla šķīdība ūdenī, un vēsturiski tiem raksturīga slikta perorālā biopieejamība. Tāpēc mūsu pētījums apvieno analītisko ķīmiju, formulācijas tehnoloģiju (ar fosfatidilholīnu bagātas liposomas), kontrolētu žurku SIM modeli un izpētes klīnisko pētījumu pacientiem ar verificētu SIM, lai pārbaudītu mehānistiskās un translācijas hipotēzes [2], [3], [4], [5], [6], [7].

Disertācija sniedz sekojošu zinātnisko ieguldījumu: (i) reproducējamu skujkoku poliprenolu analītisko “pirkstu nospiedumu”, ko raksturo dominējošā Pren-15 suga (~ 37 % no kopējā sastāva), kas ļauj nodrošināt kvalitātes kontroli un pamatot devu; (ii) etanola injekcijas/līdzšķīdināšanas stratēģiju, kas atkarājami veido multilamelārās liposomas un pārvar uzsūkšanās barjeras; (iii) devas atkarīgu muskuļu spēka atjaunošanu atorvastatīna modeli, neietekmējot uzvedības rādītājus; un (iv) pirmos cilvēku datus par ikdienas poliprenolu 4 mg/dienā + CoQ₁₀ 100 mg/dienā lietošanas īstenojamību un panesību pacientiem ar verificētu SIM [5], [6], [7], [8].

1.3. Poliprenoli: avoti, ķīmiskās īpašības un bioloģiskā nozīme

Poliprenoli ir plaši sastopami dabīgi garķēžu izoprenoīdu spirti, kas atrodami visā augu valsts pārstāvju lokā; īpaši bagātīgi tie ir skujkoku kokos, piemēram, *Picea abies* (parastā egle) un dažādas priedes sugas [9], bet arī *Ginkgo biloba*. Kā redzams 2. attēlā, poliprenoli sastāv no vairākiem izoprena vienību blokiem, un to ķēdes garums būtiski variē atkarībā no auga avota – parasti no ~ 15 līdz pat vairāk nekā 100 izoprena vienībām [4], [10]. Poliprenoli sastopami vairākās formās: kā brīvie spirti, kā karboksilskābju esteri un kā fosfāti [10].



2. att. Poliisoprenoīdu spirtu un to fosfātu vispārīgā formula. W, x-izoprena vienība; T, trans-izoprena vienība; C, cis-izoprena vienība; S, 2,3-dihidroizoprena vienība; a, b un c attiecīgi apzīmē T, C un S izoprena vienību skaitu; S = 0 (poliprenoliem) vai 1 (2,3-dihidropoliprenoliem); X = OH poliprenoliem un dihidropoliprenoliem (doliholiem); X = -O-PO₃²⁻ poliprenilfosfātiem un 2,3-dihidropoliprenil (dolihil) fosfātiem. Pielāgots pēc (Pronin u.c., 2014). [2]

Strukturālā atšķirība starp poliprenoliem (α-nepiesātināti) un doliholiem (α-piesātināti) ir būtiska un atspoguļojas to bioloģiskajās funkcijās [11], [12]. Izoprenoīdi ir lipofili, kas veicina to spēju iekļauties lipīdu membrānās un ietekmēt membrānu plūstamību (fluiditāti) [13].

Izvēlētās ekstrakcijas metodes vērstas uz izoprensirtu ķēdes integritātes un bioaktivitātes saglabāšanu. Superkritiskā CO₂ (SC-CO₂) pielietošana nodrošina

augstas tīrības, šķīdinātājus nesaturošu materiālu, kas ir piemērots izmantošanai farmaceitiskās formulācijās, taču par augstākām kapitālizmaksām [9], [14], [15].

Tradicionālā cietās fāzes-šķīdinātāja ekstrakcija ir pielietojama un mērogojama, taču līdzizvelk piemaisījumus un prasa apjomīgu šķīdinātāja iztvaicēšanu/nodalīšanu [16]. Procesa intensifikācijas pieejas – ultraskaņas un mikroviļņu asistētā ekstrakcija, kā arī šķīduma ekstrakcija pie paaugstināta spiediena – saīsina cikla laikus un samazina šķīdinātāja patēriņu, taču prasa rūpīgu kontroli, lai izvairītos no termiskās degradācijas [17], [18], [19]. Enzīmu asistētā ekstrakcija uzlabo selektivitāti maigas apstrādes apstākļos, savukārt jonu šķīdumu sistēmas piedāvā regulējamu solvatāciju, taču par augstākām izmaksām, kā arī potenciālām ar likumisko produktu regulēšanu saistītām problēmām [20], [21]. Metodes izvēli nosaka līdzsvars starp iegūstamā materiāla tīrības pakāpi, ražīgumu, ekoloģiskie apsvērumi un izmaksas; farmaceitiskas kvalitātes līmeņa materiāla iegūšanai priekšroka parasti tiek dota SC-CO₂ ekstrakcijai.

Ginkgo biloba lapās atrodami gan poliprenoli, gan flavonoīdi un terpenoīdi, kas kopā sniedz antioksidatīvu, pretiekaisuma, neiroprotektīvu un hepatoprotektīvu iedarbību [2], [22], [23]. Skujkoku izcelsmes poliprenoli līdzīgi uzrāda plašu bioloģisko aktivitāti: preparātos no *Pinus massoniana* tie palielināja kopējo antioksidatīvo kapacitāti un galveno enzīmu (SOD, GSH-Px) aktivitāti, vienlaikus pazeminot MDA, NO un BACE1; šo biomarkieru izmaiņas atbilst neiroprotekcijai pret oksidatīvu un iekaisuma iedarbību [24]. Papildus tiešai antioksidatīvai iedarbībai poliprenoli uzrāda antibakteriālu aktivitāti un imunomodulējošu ietekmi, tostarp interferonu ekspresijas palielināšanu un iedzimtās imunitātes šūnu aktivāciju; fosfāta frakcijām aprakstīta arī pretvīrusu aktivitāte [2], [9], [25], [26].

Dzīvniekiem un cilvēkiem uzturā uzņemtie poliprenoli nonāk stingri regulētā vielmaiņas tīklā, kura centrs ir endoplazmatiskais tīklojums. Poliprenoli tiek pagarināti ar cis-preniltransferāzēm no IPP (mevalonāta ceļš), veidojot sugai raksturīgus ķēdes garumus, kas ietekmē šķīdību, membrānas enkurošanos un enzīmu atpazīšanu [27]. Poliprenolu reduktāze (kodēta ar SRD5A3) piesātina terminālo α -izoprena vienību, veidojot doliholus, kurus tālāk fosforilē par doliholfosfātu – neaizstājamu lipīdu nesēju N-saistītajai glikozilācijai un GPI enkura biosintēzei [4], [11], [28], [29]. Šīs redukcijas traucējumi (piemēram, SRD5A3 mutācijas) izraisa poliprenolu uzkrāšanos ar sekundāru dolihola deficītu un iedzimus glikozilācijas traucējumus, uzsverot procesa klinisko nozīmīgumu [4], [27]. Tādējādi izoprenoīdu ķēdes garums un piesātinājuma pakāpe modulē mijiedarbību ar glikozilācijas sistēmu un līdz ar to ietekmē tālāko glikoproteīnu veidošanās efektivitāti.

Poliprenolu un to fosfātu atvasinājumu funkcionālais spektrs aptver: proteīnu apstrādi (kofaktori N-/O-glikozilācijai; iespējamās lomas proteīnu prenilācijā); ar lipīdiem saistīto cukuru transportu; antioksidatīvo aizsardzību;

neiro- un hepatoprotekciju; imunomodulāciju/pretvīrusu iedarbību; lipīdu līmeņa pazemināšanu (t. sk. sinerģiju ar β -sitosterolu zarnu sterīnu uzsūkšanās ierobežošanai); pretiekaisuma iedarbību, inhibējot 5-lipoksigenāzi un samazinot citokīnu ekspresiju; kā arī papildinošu onkoloģisku aktivitāti (apoptozes inducēšana; uzlabota zāļu piegāde liposomu formā) [2], [22], [25], [26], [30], [31], [32], [33], [34], [35], [36], [37], [38]. Lai gan biomehānismu un pirmsklīniskie dati ir pārlicinoši, klīniskie pierādījumi visstiprāk pierāda glikozilācijas atbalsta un antioksidatīvās iedarbības aspektus; lipīdu līmeņa pazemināšanas un imūnās atbildes iznākumu apstiprināšanai nepieciešami plašāki pētījumi.

Piegādes tehnoloģijas risina zemo šķīdību ūdenī un membrāncentriskos mērķus. Liposomas (visnobriedušākā platforma) iekļauj poliprenolus dubultslāņos, aizsargā tos no oksidācijas un nodrošina mērķētu atbrīvošanu; polimēru micellas un nanoemulsijas palielina šķīdāmo šķīdību un uzsūkšanos; PLGA nanodaļiņas un SLN/NLC nodrošina oksidatīvu aizsardzību un lēnāku, ilgstošu atbrīvošanu; hidrogēli labi piemēroti ievadei caur ādu un gļotādu; transdermālās sistēmas izmanto šo savienojumu dabīgo lipofilitāti; nākamās paaudzes nanogēli/dendrimēri piedāvā precīzu izmēra un virsmas kontroli, lai gan ir izaicinājumiem ar izmaksu apmēru un regulatīvajiem aspektiem [3], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47]. Šīs disertācijas kontekstā liposomas nodrošināja >70 % inkapsulāciju un sešu mēnešu stabilitāti, apliecinot translācijas darba īstenojamību.

Izoprenoīdu saistība ar muskuļu bioloģiju izriet no doliholfosfāta atkarīgās glikozilācijas ass un membrānu homeostāzes. Doliholfosfāts ir būtisks oligosaharīdu izveidošanā, kas nepieciešami strukturālo un signālproteīnu glikozilēšanai. Skeleta muskulī α -distroglikānam ir vajadzīga pareiza ar O-mannožēm bagāta glikozilācija, lai enkurotu sarkolemmas membrānu ekstracelulārajā matricā; DPM kompleksa, DOLK vai radniecīgo enzīmu defekti izraisa distroglikanopātijas ar membrānas trauslumu un progresējošu vājumu [4], [31], [48], [49]. Papildus glikānu veidošanai doliholi ir bagātīgi sastopami plazmatiskajā membrānā un Golži kompleksā, kur tie regulē membrānu dubultslāņa caurlaidību un, iespējams, veicina iedzimto antioksidatīvo aizsardzību – īpašības, kas, visticamāk, ir nozīmīgas mehāniskam spriegumam pakļautās muskuļu šķiedrās [11], [50].

Poliprenolu/doliholu krājumu samazināšana *in vitro* atdarina miopātiskos fenotipus. Statīni, ierobežojot mevalonāta ceļa produktu sintēzi, samazina prenilāciju un glikozilāciju, pavājina Akt/mTOR signālceļu un izraisa apoptozi/endoplazmatiskā tīkla (ET) stresu miocaurulēs; papildināšana ar mevalonātu vai geranilgeraniolu atjauno prenilāciju (piem., Rap1), normalizē autofāģijas marķierus un atjauno šūnu dzīvotspēju [29], [51], [52]. Cis-preniltransferāzes vai poliprenolu reduktāzes ģenētiska nomākšana/izslēgšana līdzīgi traucē mioģenēzi un glikozilāciju. [53]. *In vivo*, zebzivis DPM nomākšana izraisa hipoglikozilētu α -distroglikānu, dezorganizētas šķiedras un smagus kustību traucējumus,

uzsverot šī metabolā ceļa neizstājamību. [31]. Uzturā uzņemto poliprenolu uzsūkšanās ir ierobežota (~ 1 % vai mazāk), tomēr iekapsulēšana liposomās mēreni palielina to piegādi audiem; endogēnie dolihola krājumi saglabājas stingri regulēti, kas sarežģī mēģinājumus tos paplašināt ar uztura palīdzību [4], [54]. Līdz ar to jaunākās stratēģijas ietver gēnu terapiju glikozilācijas enzīmu korekcijai, metabolo ceļu stabilizējošu farmakoloģiju (piem., rapamicīnu fukutīna deficīta gadījumā) un substrāta papildināšanu (ribitols/CDP-ribitols), lai apietu limitējošos posmus [55], [56], [57], [58].

Novecojošos muskuļos uzkrājas dolihols – iespējams, kā adaptīva antioksidatīva atbilde. Kaloriju ierobežošana šo pieaugumu mazina un samazina oksidatīvos bojājumus, kas atbilst dolihola membrānu aizsargfunkcijai [32], [33], [59].

Lai gan tiešie ergogēnie pierādījumi par poliprenolu iedarbību ir ierobežoti, randomizētā pētījumā trenētiem sportistiem pēc poliprenolu-liposomu papildināšanas tika konstatēts uzlabots skābekļa pulss, zemāks diastoliskais asinsspiediens un palielināts sirds izviedes tilpums, kas liecina par uzlabotu sirds un asinsvadu darbības efektivitāti un lielāku noturību pret stresu slodzes laikā [60]. Šie agrīnie dati kopā ar antioksidatīvajām un membrānstabilizējošajām īpašībām pamato turpmāku poliprenolu izvērtēšanu kā papildterapiju stāvokļos ar augstu vielmaiņas slodzi vai statīnu nepanesību.

Kopsavilkumā, augu poliprenoli ir strukturāli daudzveidīgi membrānas lipīdi, kas cilvēka vielmaiņā ieiet kā dolihola prekursori, tādējādi atbalstot glikoproteīnu biosintēzi un membrānu integritāti. To antioksidatīvā, pretiekaisuma, hepato- un neiroprotektīvā, kā arī lipīdu modulējošā iedarbība – kopā ar nobriestošajām ekstrakcijas un piegādes tehnoloģijām – pozicionē tos kā daudzsoļus līdzekļus neiromuskulārām un metaboliskām indikācijām. Tomēr translācijas progress būs atkarīgs no biopieejamības ierobežojumu pārvarēšanas, ķēdes garuma specifiskās bioloģijas precīzas noskaidrošanas un pārliecinošu klīnisku pierādījumu iegūšanas, jo īpaši muskuļu veselības un ar statīniem saistītās simptomātikas jomā.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Poliprenolu analīze un kvantifikācija

Poliprenolus no parastās egles (*Picea abies* L.) un Sibīrijas baltegles (*Abies sibirica* L.) (tīrība 80–95 %) piegādāja AS “Biolat” (Salaspils, Latvija); ekstrakcija veikta saskaņā ar RU patentu Nr. 2259991. [61], [62]. *Abies sibirica* poliprenoli (PPs) tika strukturāli raksturoti un noteikta atsevišķo homoloģu kvantitāte.

Ārējie standarti ietvēra Pren-14 un P14-P18 poliprenolu maisījumu (*Pinus sylvestris*, Batch 08–10 JTC; Code 89–5170; Bioķīmijas un biofizikas institūts, Polijas Zinātņu akadēmija). Homoloģu identitāte tika apstiprināta ar augstas izšķirtspējas TOF LC/MS (Agilent 6230, ESI+) un datu apstrādi programmā MassHunter Qualitative Analyses B.05.00. Multilamelārās liposomas tika analizētas ar Nomarski optiku (Nikon Eclipse 90i) un TEM (Tesla BS 540 / JEOL 100) ar negatīvo iekrāsošanu. Visi šķidrums hromatogrāfijā izmantotie šķīdinātāji bija HPLC kvalitātes.

2.1.1. UHPLC analīze

Abies sibirica ekstraktu frakcionēja uz silikagēla kolonnas (paraugs: silikagēls 1:25–1:30) ar PE/EA (93:7), plūsmā ~ 1 piliens/s; frakcijas kontrolēja ar Silufol plānslāņa hromatogrāfiju. Apvienotā PP frakcija (tīrība 70–85 %; iznākums 0,7–0,8 % m/m) bija gaiši dzeltens, zemas viskozitātes eļļains šķidrums, nešķīstošs ūdenī/metanolā, bet šķīstošs heksānā, acetona un citos nepolāros šķīdinātājos.

2.1.2. Paraugu sagatavošana UHPLC analīzei

Krājuma šķīdumus gatavoja, izšķīdinot 1 ml PP 35 % izopropanolā/65 % metanolā istabas temperatūrā, 1 min. maisot vorteksā (2500 apgr./min) un filtrējot caur 0,45 μm neilona filtru. Kalibrācijas standartus gatavoja atsevišķi. Paraugus centrifugēja (Mikro 200R), un supernatantus injicēja HPLC-DAD-MS sistēmā. Piķu piesaistē palīdzēja P14-P18 references maisījums (*Pinus sylvestris*); identificēšana notika ar HRMS.

2.1.3. Apgrieztās fāzes UHPLC analīze

Analīzes veica ar Agilent 1290 Infinity sistēmu ar DAD detektoru un Extend-C18 kolonu (2,1 × 50 mm, 1,7 μm) 40 ± 1 °C temperatūrā; λ = 210 nm; injekcijas tilpums 0,5 μL. Pārvietotājs: A = izopropanols, B = metanols; plūsmas ātrums 0,22 ml/min. Elūcija: 35 % A/65 % B (0–1,5 min) → 75 % A/25 % B

(1,5–10 min), turēt līdz 25 min → 45 % A/55 % B (25–30 min) → atkārtota līdzsvarošana 35 % A/65 % B (30–32 min) [8].

2.1.4. Poliprenolu identifikācija ar TOF LC/MS

Avots: žāvēšanas gāze 10 l/min pie 325 °C; fragmentatora spriegums 130 V; m/z 100–2000; iekšējās masas references m/z 121.050873 un 922.009798 (G1969-85001). Kvantifikācijai izmantoja ārējo standartu Pren-14 un P14-P18 maisījumu. Kalibrēšanu veica, salīdzinot DAD pīķa laukumu ar masas koncentrāciju; trīskārtējas injekcijas (RSD < 2,0 %). Linearitāte darba diapazonā: $R^2 = 0,9978$ ($p < 0,001$; Microsoft Excel 2013).

2.1.5. Proliposomāla poliprenolu šķīduma sagatavošana

Izmantoti Phosal 40 IP un Lipoid P75 (25–75 % sojas fosfatidilholīns; Lipoid GmbH). 4,7 g Phosal 40 IP maisīja ar magnētisko maisītāju; pakāpeniski pievienoja 3 g PP un sajauc līdz viendabīgumam (koncentrātā poliprenols:lecitīns 1:1,7 m/m; kā norādīts, to izmantoja, lai gala sistēmās iegūtu PP:kopējie lipīdi 1:17 m/m).

2.1.6. Poliprenolu šķīdības noteikšana

PP (100 mg) sajauc ar 2 ml etanola šķīdumu, kas saturēja 0–25 % Lipoid P75, 24 °C temperatūrā; vorteksēja ≤ 2 min. Pēc 1 h stabilizācijas un centrifugēšanas (14 000 apgr./min, 5 min) supernatantus atšķaidīja hloroformā un PP saturu noteica ar HPLC. Pie 15 % lecitīna piesātinājuma sasniegšanai bija nepieciešama lielāka PP slodze; pie 25 % šķīdumi sajaucās bez novērojama piesātinājuma (instrumentāli nekvantificēts).

2.1.7. Poliprenolu iekapsulācijas efektivitāte liposomās

PP sajauc ar Phosal 40 IP vai Lipoid 75 SA diapazonā no 1:5 līdz 1:40 (PP:lipīdi, m/m). Tā kā brīvie PP ir šķīdri un ūdenī nešķīstoši, tika izstrādāta uz blīvuma atšķirībām balstīta sadalīšana. Īsumā: 100 mg maisījumu + 900 µl ūdens vorteksēja, lai iegūtu MLV suspensijas. Alikvotus (100 µl) pievienoja 900 µl 200 mM saharozes un centrifugēja (14 000 apgr./min, 10 min), lai uzpeldinātu brīvos PP pilienus. Augšējo eļļaino fāzi noņēma; supernatantā (liposomas) noteica fosfolipīdus (modificētā Stewart metode) un PP (HPLC). Inkapsulācijas efektivitāti aprēķināja attiecībā pret necentrifugēto maisījumu.

2.1.8. Poliprenolu noteikšana liposomās ar HPLC

Paraugus izšķīdināja izopropanolā (1:10) un atšķaidīja hloroformā. Hromatogrāfija: Waters 660 sūknis, Nova-Pak® Silica kolonna (150 × 3,9 mm, 5 µm); mobilā fāze – hloroforms vai hloroforms:heksāns (90:10) ar plūsmas ātrumu 1 ml/min; detektēšana pie 335 nm (Waters 996 DAD).

2.1.9. Paraugu sagatavošana mikroskopijai

Gaismas/TEM attēlošanai proliposomālo masu ar PP hidratēja līdz 5 % lipīdu saturam un vorteksēja. Iekrāsošanu uz Formvar režģiem veica šādi: metode A – sajaukt 1 : 1 ar 2 % amonija molibdātu, izžāvēt (pozitīvā iekrāsošana); metode B – paraugu vispirms izžāvēt, tad uzklāt 2 % amonija molibdātu un nosusināt (negatīvā iekrāsošana).

2.1.10. Poliprenolus saturošo liposomu izmēru sadalījums

Atšķaidītas ar PP piepildītas liposomas 25 °C temperatūrā mērija ar Zetasizer Nano ZS (Malvern), lai noteiktu apjoma svērto vidējo diametru un PDI.

2.2. In vivo dzīvnieku eksperimenti

2.2.1. In vivo dzīvnieku eksperimentiem izmantotās vielas

Egles skuju poliprenoli (C55-C95; 1, 10, 20, 50 mg/kg; AS Biolat) un atorvastatīns 80 mg/kg (Atoris, KRKA) tika ievadīti vienu reizi dienā *per os*. Poliprenolus izšķīdināja rafinētā saulespuķu eļļā; atorvastatīnu – fizioloģiskajā šķīdumā. Tika izmantotas Accutrend GCT teststrēmeles (Roche) un kreatīnkināzes noteikšanas komplekts (MAK116, Sigma-Aldrich); pārējie reaģenti – no Sigma-Aldrich.

2.2.2. Eksperimentālie dzīvnieki

Wistar šķirnes žurkas mātītes (230–245 g; Rīgas Stradiņa universitāte) tika turētas pa 5 dzīvniekiem būrī, ar brīvu piekļuvi barībai un ūdenim, 22 °C temperatūrā, 50–60 % relatīvajā mitrumā, 12 stundu gaismas/tumsas režīmā. Mātītes izvēlētas, jo tām ir augstāks SIM risks (Sathasivam & Lecky, 2008). Testēšana notika laikā no 09:00 līdz 15:00.

2.2.3. Dzīvnieku eksperimentu ētika

Visas procedūras atbilda ES Direktīvai 2010/63/ES un vietējiem normatīvajiem aktiem; protokolu apstiprināja Dzīvnieku ētikas komiteja, Pārtikas un veterinārais dienests, Rīga (PVD Nr. 59).

2.2.4. Eksperimenta dizains

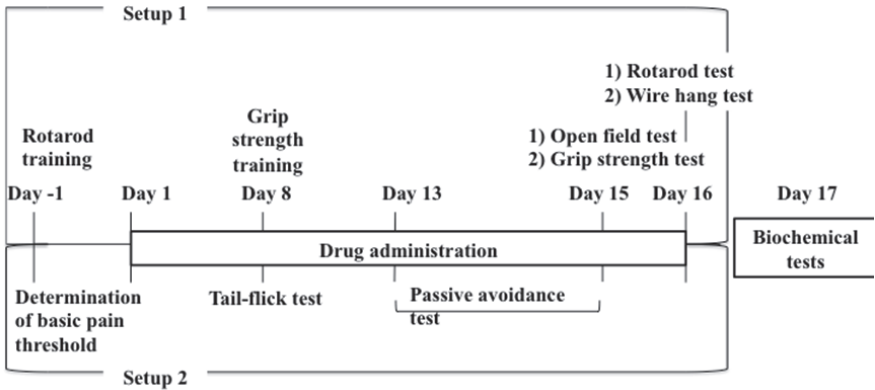
Pēc ≤ 7 dienu aklimatizācijas žurkām (n = 9–10 grupā) 16 dienas katru dienu perorāli ievadīja preparātus (no rīta atorvastatīns/fizioloģiskais šķīdums; pēcpusdienā PP/eļļa). Ķermeņa masu reģistrēja 1. dienā un ik pēc 2 dienām. Tika izmantotas divas pieejas (3. att.):

Pieēja 1: PP (1, 10, 20 mg/kg), atorvastatīns (80 mg/kg) – atsevišķi un kombinācijās; kontroles saņēma fizioloģisko šķīdumu (10 ml/kg) un eļļu (2 ml/kg).

Uzvedības testus (karāšanās stieni, atklātā lauka tests, satvēriena spēks, rotējošā stieņa tests) veica 09:00–15:00 ar ≥ 2 h intervāliem.

Pieeja 2: kā iepriekš, fokusējoties uz PP 20 mg/kg (atsevišķi/kombinācijā).

Papildu secība: astes refleksa (nociceptīvais) tests (8. dienā; 2,5 h pēc atorvastatīna un 16,5 h pēc PP) un pasīvās izvairīšanās tests (13.–15. dienā) ar adaptāciju, iemācīšanos (elektriskais stimuluss, ieejot tumšajā nodalījumā) un noturības pārbaudēm; atkārtota pārbaude veikta 2 dienas pēc pēdējās devas.



3. att. Eksperimentālie iestatījumi

17. dienā dzīvniekus anestezēja (ketamīns 100 mg/kg; ksilazīns 10 mg/kg), veica sirds punkciju un asins paraugu paņemšanu (holesterīns, CK).

2.2.5. *In vivo* uzvedības metodes

- Atklātais lauks (15. dienā): 98 cm diametra apaļa arēna ar 40 cm augstām sienām; apgaismojums 100 cm augstumā. Lokomociju (kopējo distanci, cm) videonovēroja ar Panlab Smart v2.5.
- Pasīvā izvairīšanās: Ugo Basile step-through iekārta. Iemācīšanās: 0,5 mA, 2 s pēdas šoks, ieejot tumšajā nodalījumā; noturības pārbaude pēc 24 h (bez šoka). Reģistrēja pāršošanas latentumu (maks. 240 s) un aprēķināja atšķirības.
- Astes refleksa (nociceptīvais) (8. dienā): Analgesy-Meter LE7106; starojuma siltums uz astes; sākuma vērtība 2,5–4,5 s; 10 s posmos; %MPE = $[(\text{pēc zāļu} - \text{pirms zāļu}) / (10 \text{ s} - \text{pirms zāļu})] \times 100$; divi mēģinājumi ar 5 min intervālu.
- Karāšanās stieni (16. dienā): 90 cm gara, 3 mm stieple 60 cm augstumā; reģistrēja kritiena latentumu (maks. 120 s) trīs mēģinājumos (3 min atpūtas); analizē izmantota labākā vērtība.

- Satvēriena spēks: Ugo Basile 47105; seši treniņmēģinājumi (8. dienā); testēšana (15. dienā). Piecu vilkšanas mēģinājumu vidējā vērtība (30 s atpūtas), izteikta gramos.
- Rotējošā stieņa tests (16. dienā): Ugo Basile 47700; iepriekšapmācība (pieci mēģinājumi). Tests: no 4 līdz 40 apgr./min 5 min laikā; četri mēģinājumi (1 h intervāli). Reģistrēja kritiena latentumu un ātrumu; ziņota vidējā vērtība.

2.2.6. Bioķīmiskā analīze

- Holesterīns: Accutrend GCT (mmol/l).
- Kreatīnkināze: Heparinizēta plazma, centrifugēta (3 000 apgr./min, 10 min), uzglabāta $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; analīze saskaņā ar MAK116 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$; A340 nm; INFINITE M200 PRO). Viena aktivitātes vienība = 1 μmol fosfāta pārnests no fosfo-kreatīna uz ADP minūtē pie pH 6. Rezultāti izteikti U/l.

2.2.7. Statistiskā analīze

Dati tika apkopoti kā vidējā vērtība \pm SEM (vidējās vērtības standartklūda). Grupas atšķirības analizēja ar vienfaktora ANOVA, izmantojot Fisher LSD testu (GraphPad Prism 6); statistiskā nozīmība noteikta pie $p < 0,05$. Datu apstrādei izmantota Microsoft Excel 2007.

2.3. Poliprenolu drošuma un efektivitātes pilotpētījums

2.3.1. Dizains un pacienti

Atklāts, viencentrisks, perspektīvs pilotpētījums Latvijas Kardioloģijas centrā: 50 pacienti skrīnēti (2014. gada jūnijs-2015. gada jūlijs) aizdomu par SIM dēļ; iekļauti 12, pabeidza 10. Ētikas apstiprinājums: P. Stradiņa Kliniskā universitātes slimnīca (protokols 160414-3L).

Iekļaušanas kritēriji (visi obligāti): pašreizēja statīnu lietošana ≥ 4 nedēļas; vismaz viens muskuļu simptoms ≥ 2 nedēļas (sāpes, vājums, krampji) vai $\text{CK} > 2 \times \text{VN}$, bet $< 10 \times \text{VN}$; nav indikāciju devas samazināšanai; liela varbūtība 2 mēnešus turpināt to pašu statīnu/devu; rakstiska informēta piekrišana.

Galvenie izslēgšanas kritēriji (kopsavilkums): $\text{CK} > 10 \times \text{VN}$; iepriekš pastāvoši muskuļu simptomi; nesens MI/mazaķirurģija/trauma; plānota tuvāka termiņa operācija; mijiedarbību izraisošas zāles (fibrāti, niacīns, sarkanā rauga rīsi, makrolīdi, azoli, HIV proteāzes inhibitori, ciklosporīns), greipfrūtu sula; būtiski aknu/nieru darbības traucējumi; endokrīni vai neiromuskulāri traucējumi, kas prasa devas maiņas; slihta līdzestība; augsts alkohola patēriņš; smagi/konkurētspējīgi fiziski treniņi; grūtniecība; alerģija pret pētījuma uztura bagātinātājiem. Pilns saraksts – saskaņā ar protokolu.

Iejaukšanās: skuju poliprenoli 4 mg/dienā + CoQ₁₀ 100 mg/dienā 8 nedēļas, izmantojot Latvijā reģistrētus uztura bagātinātājus: “Poliprenols[®]” (1 mg PP kapsulā; 2 kapsulas vakarā) un “Kardiopren[®]” (2 mg PP + 100 mg CoQ₁₀ kapsulā; 1 kapsula no rīta). Devas atdalīja ar ~ 12 h intervālu, lietoja tukšā dūšā, uzdzērot ~ ½ glāzi ūdens.

2.3.2. Datu vākšana

- Vizītes: V0 skrīnings; V1 iekļaušana (≤ 7 dienas pēc V0); V2 4. nedēļa (± 7 dienas); V3 8. nedēļa (± 7 dienas).
- Laboratorija (V0): CBC, CK, kopējais/LDL/HDL holesterīns, triglicerīdi, ALAT/ASAT, tiešais/netiešais bilirubīns, glikoze, kreatinīns, GFR, kālijs, TSH, FT4, FT3.
- Sākotnējie un 8. nedēļas galapunkti:
- Subjektīvie simptomi: sāpes/vājums/krampji (0–10 VAS); lokalizācija; saistība ar slodzi; iknedēļas fiziskās aktivitātes kategorizētas pēc MET (≤ 3 , 3–6, > 6).
- Dinamometrija: Baseline[®] rokas satvēriena spēks (3 mēģinājumi/rokai; atzīmē dominējošo roku).
- Slodzes EKG (veloergometrija): slodze (W), HR (sākuma/maksimālais), kopējā ST-depresija (mm), laiks līdz 1 mm ST-depresijai (s), HR/ST indekss.
- Elektromioneiomiogrāfija: motoro (medianais / ulnārais / tibiālais / peroneālais) un sensorisko (medianais / radiālais / surālais) nervu neiogrāfija (latentums, amplitūda, vadīšanas ātrums); ja neiogrāfija normāla, EMG sešos muskuļos (divi distāli, četri proksimāli): MUAP vidējā amplitūda/ilgums, ārpus normas skaits, miopātiski fenomeni (fibrilācijas/PSW/poli-fāzija), interferenču raksts un rekrutēšana; klasifikācija: nerva bojājums/norma/miopātija/izteikta miopātija.
- Papildus (V1): EKG; glikoze, GGT, sārmainā fosfatāze, hs-CRP, 25-OH D vitamīns.
- 4. nedēļa (V2): atkārtoti simptomi, fiziskās aktivitātes, veloergometrija, galvenie laboratoriskie rādītāji; neatvērtie uztura bagātinātāji nodoti atpakaļ.

2.3.3. Statistiskā analīze

Analīzes veica ar IBM SPSS v22.0. Kvantitatīvos datus attēloja kā vidējā \pm SD (vai mediāna [IQR] ne normāli sadalītiem datiem). Kategoriskos datus attēloja kā n (%). Starpprupu salīdzinājumiem lietoja neatkarīgo izlīdzīgu t-testu, Manna-Vitnija U testu, hi-kvadrāta (χ^2) vai Fišera precīzo testu atbilstoši datu tipam. Atkārtotu mērījumu ANOVA izvērtēja izmaiņas dalībnieka ietvaros; ja tika pārākāpta Mauchly sfēriskuma prasība, piemēroja Grīnhausa-Geisera korekciju ar Šidaka pielāgojumiem pāru kontrastiem. Ne normāli sadalītiem atkārtotiem mērījumiem lietoja Frīdmana testu; bināriem atkārtotiem iznākumiem – Kohrana Q testu. Nozīmības līmeni noteica pie $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI

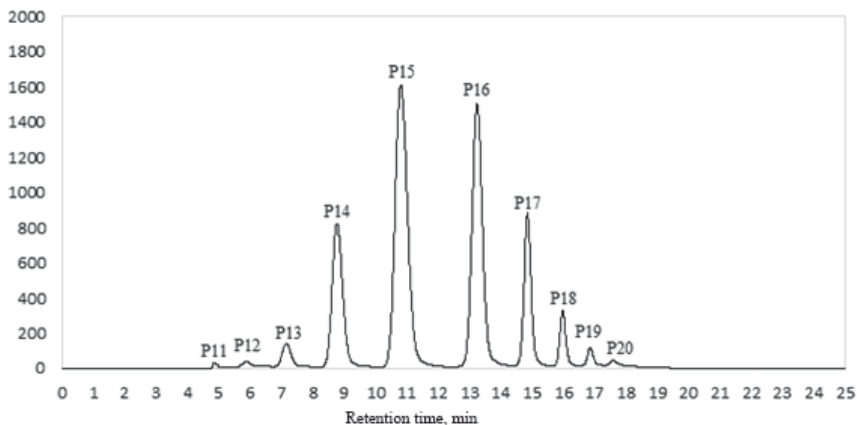
3.1. Poliprenolu analīzes un kvantifikācijas rezultāti

3.1.1. Sibīrijas baltegles (*Abies sibirica* L.) poliprenolu homologo identifikācija

UHPLC-DAD kombinācijā ar HRMS apstiprināja desmit poliprenolu piņķus *Abies sibirica* ekstraktā (4. att.). Homologi P14-P17 tika validēti pēc $[M + Na]^+$ precīzajām masām ar ppm līmeņa atbilstību aprēķinātajām vērtībām (P14 993,8779; P15 1061,9372; P16 1130,0017; P17 1198,0650). Relatīvajā sastāvā (1. tabula) dominēja P15 ($37,23 \pm 0,56$ %), kam sekoja P16 ($29,11 \pm 0,51$ %), P14 ($15,26 \pm 0,78$ %) un P17 ($11,31 \pm 0,01$ %); bija sastopami arī nelieli daudzumi P13, P18-P20 un zemāki (C55, C60).

1. tabula. Sibīrijas baltegles (*Abies sibirica* L.) izdalīto poliprenolu homologo identifikācija un kvantifikācija

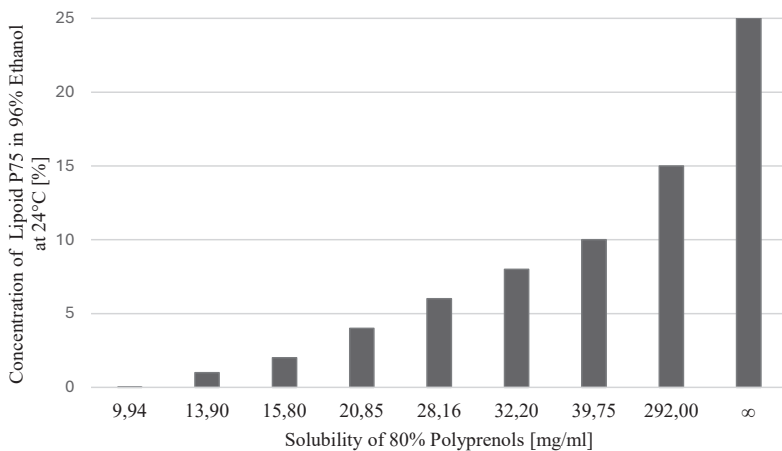
Poliprenols	Molekulārā formula	t_R , min (UHPLC-DAD)	Relatīvais daudzums, % <i>Abies sibirica</i> L.	Identifikācijas veids	(M+Na) ⁺ (HRMS)
11	C ₅₅ H ₉₀ O	4.86	0.06 ± 0.01	Standarta	
12	C ₆₀ H ₉₈ O	5.88	0.26 ± 0.04	Standarta	
P13	C ₆₅ H ₁₀₆ O	7.16	2.05 ± 0.04	Standarta	
P14	C ₇₀ H ₁₁₄ O	8.78	15.26 ± 0.78	Standarta /HRMS	993.8779
P15	C ₇₅ H ₁₂₂ O	10.81	37.23 ± 0.56	Standarta /HRMS	1061.9372
P16	C ₈₀ H ₁₃₀ O	13.25	29.11 ± 0.51	Standarta /HRMS	1130.0017
P17	C ₈₅ H ₁₃₈ O	14.86	11.31 ± 0.01	Standarta /HRMS	1198.0650
P18	C ₉₀ H ₁₄₆ O	15.98	3.36 ± 0.06	Standarta	
P19	C ₉₅ H ₁₅₄ O	16.86	1.01 ± 0.04	Standarta	
P20	C ₁₀₀ H ₁₆₂ O	17.59	0.31 ± 0.11	Standarta	



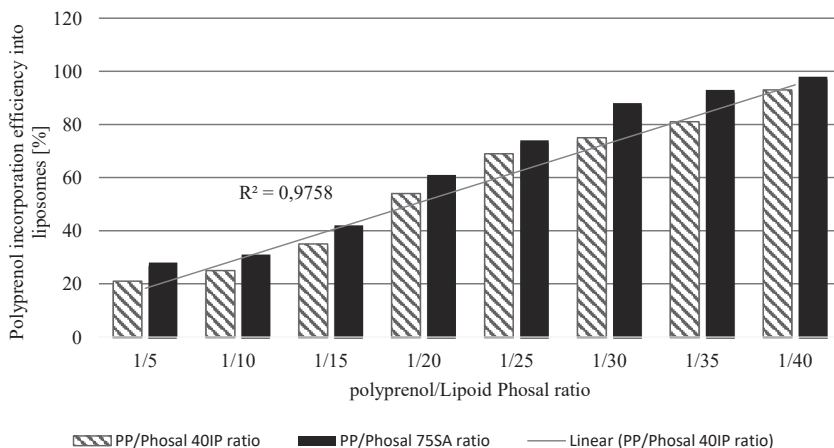
4. att. No Sibīrijas baltegles (*Abies sibirica* L.) iegūto poliprenolu UHPLC-DAD hromatogramma.

3.1.2. Šķīdība etanola/lecitīna sistēmās un PP iekapsulēšanās efektivitāte

Tika izveidota līdzšķīdināšanas/modificētās etanola injekcijas pieeja. Poliprenolu šķīdība 96 % etanolā monotoniski pieauga līdz ar sojas fosfatidilholīna saturu, 24 °C temperatūrā pie 25 % Lipoid P75 sasniedzot praktisku jauktspēju 80 % poliprenolu gadījumā (5. att.). Lai lecītīns šķīstu etanolā, izejmateriālā bija nepieciešami ≥ 40 % fosfatidilholīna; stabilas liposomas veidojās, ja fosfolipīdu:poliprenola attiecība pārsniedza $\sim 1:15$. Inkapsulācijas efektivitāte Phosal 40 IP vai 75 SA liposomās uzrādīja negatīvu korelāciju ar izšķīdinātā PP īpatsvāru; maksimālā inkapsulācija abās sistēmās notika pie PP:Phosal 1:40 (m/m) (6. att.). Pie zemāka fosfolipīdu satura formulācijas sadalījās PP emulsijās un fosfolipīdu liposomās, nevis veidoja ar PP pildītas liposomas; makroskopiskais izskats un lamellaritātes rezultāti apkopoti 2. tabulā (stabilās sistēmas bija multilamelāras vai oligo/uni-lamelāras atkarībā no sastāva).



5. att. Lipoid P75 lecitīna koncentrācijas ietekme etanolā uz *Abies sibirica* egles poliprenolu šķīdību.



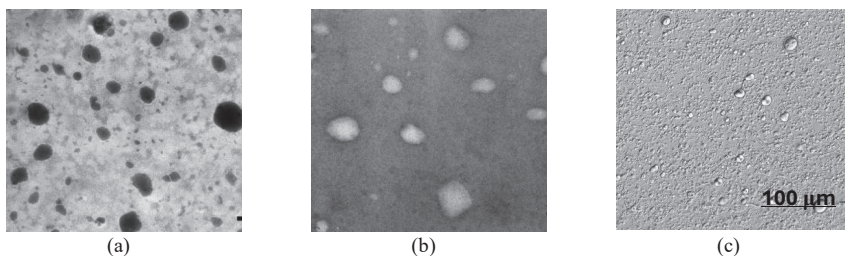
6. Att. Prenola/lecitīna (Phosal IP40 un Phosal 75SA) attiecības ietekme uz *Abies sibirica* egles poliprenolu iekapsulācijas efektivitāti liposomās.

2. tabula. Liposomālo poliprenolu paraugu sastāvs un izskats.

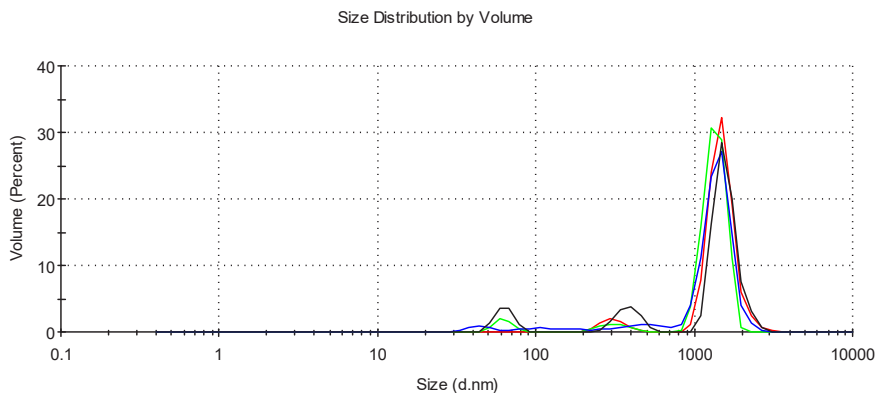
Lipoid/ lecitīna daudzums	Etanola daudzums	Poliprenola daudzums	Ūdens daudzums	Parauga izskats	Stabilitāte pēc viena mēneša	Liposomu struktūra
Lipoid P45/150 mg	50 mg	30 mg	līdz 5g	Pusšķidr	Nestabils	Oligolamelāras
Lipoid P45/150 mg	50 mg	30 mg	līdz 5g	Pusšķidr	Nestabils	Oligolamelāras
Lipoid P75/105 mg	50 mg	30 mg	līdz 5g	Pusšķidr	Nestabils	Oligolamelāras
Lipoid P75/150 mg	50 mg	30 mg	līdz 5g	Pusšķidr	Nestabils	Oligolamelāras
Lipoid Phosal 40 IP/1000 mg	0 mg	30 mg	līdz 5g	Šķidr	Stabils	Multilamelāras
Lipoid P45/500 mg	150 mg	30 mg	līdz 5g	Pusšķidr	Stabils	Oligolamelāras
Lipoid P45/1000 mg	200 mg	30 mg	līdz 5g	Blīva želejveida masa	Stabils	Uni-/ oligolamelāras

3.1.3. Poliprenoliem pildītu liposomu morfoloģiskie novērojumi

TEM ar pozitīvo (fosfolipīdu slāņu izcelšana) un negatīvo iekrāsošanu parādīja gandrīz sfēriskas, multilamelāras vezikulas ("sīpola tipa" lamellas) pie PP:lecitīns attiecības 1:17 (m/m) (7. att. a–b). Gaismas mikroskopijā novēroja vienmērīgi duļķainu suspensiju bez fāžu atdalīšanās (7. att. c). Dinamiskā gaismas izkliede uzrādīja trimodālu, pēc tilpuma svērtu sadalījumu (8. att.): dominējoša ~ 1,36 μm populācija (~ 90 % no tilpuma) ar mazāk izteiktām submikronu kopām ap ~ 307 nm un ~ 62 nm (~ 5 % katrs); >5 μm daļiņas bija retas. Kopumā etanola injekcijas/līdzšķīdināšanas protokols nodrošināja labi definētas, ar PP augstā pakāpē pildītas MLV, kas piemērotas lietošanai uztura bagātinātājos.



7. att. Poliprenola/Phosal 40 IP liposomu (1:17 m/m) attēli: TEM ar (a) pozitīvo krāsošanu; (b) negatīvo krāsošanu; un (c) gaismas mikroskopiju.



8. att. Poliprenola/Phosal 40 IP liposomu izmēru sadalījums (1:17 m/m).

3.2. Egles skuju poliprenolu pētījumi žurkās

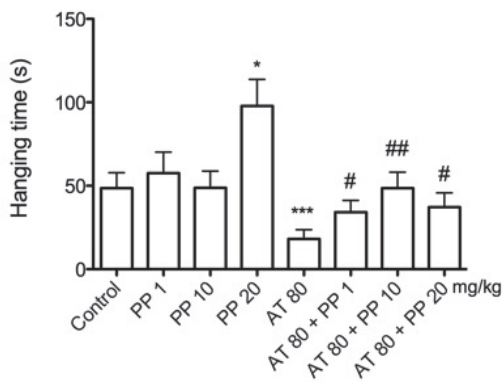
3.2.1. Muskulu spēks/tonuss un koordinācija

Karāšanās pie stieņa (16. dienā): PP 1 vai 10 mg/kg ietekmi neatstāja; PP 20 mg/kg dubultoja karāšanās laiku salīdzinājumā ar kontroli. Atorvastatīns (AT) 80 mg/kg samazināja karāšanās laiku apmēram 3 reizes; vienlaicīga PP ievadīšana jebkurā devā atjaunoja sniegumu līdz kontroles līmenim (9. att.; ANOVA ar Fisher LSD: $p < 0,05$ līdz $p < 0,001$ vs kontrole; # $p < 0,05$ līdz ## $p < 0,01$ vs AT).

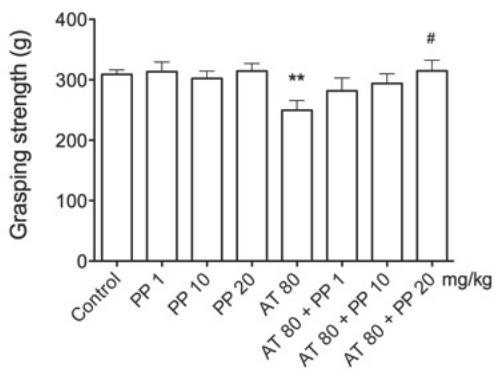
Satvēriena spēks (15. dienā): PP vienas (1–20 mg/kg) satvērienu salīdzinājumā ar kontroli nemainīja; AT 80 mg/kg samazināja satvēriena spēku;

PP 20 mg/kg + AT šo samazinājumu atgrieza līdz kontrolei (10. att.; $p < 0,01$ vs kontrole; # $p < 0,05$ vs AT).

Rotējošā stieņa tests: būtisku efektu PP (visās devās), AT vai to kombinācijām nekonstatēja (dati nav parādīti).



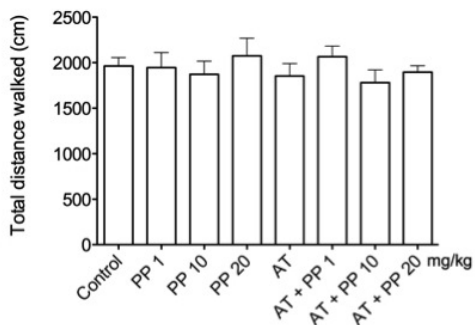
9. att. Muskuļu spēks žurkām karājoties pie stieņa.



10. att. Muskuļu spēks žurku satvēriena spēka testā.

3.2.2. Vispārējā lokomotorā aktivitāte

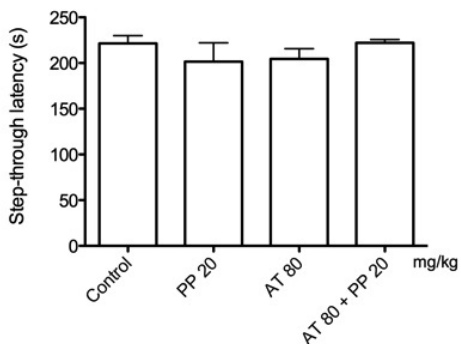
Atklātā lauka testā kopējais veiktais attālums nemainījās ne PP (1–20 mg/kg), ne AT 80 mg/kg, ne arī kombinētas ievadišanas gadījumā (11. att.).



11. att. Lokomotorā aktivitāte žurku atklātā lauka testā.

3.2.3. Mācīšanās/atmiņa

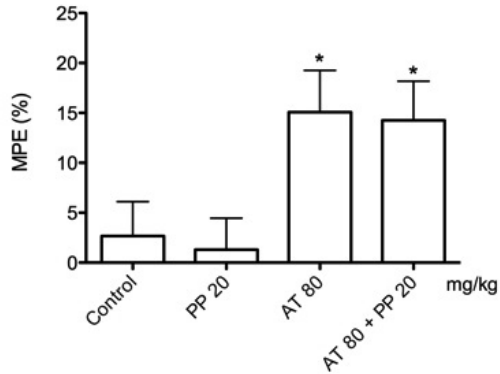
Pasīvās izvairīšanās testā starp PP 20 mg/kg, AT 80 mg/kg, kombinēto terapiju un kontroli atšķirības nekonstatēja (12. att.).



12. att. Ietekme uz atmiņu žurku pasīvās izvairīšanās testā.

3.2.4. Pretsāpju aktivitāte

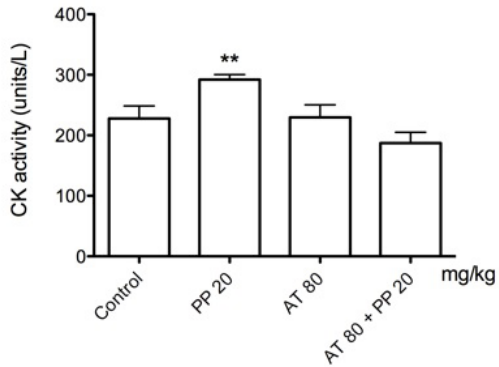
Astes refleksa (nociceptīvajā) testā %MPE PP 20 mg/kg ietekmē nemainījās; AT 80 mg/kg palielināja %MPE salīdzinājumā ar kontroli; PP + AT neizmainīja AT pretsāpju efektu (13. att.; $p < 0,05$ vs kontrole).



13. att. Pretsāpju aktivitāte žurku astes refleksa (nocieptivajā) testā.

3.2.5. Plazmas holesterīns un kreatīnkināze (CK)

Kopējais holesterīns starp grupām neatšķirās (nav parādīts). PP 20 mg/kg palielināja plazmas CK par ~ 25 % salīdzinājumā ar kontroli ($p < 0,01$; 14. att.), savukārt AT 80 mg/kg un PP + AT CK vērtības bija salīdzināmas ar kontroli.

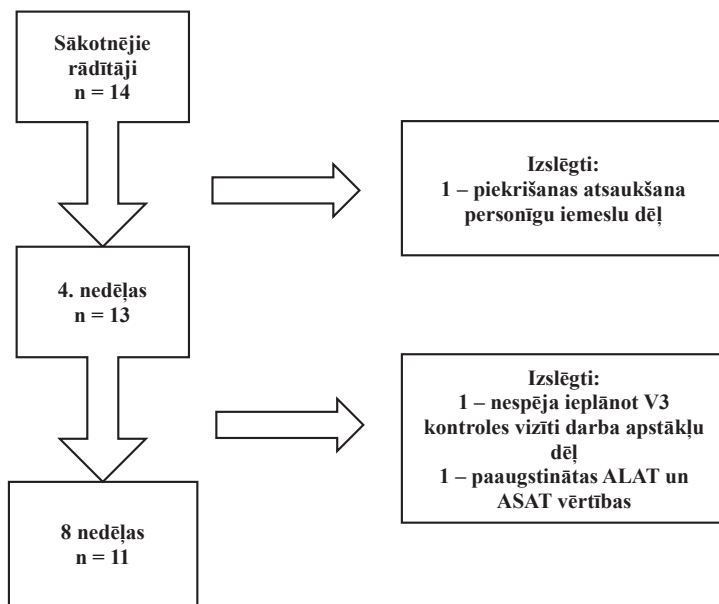


14. att. Kreatīnkināzes (CK) aktivitāte žurku plazmā (U/l).

3.3. Poliprenolu drošums un efektivitāte (pilotpētījums)

3.3.1. Sākotnējās raksturojuma iezīmes

Iekļauti četrpadsmit pacienti; 11 pabeidza atbilstoši protokolam (15. att.). Grupas (pēc protokola vs izslēgtie, n = 3) sākotnēji bija līdzīgas (3. tabula), izņēmums – zemāka sārmainās fosfatāzes aktivitāte izslēgtajiem pacientiem ($p = 0,015$). Lielākajai daļai bija diagnosticēta ASCVD. Statīnu režīmi ietvēra atorvastatīnu 20–40 mg un rozuvastatīnu 5–40 mg (4. tabula); vidējais lietošanas ilgums pašreizējā devā ~ 10 mēneši. Iekļaušanas brīdī muskuļu simptomi bija bieži (sāpes 93 %, vājums 57 %, krampji 43 %); tikai 29 % bija LDL-C < 1,8 mmol/l.



15. att. Pētījuma plūsmas diagramma.

3. tabula. Pētījuma pacientu sākotnējais raksturojums.

Raksturlielumi	Protokola grupa (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
Sieviešu dzimums (n, %)	5 (45,5 %)	2 (66,7 %)
Vecums, gadi (vidējais, SD)	67,73 ± 8,59	55,00 ± 18,19
Koronārās sirds slimības anamnēzē	11 (100 %)	3 (100 %)
Miokarda infarkts	6 (54,5 %)	1 (33,3 %)
PCI	8 (72,7 %)	2 (66,7 %)

Raksturlielumi	Protokola grupa (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
CABG	1 (9,1 %)	1 (33,3 %)
Perifēro artēriju slimība	2 (18,2 %)	0
Asins bioķīmija (vidējais, SD)	Protokola grupa (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
Kopējais holesterīns, mmol/l	4,45 ± 1,24	4,30 ± 0,78
Triglicerīdi, mmol/l	2,25 ± 1,39	1,56 ± 0,75
HDL-holesterīns, mmol/l	1,33 ± 0,27	1,09 ± 0,24
LDL-holesterīns, mmol/l	2,25 ± 0,95	2,76 ± 0,83
Glikoze, mmol/l	5,43 ± 0,77	5,53 ± 1,06
Kreatīnkināze (CK), U/l	240,09±303,08	236,00 ± 204,21
CK >ULR (n, %)	2 (18,2 %)	1 (33,3 %)
ALAT, U/l	29,82 ± 11,69	32,22 ± 6,11
ASAT, U/l	34,27 ± 14,00	25,33 ± 5,69
GGT, U/l	65,82 ± 74,83	22,33 ± 8,96
AP, U/l	89,91 ± 15,16	64,33 ± 3,21*
Konjugētais bilirubīns, μmol/l	3,85 ± 1,55	2,97 ± 0,91
Nekonjugētais bilirubīns, μmol/l	7,28 ± 2,37	5,20 ± 1,06
Kreatinīns, μmol/l	73,18 ± 17,93	95,33 ± 30,29
GFR ml/min	96,30 ± 25,61	97,67 ± 73,24
Kālijs, mmol/l	4,60 ± 0,74	4,50 ± 0,26
TSH, mU/l	1,57 ± 1,25	2,37 ± 1,59
25-OH D vitamīns, ng/l	24,17 ± 6,71	23,69 ± 5,06
CRP, mg/l (mediāna, IQR)	1,17 (0,97–2,47)	1,07 (–)
Citi kardiovaskulāro slimību riska faktori	Protokola grupa (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
Smēķēšana (n, %)	1 (9,09 %)	0 (0 %)
Hipertensija (n, %)	8 (72,73 %)	2 (66,66 %)
Diabēts (n, %)	2 (18,18 %)	0 (0 %)
Ķermeņa masas indekss, kg/m ² (vidējais, SD)	27,96 ± 2,13	29,38 ± 5,53
Alkohola vienības nedēļā (vidējais, SD)	2,18 ± 1,54	1,67 ± 1,16
Fiziskās aktivitātes, h nedēļā (vidējais, SD)		
Viegla	33,27 ± 12,56	28,00 ± 12,12
Mērena	7,27 ± 8,46	8,33 ± 5,13
Intensīva	1,18 ± 3,06	0

PCI – perkutānā koronārā intervence; CABG – koronāro artēriju šuntēšanas operācija; ULR – atsaucis intervāla augšējā robeža; SD – standartnovirze; IQR – starpkvartīļu diapazons; LDL – zema blīvuma lipoproteīns; HDL – augsta blīvuma lipoproteīns; ALAT – alaninaminotransferāze; ASAT – aspartātaminotransferāze; GFR – glomerulārās filtrācijas ātrums; GGT – gamma-glutamīltransferāze; AP – sārmainā fosfatāze; CRP – augstas jutības C-reaktīvais proteīns; TSH – vairogdziedzeri stimulējošais hormons.

* p = 0,015; pārējie p > 0,05.

4. tabula. Statīnu terapija un muskuļu simptomi iekļaušanas brīdī.

<i>Statīnu terapija</i>	Kopā (n = 14)	Pēc protokola (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
Atorvastatīns 20 mg (n)	2 (14,29 %)	1 (9,09 %)	1 (33,33 %)
Atorvastatīns 30 mg (n)	1 (7,14 %)	1 (9,09 %)	–
Atorvastatīns 40 mg (n)	1 (7,14 %)	1 (9,09 %)	–
Rozuvastatīns 5 mg (n)	2 (14,29 %)	1 (9,09 %)	1 (33,33 %)
Rozuvastatīns 10 mg (n)	3 (21,43 %)	3 (27,27 %)	–
Rozuvastatīns 20 mg (n)	4 (28,57 %)	3 (27,27 %)	1 (33,33 %)
Rozuvastatīns 40 mg (n)	1 (7,14 %)	1 (9,09 %)	–
<i>Muskuļu simptomi un pazīmes</i>	Kopā (n = 14)	Pēc protokola (n = 11)	Izslēgtie (n = 3)
Sāpes (n, %)	13 (92,86 %)	10 (90,90 %)	3 (100 %)
Sāpes miera stāvoklī (n, %)	11 (78,57 %)	9 (81,82 %)	2 (66,67 %)
Sāpju smaguma vērtējums (vidējais, SD)*	5,69 ± 1,84	6,00 ± 1,70	4,67 ± 2,31
Vājums (n, %)	8 (57,14 %)	7 (63,64 %)	1 (33,33 %)
Vājuma smaguma vērtējums (vidējais, SD)	6,00 ± 1,51	6,14 ± 1,57	5,00
Krampji (n, %)	6 (42,86 %)	5 (45,46 %)	1 (33,33 %)
Krampju smaguma vērtējums	5,33 ± 2,58	6,00 ± 2,34	2,00
Paaugstināts CK līmenis > ULR	577,00 ± 342,46	614,00±409,51	466,00±0

* Simptomu smaguma vērtējums balstīts uz pacienta subjektīvu simptomu izvērtējumu (diapazons 0 līdz 10). Vērtējumu aprēķina tikai tiem pacientiem, kuriem simptoms ir sastopams.
CK – kreatīnkināze; ULR – atsaucis intervāla augšējā robeža; SD – standartnovirze.

3.3.2. Drošums

8 nedēļu laikā pēc protokola kohortā netika konstatēti nopietni nelabvēlīgi notikumi; viens plānots PCI noritēja bez sarežģījumiem. Atkārtotu mērījumu gaitā (5. tabula) klīniskajā bioķīmijā, hematoloģijā vai EKG parametros būtisku izmaiņu nebija, izņemot nelielu triglicerīdu samazinājumu ($p = 0,023$). CK mediānas 4. un 8. nedēļā bija tendenciāli augstākas, tomēr statistiski neatšķīrās no sākotnējām (ar Šidaka korekciju $p > 0,7$); pacientu īpatsvars ar CK > ULR būtiski nemainījās ($p = 0,223$).

Vienu 65 gadus vecu sievieti 4. nedēļā izslēdza asimptomātiskas transamināžu paaugstināšanās dēļ (ALAT 473 U/l; ASAT 189 U/l; GGT 282 U/l) ar normālu bilirubīnu un CK (6. tabula). Vīrusu hepatīts un strukturāla hepatobiliāra slimība tika izslēgti; rādītāji 7 dienu laikā pēc produktu pārtraukšanas normalizējās. Fona faktori: HNS (GFR 50 ml/min), subklīniska hipotireoze un zems 25-OH D vitamīns; nieru funkcija nepasliktinājās. Paralēli lietotais atorvastatīns 20 mg (uzsākts 7 nedēļas pirms iekļaušanas) arī tika pārtraukts.

5. tabula. Drošuma parametri

<i>Raksturlielumi (vidējais, SD)</i>	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība *
Kopējais holesterīns, mmol/l	4,45 (1,24)	4,05 (0,62)	4,23 (0,57)	0,259
Triglicerīdi, mmol/l	2,25 (1,39)	1,72 (1,16)	1,87 (0,95)	0,023
HDL-holesterīns, mmol/l	1,33 (0,27)	1,32 (0,27)	1,37 (0,23)	0,844
LDL-holesterīns, mmol/l	2,25 (0,95)	1,99 (0,54)	2,02 (0,58)	0,305
Glikoze, mmol/l	5,34 (0,77)	5,35 (0,77)	5,46 (0,67)	0,810
Kreatīnkināze, U/l **	107 (85–275)	176 (97–214)	178 (92–216)	0,231 ***
ALAT, U/l	29,82 (11,69)	29,36 (8,87)	31,27 (12,91)	0,796
ASAT, U/l	34,27 (13,99)	32,64 (11,29)	35,36 (19,03)	0,648
GGT, U/l	65,81 (74,83)	58,18 (61,60)	46,18 (38,36)	0,286
AP, U/l	89,91 (15,16)	86,64 (19,72)	82,00 (13,52)	0,338
Konjugētais bilirubīns, μmol/l	3,85 (1,55)	4,03 (1,45)	3,54 (1,31)	0,538
Nekonjugētais bilirubīns, μmol/l	7,28 (2,37)	7,48 (2,22)	6,98 (2,28)	0,624
Kreatinīns, μmol/l	73,18 (17,93)	71,64 (19,97)	73,00 (22,62)	0,292
GFR, ml/min	96,30 (25,61)	100,70 (30,35)	98,30 (28,90)	0,275
Kālijs, mmol/l	4,59 (0,74)	4,84 (0,72)	4,49 (0,28)	0,333
TSH, mU/l (n = 10)	1,57 (1,25)	–	2,07 (1,44)	0,059
25-OH D vitamīns, ng/l (n = 10)	24,17 (6,71)	–	23,48 (8,27)	0,571
CRP, mg/l **	1,17 (0,97–2,47)	1,53 (0,99–3,61)	1,86 (0,83–4,70)	0,477 ****
Hematoloģija	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība *
Eritrocīti, 10 ¹² /l	4,86 (0,20)	4,79 (0,36)	4,79 (0,36)	0,599
Leikocīti, 10 ⁹ /l	11,03 (12,10)	7,65 (2,47)	7,50 (1,92)	0,390
Trombocīti, 10 ⁹ /l	248,91 (37,70)	261,55 (34,45)	244,55 (37,32)	0,110
Hemoglobīns, g/l	144,27 (8,84)	140,55 (11,64)	140,91 (13,19)	0,235
Elektrokardiogrāfija	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība *
Sinusa ritms (n, %)	9 (81,8 %)	9 (81,8 %)	9 (81,8 %)	1000
Sirdsdarbības frekvence, bpm	71,91 (14,87)	63,18 (9,05)	67,64 (8,42)	0,097
PR (ms) (n = 9) *****	169,89 (30,23)	175,78 (36,49)	174,67 (30,97)	0,516
QRS (ms)	106,27 (24,46)	107,27 (24,73)	106,55 (23,24)	0,779
QT (ms)	407,27 (41,69)	427,45 (33,36)	412,00 (29,85)	0,125
QTc (ms)	382,82 (43,52)	394,27 (34,04)	371,64 (25,874)	0,217

* Atkārtotu mērījumu ANOVA; ** mediāna un starpkvartīļu diapazons; *** Frīdmana tests; **** mediāna un starpkvartīļu diapazons, salīdzinājumi veikti ar logaritmiski transformētām vērtībām; ***** pacientiem ar sinusa ritmu (n = 9).

SD – standartnovirze; LDL – zema blīvuma lipoproteīns; HDL – augsta blīvuma lipoproteīns; ALAT – alanīnaminotransferāze; ASAT – aspartātaminotransferāze; GFR – glomerulārās filtrācijas ātrums; GGT – gamma-glutamīltransferāze; AP – sārmainā fosfatāze; CRP – augstas jutības C-reaktīvais proteīns; TSH – vairogdziedzeri stimulējošais hormons; PR – PR intervāls; QRS – QRS komplekss; QT – QT intervāls; QTc – koriģētais QT intervāls.

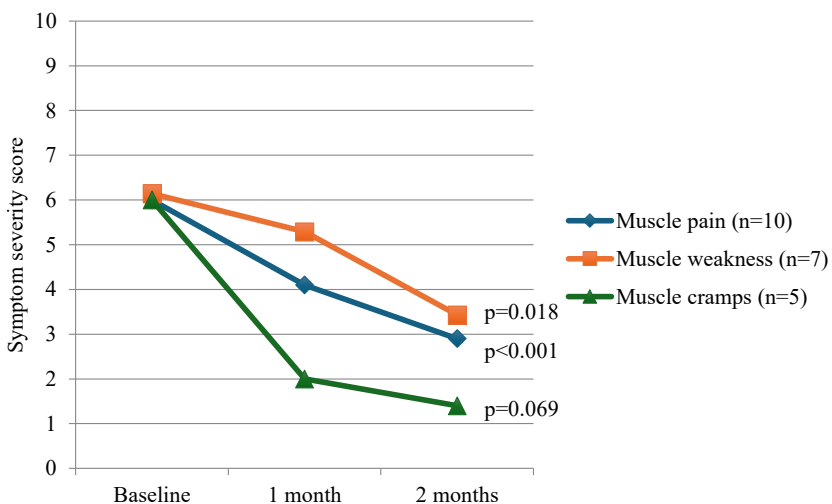
6. tabula. Pacienta gadījuma kopsavilkums ar aknu enzīmu (transamināžu) paaugstinājumu.

Asins bioķīmija	Sākotnēji	4 nedēļas	+ 1 diena pēckontrolē	+ 7 dienas pēckontrolē	Atsauces intervāli
ALAT	31,00	473	313	62	< 41 U/l
ASAT	27,00	189	82	34	< 37 U/l
GGT	28,00	282	250	154	< 61 U/l
AP	62,00	151	134	90	< 117 U/l
Kopējais bilirubīns	6,00	5,60	-	6,20	< 19 μmol/l
Konjugētais bilirubīns	2,00	1,70	-	-	< 3,4 μmol/l
Nekonjugētais bilirubīns	4,00	3,90	-	-	- μmol/l
CK	166	191	-	-	190 U/l
Kreatinīns	130,00	113	-	-	30-106 μmol/l
GFR	50	58	-	-	> 90 ml/min
Kālijs	4,70	4,90	-	-	3,50-5,30 mmol/l
25-OH D vitamīns	21,81	-	-	-	30-100 ng/ml
CRP	1,60	2,49	-	-	< 1,0 mg/l

FU – pēckontrolē; ALAT – alanīnaminotransferāze; ASAT – aspartātaminotransferāze; GGT – gamma-glutamīltransferāze; AP – sārmainā fosfatāze; CK – kreatīnkināze; GFR – glomerulārās filtrācijas ātrums; CRP – augstas jutības C-reaktīvais proteīns.

3.3.3. Muskuļu simptomi

Pašziņotie vērtējumi uzlabojās 8 nedēļu laikā: sāpes (n = 10) kopumā samazinājās būtiski (p < 0,001) ar uzlabojumu 4. un 8. nedēļā salīdzinājumā ar sākumu (p = 0,010; p = 0,001) un nebūtisku izmaiņu starp 8. un 4. nedēļu (p = 0,070); vājums (n = 7) uzlabojās (p = 0,018). Krampju (n = 5) izmaiņas kopējā tendence nebija statistiski nozīmīga (p = 0,069), bet 8. nedēļā bija uzlabojums salīdzinājumā ar sākumu (pielāgotais p = 0,012) (16. att.). Reakcijas sadalījums: sāpes pilnībā izzuda 2/10 (20 %) un samazinājās ≥ 50 % 4/10 (40 %); vājums izzuda 3/7 (42 %); krampji izzuda 2/5 (40 %) un samazinājās ≥ 50 % 2/5 (40 %). Tikai 2/11 pacientu neziņoja par uzlabojumu nevienā simptomā. Pētījuma beigās 4/10 (40 %) uzskatīja, ka simptomi ir pietiekami uzlabojušies, lai apsvērtu statīna devas palielināšanu (1/10 4. nedēļā).



16. att. Pažīnīto muskuļu simptomu vērtējumi pētījuma periodā. P vērtības atspoguļo statistisko nozīmību visos atkārtotajos mērījumos.

3.3.4. Dinamometrija, slodzes tests un fiziskās aktivitātes

Rokas satvēriena spēks pārsvarā nemainījās; 8. nedēļā novēroja nelielu pieaugumu kreisās rokas spēka maksimālajā vērtībā ($p = 0,047$), bet pārējie dinamometrijas galapunkti nebija nozīmīgi (7. tabula). Veloergometrijas rādītāji (slodze, HR, asinsspiediens, ST-depresija, HR/ST indekss) nemainījās. Pažīnītotās vieglās fiziskās aktivitātes (stundas/nedēļā) laika gaitā pieauga (sākotnēji $33,3 \pm 12,6 \rightarrow 35,8 \pm 16,2$ 4. nedēļā $\rightarrow 39,6 \pm 18,9$ 8. nedēļā; $p = 0,008$; 17. att.).

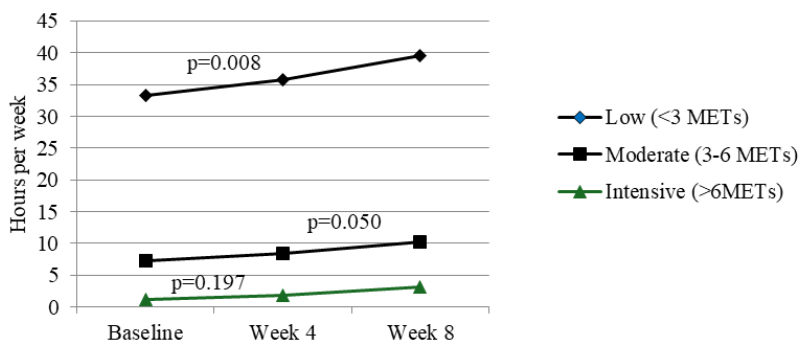
7. tabula. Fiziskie testi (n = 11)

<i>Dinamometrija</i>	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība
Labā roka, maksimums (kg)	39,73 (20,80)	38,36 (20,09)	40,36 (22,77)	0,425
Labā roka, vidējā vērtība (kg)	35,94 (20,21)	35,88 (18,94)	36,09 (20,03)	0,985
Kreisā roka, maksimums (kg)	35,18 (20,83)	36,45 (20,97)	39,36 (18,60)	0,047
Kreisā roka, vidējā vērtība (kg)	33,09 (20,31)	34,73 (20,17)	36,91 (18,09)	0,102
<i>Slodzes tests</i>	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība
Slodze (vati)	106,82 (37,23)	–	100,00 (29,58)	0,192
Maksimālais pulss (bpm)	107,36 (18,05)	–	108,73 (15,14)	0,728

7. tabula. Turpinājums

Slodzes tests	Sākotnēji	4 nedēļas	8 nedēļas	p vērtība
Maksimālais sistoliskais asinsspiediens (mmHg)	172,18 (17,53)	-	160,00 (23,18)	0,087
Maksimālais diastoliskais asinsspiediens (mmHg)	89,82 (6,13)	-	94,73 (17,60)	0,443
ST depresijas (mm)	2,23 (1,77)	-	1,96 (1,10)	0,433
Sirdsdarbības ātruma/ST indekss (bpm/mm)	1,00 (1,02)	-	1,24 (1,03)	0,609

SBP – sistoliskais asinsspiediens, DBP – diastoliskais asinsspiediens



17. att. Pašziņotās fiziskās aktivitātes, stundas nedēļā (n = 11).

Anālītiskajā darbā tika identificēts ar P15 bagāts *Abies sibirica* poliprenolu profils un etanola-lecitīna līdzšķīdināšanas metodē izveidotas stabilas, ap PP augsti pildītas multilamelāras liposomas. Žurkām PP 20 mg/kg uzlaboja sniegumu stieņa karāšanās testā un novērsa atorvastatīna izraisītu muskuļu spēka samazināšanos, neietekmējot lokomociju, atmiņu vai rotējošā stieņa testa rezultātus; PP mēreni paaugstināja CK, savukārt atorvastatīns un kombinētā terapija – nē. Nelielā, atklātā kliniskā kohortā 8 nedēļu PP + CoQ₁₀ papildināšana kopumā bija droša, rezultējās ar būtisku pašziņoto muskuļu sāpju un vājuma uzlabojumiem un palielināja zemas intensitātes fizisko aktivitāšu biežumu, nemainot objektīvo slodzes jaudu. Vienam pacientam atgriezeniska transamināžu paaugstināšanās bija iemesls terapijas pārtraukšanai. Šie rezultāti atbalsta turpmāku kontrolētu skujkoku izcelsmes poliprenolu (ar optimizētu piegādes formu) izvērtēšanu kā papildterapiju statīniem saistītu muskuļu simptomu mazināšanai.

4. DISKUSIJA

Skujkoku poliprenoli, garķēžu izoprenoīdu spirti, kas bagāti sastopami priedēs (*Pinus*) un eglēs (*Picea*), atbalsta membrānu integritāti, glikozilāciju un lipīdu vielmaiņu. Stafīni samazina mevalonāta ceļa starpproduktus (CoQ₁₀, doliholus, prenilācijas donorus), kas predisponē stafīnu inducētai miopātijai (SIM). Ņemot vērā pierādījumus par poliprenolu antioksidatīvo un pretiekaisuma iedarbību, kā arī to potenciālu atjaunot ar doliholu saistītās funkcijas, šajā darbā tika veikta to analītiskā raksturošana, liposomālās formas izstrāde, pirmsklīniskās efektivitātes un klīniskā izpēte – gan atsevišķi, gan kombinācijā ar CoQ₁₀.

Tālāk sniegts pārskats un analīze par galvenajiem atklājumiem no trim recenzētām publikācijām, uz kurām balstās šis promocijas darbs:

8. tabula. Promocijas darba publikācijas

Promocijas darba sadaļa	Galvenie rezultāti	Interpretācija	Publikācija
Poliprenolu analītika un liposomālā forma	UHPLC-DAD-HRMS izdalīja desmit homologus (Pren-11 → Pren-20), vislielākā frakcija – Pren-15 (≈ 37 %); pilotpartiju CV < 3 %. 25 % fosfatidilholīna etanolā nodrošināja pilnu 80 % poliprenolu ekstrakta līdzšķīdināšanu; multilamelārās vezikulas (maksimālais diametrs ≈ 1,36 μm) fiziski stabilas ≥ 6 mēnešus.	Nodrošina reproducējamu “ķīmisko pirkstu nospiedumu”, kas nepieciešams regulatīvai un GMP kvalifikācijai. Pārvar zemo šķīdību ūdenī – vēsturisku šķērslī klīniskai translācijai.	Raksts I (Vanaga <i>et al.</i> , 2020) [5]
Žurku pirmsklīniskais SIM modelis	Egļu poliprenoli (10–20 mg/kg/dienā, p.o.) novērsa atorvastatīna izraisītu kritumu karāšanās pie stieņa un satvēriena spēka testos, neizmainot plazmas holesterīnu vai CNS uzvedību.	Apstiprina muskuļiem specifisku aizsargefektu un drošumu efektīvu devu diapazonā.	Raksts II (Jansone <i>et al.</i> , 2016) [6]
Pacientu SIM pilotpētījums	11 SIM pacientiem, kas 8 nedēļas saņēma poliprenolus 4 mg/dienā + CoQ ₁₀ 100 mg/dienā, sāpju un vājuma vērtējumi būtiski samazinājās (P < 0,001 un P = 0,018), nopietnu nelabvēlīgu notikumu nebija; CK pieauga nebūtiski, un lipīdu mērķi saglabājās.	Pētījums sniedz pirmos pierādījumus par efektivitāti cilvēkiem un apstiprina saderību ar statīnu terapiju.	Raksts III (Latkovskis <i>et al.</i> , 2016) [7]

Apvienojot šos datus ar iepriekš publicēto literatūru, mēs iezīmējam, kā poliprenoli – gan atsevišķi, gan kopā ar CoQ₁₀ – var kupēt trūkumus SIM profilaksē un ārstniecībā.

4.1. Skujkoku poliprenolu bioķīmiskā raksturošana (raksts I)

Ar UHPLC-DAD-HRMS noteikts Sibīrijas baltegles profils no Pren-11 līdz Pren-20, visvairāk pārstāvēts bija Pren-15 (~ 37 %); Pren-15 kopā ar Pren-16 veidoja > 65 % no kopējā daudzuma [63]. Izmantotās tīrības ≈ 80 % PP ekstrakts ļāva veikt PP formulējumu standartizāciju, nodrošināja devas precizitāti un spēju secināt par iespējamajiem darbības mehānismiem, netieši parādot PP ķēdes garuma ietekmi uz membrānu afinitāti un pārvēršanās spēju par doliholu.

4.2. Formulēšanas stratēģijas lipofilajiem poliprenoliem (raksts I)

PP ir nešķīstoši ūdenī, tādēļ tika pētīti iespējamie fosfolipīdu nesēji. Stabilām sistēmām bija nepieciešami ≥40 % fosfatidilholīna un lipīds:PP > 15:1 (m/m); optimāla iekļaušana tika panākta pie 1:40 PP:fosfolipīds (Phosal 40 IP/75 SA; Lipoid P45). Šie nosacījumi minimizēja izgulsnēšanos un nodrošināja vienmērīgu iekapsulēšanu.

4.3. Liposomālās poliprenolu piegādes sistēmas izstrāde (raksts I)

Kopšķīdināšana, izmantojot modificētu etanola injekcijas metodi, nodrošināja multilamelāru vezikulu (MLV) veidošanos ar izmēru sadalījuma maksimumu ap 1,36 μm un dažām submikronu kopām. Uz perorālu ievadīšanu orientēta formulācija veicina PP tranzītu caur kuņģi un iespējamu uzsūkšanos limfātiskajā sistēmā [64], vienlaikus pasargājot PP no oksidācijas un agregācijas. Šī praktiskā forma kalpoja par pamatu tālākajiem pētījumiem ar cilvēkiem un virzīja uztura bagātinātāju izstrādi (piem., SuperCell®HEPA) [65].

4.4. Poliprenolu liposomu optimizācijas turpmākie virzieni

Mikrofluidikā balstīta etanola injekcija, ar mērķi sašaurināt izmēru sadalījumu; PEGilēšana gļotslāņa penetrācijai; marķēti PP uzsūkšanās izsekošanai Caco-2 šūnās un *in situ* zarnu cilpās; kā arī salīdzinājumi ar nanoemulsijām, micellām un cietā lipīda nodaļiņām – līdzsvarojot regulatīvās vienkāršības priekšrocības pret augstāku iekapsulēšanas efektivitāti [66], [67].

4.5. Plašāks poliprenolu farmakoloģiskais potenciāls

Preklīniskie dati (piem., no Ginkgo iegūti poliprenoli) parāda aizsargiedarbību toksiska hepatīta gadījumā; Ropren® Krievijā ir lietots klīniski hronisku aknu slimību ārstēšanā, iespējams, pateicoties membrānu stabilizācijai un antioksidantu iedarbībai [68], [69]. PP un to atvasinājumi var mēreni samazināt sterolu sintēzi pa no statīniem atšķirīgiem ceļiem. Lejupējie izoprenoīdi (piem., GGOH) *in vitro* samazina holesterīna sintēzi un ACAT aktivitāti, ar atgriezenisku ietekmi uz LDLR ekspresiju [70], [71], [72]; Kombinēts PP-fosfāts un β -sitosterols var pastiprināt lipīdu līmeni pazeminošo efektu [2], [73]. Mūsu žurkām PP holesterīna līmeni nesamazināja – kas šajā gadījumā bija vēlams iznākums, lietojot PP kopā ar statīniem [6]. Izoprenoīdu saimes savienojumi (CoQ₁₀, tokotrienoli, astaksantīns, GGOH) liecina par ticamu glikozes/insulīna signālceļu savstarpēju mijiedarbību, kas pamato ilgāku PP pētījumu veikšanu [74], [75], [76], [77]. Poliprenoli uzlaboja kognitīvās funkcijas Alcheimera slimībai līdzīgos graužēju modeļos [78]; Mūsu pētījumos ar žurkām netika konstatēts centrālās nervu sistēmas (CNS) darbības traucējumi, kas norāda uz neiroloģisku drošumu un iespējamu ieguvumu oksidatīva stresa/neiroiekaisuma apstākļos [6], [78], [79], [80], [81].

PP ir ar uzturu uzņemami prekursori doliholiem. Statīni samazina mevalonāta ceļa produktu (CoQ₁₀, doliholi, prenilēšanas donori) līmeni, pasliktinot muskuļu enerģētiku, glikozilāciju un signālpārraidi. Poliprenoli uzsūcas un tiek reducēti par doliholu; Dol-P atbalsta N-glikozilāciju ER. Dolihola papildināšana var stabilizēt sarkolemmas glikoproteīnus (piem., distroglikānus) un audu atjaunošanās spēju, kas saskan ar spēka saglabāšanās rezultātiem *in vivo* [6], [82]. Statīni var samazināt CoQ₁₀ līmeni muskuļos par 30–50 % [83]. Žurkām PP vieni paši spēja normalizēt fiziskā snieguma līmeni; klīniski PP kombinēšana ar CoQ₁₀ ir racionāla, lai novērstu divkāršus deficitus, kas saskan ar simptomu mazinājumu III rakstā un pretrunīgo literatūru par CoQ₁₀ monoterapiju [6], [7], [84].

Atorvastatīns (80 mg/kg) pasliktināja karāšanās uz stieņa un satvēriena spēka testu rezultātus žurkām; vienlaikus ievadīti PP (1–20 mg/kg) devas atkarīgā veidā atjaunoja sniegumu līdz kontroles līmenim, neietekmējot lokomociju, mācīšanos vai koordināciju. Holesterīna līmenis visās grupās nemainījās. Kreatīnkināze (KK) palielinājās ~ 25 % pie PP 20 mg/kg monoterapijas (bez funkcionāla kaitējuma), bet ne pie atorvastatīna ± PP, kas drīzāk norāda uz labdabīgu membrānu atjaunošanos, nevis bojājumu. Dati atbalsta muskuļiem mērķētu aizsardzību un atbalsta pāreju uz tālākiem pētījumiem cilvēkos [6].

4.6. Klīniskā izvērtēšana (raksts III)

- 11 SIM pacientiem 8 nedēļas ilga PP 4 mg/dienā + CoQ₁₀ 100 mg/dienā lietošana samazināja sāpju un nespēka vērtējumus (sāpes $P < 0,001$; nespēks $P = 0,018$); 40 % apsvēra statīna devas palielināšanu. Objektīvās veiktspējas izmaiņas bija minimālas – visticamāk atspoguļojot nelielu izlasi, īsu ilgumu un mērenu sākotnējo traucējumu [7].
- Nopietni nevēlami notikumi netika novēroti; KK pieaugums nebija statistiski nozīmīgs. Vienam pacientam ar HNS bija pārejoša, asimptomātiska transamināžu paaugstināšanās, kas normalizējās pēc produktu pārtraukšanas; piesardzība un monitorēšana riska grupas pacientiem ir pamatota.
- Rezultāti saskan ar datiem žurkām: funkcionāla aizsardzība/simptomu mazinājums pie zemām cilvēka devām, kombinējot ar CoQ₁₀. Lai nošķirtu PP ietekmi no kombinētās terapijas, nepieciešami kontrolēti pētījumi.

4.7. Poliprenoli, statīni un CoQ₁₀: terapeitiskais krustpunkts

PP + CoQ₁₀ komplementāri mērķē uz mevalonāta ceļa deficītiem (doliols/ER homeostāze un ubihinons/mitohondriji). Salīdzinājumā ar citām SIM pieejām (D vitamīns, karnitīns, E vitamīns) šī stratēģija ir pamatota ar bioķīmiskajiem mehānismiem un tiecas saglabāt statīnu efektivitāti, vienlaikus uzlabojot panesamību. Drošums pētījumos kopumā bija pieņemams; vienā gadījumā konstatēts atgriezenisks aknu drošuma signāls, kas prasa modrību [85], [86].

4.8. Pētījuma ierobežojumi

- Šīs doktora disertācijas ietvaros veiktajiem pētījumiem ir vairāki ierobežojumi, kas prasa izvērtējumu.
- Patiesā perorālā biopieejamība un konversija audos par doliolu joprojām nav kvantificēta; cilvēkiem lietotā deva (4 mg) var nepietiekami nodrošināt audu ekspozīciju. Farmakokinētiskie un ar marķētiem PP veikti pētījumi ir tālāka pirmā prioritāte.
- Netika veikta muskuļu histoloģija, audu doliola mērījumi, noteikts glikozilācijas statuss vai intramuskulārais CoQ₁₀ – iedarbības mehānismi tādejādi paliek netieši izsecināti.
- Augsta statīna deva, sieviešu dzimuma Wistar žurkas un salīdzinoši īss terapijas ilgums ierobežo rezultātu vispārināmību; nepieciešama hroniska, klīniski atbilstoša dozēšana ar padziļinātu audu analītiku (Raksts II).
- Atklāts dizains, neliela izlase, īss novērošanas periods un kombinācija ar CoQ₁₀ neļauj droši noteikt cēloņsakarības un modelēt devas-efekta attiecību; objektīvie funkcionālie galarezultāti lielākoties nemainījās (Raksts III).

4.9. Pētījumu nepilnības un turpmākie pētījumi

- Mehānismi: definēt PP ietekmi uz mevalonāta plūsmu, Dol-P rezervēm, glikozilāciju, prenilēšanu un mitohondriju signalizāciju (stabilu izotopu izsekošana; mērķēta proteomika) [9], [27].
- Piegāde/PK: tiešs salīdzinājums liposomas pret nanoemulsijām/micellām; cilvēku PK/PD, audu sadalījums un konversijas kinētika [40], [87], [88].
- Klīniskie pierādījumi: pietiekami jaudīgi RKB SIM populācijā ar PZR, KK un MR muskuļu tauku frakciju; faktoriāla dizaina atzari (PP monoterapija vs CoQ₁₀ monoterapija vs kombinācija); sportistu krustotais pētījums oksidatīvā stresa apstākļos [78], [89], [90], [91], [92].
- Salīdzinājumi: pozicionēšana attiecībā pret PCSK9 inhibitoriem, bempedisko skābi un inklisirānu statīnu nepanesības aprūpes terapijās [85], [93], [94], [95], [96].
- Standartizācija/drošums: GMP klases PP homologo profili, formulāciju sēriju atkārtojamība, zāļu un uztura bagātinātāju mijiedarbība, ilgtermiņa aknu un nieru drošums, kā arī kaulu veselība.
- Personalizācija/omika: farmakogenomika SIM riska izvērtēšanai [97], [98]; multiomika pacientu kartēšanai terapijas laikā [99], [100], [101].

4.10. Noslēguma piezīmes

Šī disertācija sniedz: (i) farmaceutiski reālistisku liposomālu PP formulāciju; (ii) preklīnisku koncepcijas pierādījumu SIM mazināšanai; un (iii) pirmreizēju drošuma/izpildāmības novērtējumu cilvēkiem PP + CoQ₁₀ terapijai. Kopumā no augiem iegūti PP mazināja ar statīniem saistītos muskuļu simptomus *in vivo* un izpētes klīniskā vidē – īpaši kombinācijā ar CoQ₁₀ – nepasliktinot lipīdu kontroli. Šie rezultāti pamato stingri kontrolētu pētījumu, PK/PD raksturošanas un piegādes sistēmu pilnveides nepieciešamību, lai iekļautu PP precīzijas stratēģijās statīnu nepanesamībai, metabolā sindroma gadījumā un ar vecumu saistītas veiktspējas mazināšanas kontekstā.

Disertācijas mērķis: parādīt, ka skujkoku izcelsmes poliprenoli – caur ķīmisko raksturošanu, liposomālu formulēšanu, preklīniskās efektivitātes pārbaudēm un izpētes klīnisko pētījumu – var papildināt no mevalonāta atkarīgos starpproduktus un kalpot kā drošs, efektīvs papildlīdzeklis statīnu izraisītu miopātiju (SIM) profilaksei vai mazināšanai.

5. SECINĀJUMI

Statīnu izraisīta miopātija (SIM) ierobežo lipīdus pazeminošās terapijas ievērošanu. Šī disertācija izveido pilnu translācijas loku skujkoku izcelsmes poliprenoliem – no ķīmiskās definēšanas un liposomālās piegādes līdz preklīniskai efektivitātei un pirmreizējai izpētei cilvēkos – mērķējot kupēt mevalonāta ceļa iztrūkstošos produktus (dolihols, ubihinons), lai saglabātu muskuļu funkciju, nepasliktinot statīnu sniegto ieguvumu.

5.1. Paveikta ķīmiskā raksturošana

- UHPLC-DAD-MS noteica desmit homologus (Pren-11 → Pren-20) *Abies sibirica/Picea abies*, ar dominējošu Pren-15 (~ 37 %).
- Reproducējams PP profils izpildīja 1. mērķi, nodrošinot konsekventu dozēšanu un gatavību formulācijas regulatīvo prasību izpildei.

5.2. Izstrādāta inovatīva liposomāla piegādes forma

- Modificēta etanola injekcija/kopšķīdināšana ar fosfatidilholīnu (≥ 40 % no lipīda; PP/lipīds ~ 1:33–1:40, m/m) radīja stabilas multilamelāras vezikulas (modālais diametrs ~ 1,36 μm ; stabilitāte ≥ 6 mēneši).
- Izpildīts 2. mērķis: sistēma saglabā PP integritāti, pārvar hidrofobitāti un ir piemērota lietošanai *in vivo*.

5.3. Preklīniskā efektivitāte žurku SIM modelī

- Sieviešu Wistar žurkām, kuras saņēma atorvastatīnu 80 mg/kg/dienā, skuju poliprenoli (1–20 mg/kg/dienā) novērsa pasliktināšanos karāšanās uz stieņa un satvēriena spēka testos, neizmainot uzvedību, holesterīnu un neizraisot toksicitāti.
- Izpildīts 3. mērķis, apstiprinot devas atkarīgu muskuļu aizsardzību, kas saskan ar dolihola papildināšanu un antioksidatīvo iedarbību.

5.4. Pirmreizējs drošuma novērtējums cilvēkiem un koncepta pierādījums

- 8 nedēļu atklāts pilotpētījums (n = 11) ar poliprenoliem 4 mg/dienā + CoQ₁₀ 100 mg/dienā pacientiem ar apstiprinātu SIM samazināja sāpju un nespēka

vērtējumus, 40 % dalībnieku ļāva apsvērt statīna devas paaugstināšanu un uzrādīja labdabīgu drošuma profilu (bez nopietniem NNI; bez KK pīķiem).

- Izpildīts 4. mērķis, demonstrējot panesamību ar sākotnēju efektivitāti.

5.5. Stratēģiskās terapeitiskās implikācijas

- Poliprenolu + CoQ₁₀ kombinācija risina komplementāru mevalonāta ceļa deficītu (doliols un ubihinons), labvēlīgi salīdzinoties ar esošajām SIM stratēģijām, jo mazina miotoksicitāti, vienlaikus saglabājot statīnu lipīdus pazeminošo efektu.
- Liposomālās piegādes formas varētu tikt izmantotas arī citās situācijās, ko raksturo mevalonāta nepietiekamība vai oksidatīvs membrānu stress (piem., sarkopēnija, NAFLD).

5.6. Turpmāko pētījumu virzieni

- II fāzes RKB: placebo-kontrolēti pētījumi, lai apstiprinātu efektivitāti, noteiktu optimālo dozēšanu un nošķirtu mono- pret kombinētās terapijas efektu.
- Mehānisma biomarķieri: stabila izotopu izsekošana PP → doliols, muskuļu Dol/Dol-P kvantifikācija, glikoproteīnu/prenilēšanas statuss un mitohondriju/ER funkcijas attēldiagnostika.
- Formulācija/PK: atsevišķu homologu farmakokinētika; mikrofluidiska izmērošana; nanoemulsiju/polimēru nesēju izpēte biopieejamības uzlabošanai.

Kopumā disertācija apraksta loģisku ceļu no laboratorijas līdz klīnikai, nosakot PP ķīmiskos profilus, optimizējot perorālo piegādi, demonstrējot muskuļu aizsardzību dzīvniekiem un uzrādot pozitīvus klīniskos iznākus, tādējādi atbalstot virzību uz lielākiem randomizētiem klīniskajiem pētījumiem. Ārpus SIM šī platforma paver plašāku pielietojumu izoprenoīdu deficīta un oksidatīvā stresa slimībās, veidojot pamatu turpmākām terapeitiskām inovācijām.

6. PATEICĪBAS

Vispirms vēlos izteikt visdziļāko pateicību savai promocijas darba vadītājai, *Dr. med.*, prof. **Baibai Jansonei**, par neizsīkstošu atbalstu un mentora darbu visā šajā deviņu gadu ceļā. Viņas ticība manām spējām, arī tajos brīžos, kad dzīves apstākļu dēļ man vajadzēja apturēt darba izstrādi, uzturēja manu motivāciju. **Prof. Jansone** ne vien vadīja mani zinātniski, bet arī iedvesa pārlicību neatlaidīgi turpināt un raudzīties uz sevi kā uz zinātnieci, kas spēj pabeigt šo darbu.

Sirsnīgi pateicos arī saviem bijušajiem darba devējiem – **AS “Biolat”** un **SIA “Silv EXPO”** – par finansiālo un nozares atbalstu, kas būtiski atviegloja manu pētniecības projektu īstenošanu. Piedāvātā elastība, ļaujot apvienot pilna laika darbu ar doktora studijām, patiesi daudz ko mainīja. Īpaša pateicība *Dr. Uģim Klētniekam*, kura iedrošinājums uzsākt doktorantūru bija izšķirošs, kā arī **Viesturam Vārpiņam** par pastāvīgu atbalstu.

Esmu pateicīga arī saviem zinātniskajiem konsultantiem un sadarbības partneriem, kuri sniedza ieguldījumu pētījumos, uz kuriem balstās šī disertācija, jo īpaši *Dr. habil. med.*, prof. **Rutai Muceniecei** un prof. *Dr. med.* **Gustavam Latkovskim**, kuru kompetenci un atbalstu procesa gaitā augsti novērtēju.

Ar pateicību atzīmēju finansiālo atbalstu, kas ļāva īstenot šo pētījumu. Darbs tika atbalstīts vairāku Kompetences centra projektu ietvaros, tostarp:

P20 projekts “Bioaktīvo vielu iekapsulēšanas fosfolipīdu liposomās tehnoloģijas izstrāde” (Līguma Nr. 1.2.1.1/16/A/005).

P29 projekts “Skujkoku izoprenoīdu spirtu bioloģiskās aktivitātes pētījumi patoloģiju modeļos” (Līguma Nr. L-KC-11-0001).

Papildus esmu pateicīga par **Latvijas Universitātes** piešķirto doktora stipendiju (CFLA finansējums) **projekta Nr. 8.2.2.0/18/A/010 “Akadēmiskā personāla atjaunotne un kompetenču pilnveide Latvijas Universitātē”** ietvaros (01.11.2021–01.01.2022).

Personiskā līmenī vēlos pateikties man tuvākajiem cilvēkiem, kuri dalīja ar mani šī ceļa grūtības. Mans līgavainis **Pāvels Ostrovskis**, kurš aizgāja mūžībā 2014. gadā, pats studējot doktorantūrā, iedvesmoja mani ar savu zinātnisko aizrautību. Pāri visam – paldies manam vīram **Andrim Vanagam** par neizsīkstošu pacietību, iedrošinājumu un mīlestību. Viņa atbalsts bija pamats, kas ļāva pabeigt šo darbu par spīti darba, ģimenes un veselības izaicinājumiem.

Šī doktora darba pabeigšana no manis prasīja vairāku paralēlu darbu salāgošanu, turklāt ar divu mazus bērnu audzināšanu un personisku pārbaudījumus pārvarēšanu. Bija brīži, kad šaubījies, vai nestie upuri ir tā vērti. Tomēr šis sasniegums ir liecība par cilvēciskā gara izturību un par to neticamo atbalstu, ko esmu saņēmusi no savas ģimenes, draugiem, kolēģiem un mentoriem.

*Šis darbs ir veltīts maniem bērniem un manas vecmāmiņas –
Janīnas Blaževičas (1932–2011) –
piemiņai, kura pirmā iedēstīja manī mīlestību pret zināšanām
un atbalstīja mani agrīnajos dzīves gados, veidojot to cilvēku un pētnieci,
par kādu esmu kļuvusi.*



UNIVERSITY OF
LATVIA

FACULTY OF MEDICINE AND LIFE SCIENCES

Ilona Vanaga

**THERAPEUTIC POTENTIAL
OF CONIFER-DERIVED POLYPRENOL
FORMULATIONS IN MITIGATING
STATIN-INDUCED MUSCLE MYOPATHY**

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Submitted for Doctor Degree in Basic Medical Science
including Pharmacy
Subfield of Pharmaceutical Pharmacology

Riga 2026

The doctoral thesis study was carried out at the University of Latvia, Faculty of Medicine and life science (former Faculty of Medicine, Department of Pharmacology (Riga, Latvia) from 2016–2025.

The thesis consists of 8 chapters.

Form of the thesis: dissertation in Basic Medical Science including Pharmacology, subfield of Pharmaceutical Pharmacology.

Supervisor: *Dr. med.*, Prof. **Baiba Jansone**, University of Latvia.

Co-advisor: *Dr. habil. biol.*, Prof. **Ruta Muceniece**, University of Latvia.

Reviewers:

- 1) *Dr. med.*, Professor **Una Riekstiņa**, University of Latvia.
- 2) *Dr. pharm.*, Professor **Dace Bandere**, Riga Stradiņš University.
- 3) *Dr. sc. (Tech.)*, Senior Researcher **Risto I. Korpinen**, Natural Resources Institute Finland (Luke).

The thesis will be defended at the public session of the Promotion Council for Medical and Health Sciences of the University of Latvia, _____
_____.

The thesis is available at the _____.

This thesis is accepted for the commencement of the degree of Doctor of Medicine on ____ 2026 by the Promotion Council for Medical and Health Sciences of the University of Latvia.

Chairman of the Promotion Council _____/
Dr. med., Professor **Valdis Pirāgs**

Secretary of the Promotion Council _____/
Dr. biol., Associated Professor **Līga Plakane**

© University of Latvia, 2026

© Ilona Vanaga, 2026

ISBN 978-9934-36-566-9

ISBN 978-9934-36-567-6 (PDF)

ABSTRACT

Polyprenols are long-chain isoprenoid alcohols richly present in conifer needles such as *Abies sibirica* (Siberian fir) and *Picea abies* (Norway spruce). After enzymatic reduction to dolichols they sustain protein N-glycosylation, modulate membrane fluidity and quench lipid peroxidation. By inhibiting 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, statins lower endogenous dolichol and CoQ₁₀ (ubiquinone); dolichol depletion impairs N-glycosylation and destabilizes muscle membranes, while CoQ₁₀ depletion undermines mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) generation and antioxidant defense – mechanisms implicated in statin-induced myopathy (SIM). On this basis, we tested whether oral conifer polyprenols (dolichol precursors), together with complementary CoQ₁₀, can replete mevalonate-pathway products and lessen SIM.

Analytical work highlighted ten polyprenol homologues (Pren-11 → Pren-20) in an 80 % purified Siberian-fir extract, with Pren-15 dominant ($\approx 37\%$). A modified ethanol-injection technique co-solubilised the extract with phosphatidylcholine, yielding multilamellar liposomes (1.3 μm modal diameter, > 70 % encapsulation, six-month stability) that overcome poor oral availability.

In vivo, spruce polyprenols (1, 10, 20 mg/kg/day prevented atorvastatin-induced grip-strength loss in rats without affecting behaviour or plasma cholesterol, while separate immobilisation-stress model demonstrated protection of spatial memory and normalisation of corticosterone.

A first-in-human, open-label pilot (n = 11) administered polyprenols 4 mg/day plus CoQ₁₀ 100 mg/day for eight weeks to patients with verified SIM. Muscle-pain and weakness scores fell by 50 % and 40 % respectively; four participants considered statin re-titration. Laboratory safety parameters stayed within normal ranges, supporting good tolerability; however, interpretation is limited by the small sample size and the absence of a placebo-controlled comparison.

Together these studies establish conifer polyprenols as rational adjunct to statin therapy. Polyprenols can replenish dolichol pools, bolster antioxidant defences and, when formulated as liposomes, achieve more acceptable bioavailability. These findings warrant a randomised controlled trial to confirm clinical efficacy and define optimal dosing.

Keywords: polyprenols; dolichols; statin-induced myopathy; mevalonate pathway; liposomal delivery; therapeutic bioavailability

CONTENTS

ABBREVIATIONS	54
INTRODUCTION	56
1. THEORETICAL BACKGROUND	61
1.1. Research problem	61
1.2. Hypothesis	61
1.3. Polyphenols: sources, chemical properties, and biological roles	62
2. MATERIALS AND METHODS	66
2.1. Polyphenol analysis and quantification	66
2.1.1. UHPLC analysis	66
2.1.2. Sample preparation for UHPLC analysis	66
2.1.3. Reverse-phase UHPLC analysis	66
2.1.4. Identification of polyphenols by TOF LC/MS	67
2.1.5. Preparation of proliposomal polyphenol solution	67
2.1.6. Determination of solubility of polyphenols	67
2.1.7. Polyphenol incorporation efficiency into liposomes	67
2.1.8. The HPLC determination of polyphenols in liposomes	67
2.1.9. Preparation for microscopy	68
2.1.10. Size distribution of liposomes containing polyphenols	68
2.2. <i>In vivo</i> animal experiments	68
2.2.1. Substances used for <i>in vivo</i> animal experiments	68
2.2.2. Experimental animals	68
2.2.3. Ethics of experimental animals	68
2.2.4. Experimental design	68
2.2.5. <i>In vivo</i> behavioural methods	69
2.2.6. Biochemical analysis	70
2.2.7. Statistics	70
2.3. Pilot study of safety and efficacy of polyphenols	70
2.3.1. Design and patients	70
2.3.2. Data collection	70
2.3.3. Statistical analysis	71
3. RESULTS	72
3.1. Results of polyphenol analysis and quantification	72
3.1.1. The identification of Siberian fir (<i>Abies sibirica</i> L.) polyphenol homologues	72

3.1.2.	Solubility in ethanol/lecithin systems and incorporation efficiency	73
3.1.3.	Morphological observations of polyphenol-loaded liposomes	75
3.2.	Spruce needle polyphenol studies in rats	76
3.2.1.	Muscle strength/tone and coordination	76
3.2.2.	General locomotor activity	77
3.2.3.	Learning/memory	77
3.2.4.	Analgesic activity	78
3.2.5.	Plasma cholesterol and creatine kinase (CK)	79
3.3.	Safety and efficacy of polyphenols (pilot study)	79
3.3.1.	Baseline characteristics	79
3.3.2.	Safety	82
3.3.3.	Muscle symptoms	84
3.3.4.	Dynamometry, exercise test and physical activities	85
4.	DISCUSSION	87
4.1.	Biochemical characterization of conifer polyphenols (paper I)	88
4.2.	Formulation strategies for lipophilic polyphenols (paper I)	88
4.3.	Development of a liposomal polyphenol delivery system (paper I)	88
4.4.	Future directions of polyphenol liposome optimization	88
4.5.	Broader pharmacological potential of polyphenols	88
4.6.	Clinical evaluation (paper III)	89
4.7.	Polyphenols, statins, and CoQ ₁₀ : a therapeutic intersection	90
4.8.	Study limitations	90
4.9.	Research gaps and future studies	90
4.10.	Concluding remarks	91
5.	CONCLUSIONS	92
5.1.	Chemical characterization achieved	92
5.2.	Innovative liposomal delivery platform developed	92
5.3.	Preclinical efficacy in a rat SIM model	92
5.4.	First-in-human safety and proof-of-concept	92
5.5.	Strategic therapeutic implications	93
5.6.	Future directions	93
6.	ACKNOWLEDGEMENTS	94
	REFERENCES	96

ABBREVIATIONS

ADP	Adenosine diphosphate	AKT	Protein kinase B
ALAT	Alanine aminotransferase	AP	Alkaline phosphatase
ASAT	Aspartate aminotransferase	AT	Atorvastatin
ATP	Adenosine triphosphate	BACE1	B-site APP-cleaving enzyme 1
bpm	Beats per minute	CABG	Coronary artery bypass grafting
CDP-ribitol	Cytidine diphosphate ribitol	CDP	Cytidine diphosphate
CK	Creatine kinase	CoQ10	Coenzyme Q (ubiquinone)
CRP	C-reactive protein	DAD	Diode Array Detector
DBP	Diastolic blood pressure	DOLK	Dolichol kinase
Dol-P	Dolichol phosphate	EA	Ethyl acetate
DPM	Dolichol-phosphate mannose (synthase)	ECG	Electrocardiogram
FT3	Free triiodothyronine	ESI	Electrospray ionization
GCT	Germ cell tumor	FT4	Free thyroxine
GGOH	Geranylgeraniol	GFR	Glomerular filtration rate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	GGT	Gamma-glutamyl transferase
GSHP	Glutathione peroxidase	GSH	Glutathione
HIV	Human immunodeficiency virus	HDL	High-density lipoprotein
HPLC	High-performance liquid chromatography	HMG-CoA	Methylglutaryl-coenzyme A
IPP	Isopentenyl pyrophosphate	HRMS	High-resolution mass spectrometry

LC/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry	LDL	Low-density lipoprotein
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol	MLV	Multilamellar vesicles
MDA	Malondialdehyde	mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MS	Mass spectrometry	NLCs	Nanostructured lipid carriers
NO	Nitric oxide	PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PCI	Percutaneous coronary intervention	PP(s)	Polyprenol(s)
PDI	Polydispersity index	Pren	Polyprenol homologue shorthand
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)	rpm	Revolutions per minute
PVD	Food and Veterinary Service (Latvia)	SIM	Statin-induced myopathy
SLNs	Solid lipid nanoparticles	SOD	Superoxide dismutase
SRD5A3	Steroid 5 alpha-reductase 3	TLC	Thin layer chromatography
TEM	Transmission electron microscopy	TOF	Time-of-Flight
TSH	Thyroid-stimulating hormone	25OH-D	25-hydroxy vitamin D
UHPLC	Ultra-high performance liquid chromatography		

INTRODUCTION

Statin therapy remains the cornerstone of atherosclerotic cardiovascular disease prevention, yet its long-term effectiveness is undermined by statin-induced myopathy (SIM), a frequent cause of dose reduction or discontinuation. Accumulating evidence links SIM to collateral inhibition of the mevalonate pathway, depleting not only cholesterol but also essential isoprenoids that sustain mitochondrial bioenergetics and protein N-glycosylation. Within this context, plant-derived polyprenols, long-chain isoprenoid alcohols abundant in conifers and precursors to dolichols, offer a mechanistically grounded opportunity to restore dolichol-dependent glycoprotein assembly. Co-supplementation with coenzyme CoQ₁₀ provides a complementary strategy aimed at preserving muscle function without compromising lipid lowering.

This doctoral work builds a translational arc from chemistry to clinic. First, it defines a reproducible chemical fingerprint for conifer polyprenols (Pren-11 → Pren-20, Pren-15 dominant), establishing the analytical basis for quality control and dosing. Second, it addresses the long-standing barrier of hydrophobicity by developing a phosphatidylcholine-rich, ethanol-injection liposomal platform that achieves high encapsulation and suitability for oral use. Third, in a rat model of high-dose atorvastatin myopathy, polyprenols prevented declines in wire-hang and grip strength without behavioral toxicity or interference with cholesterol levels, consistent with dolichol repletion. Finally, an exploratory, eight-week, first-in-human pilot in verified SIM patients evaluated daily polyprenols combined with CoQ₁₀, demonstrating good tolerability alongside clinically meaningful reductions in pain and weakness scores, and enabling consideration of statin re-escalation in a subset of participants. Together, these studies position conifer-derived polyprenols, alone and with CoQ₁₀, as a promising adjunct to improve statin tolerability, motivate phase II randomized trials, and open broader avenues for treating disorders characterized by isoprenoid insufficiency.

GOALS AND OBJECTIVES OF THE DOCTORAL THESIS

The goal of the doctoral thesis

To demonstrate that conifer-derived polyphenols – through chemical characterisation, liposomal formulation, pre-clinical efficacy testing and exploratory clinical study – can replenish mevalonate-dependent intermediates and serve as a safe and effective adjunct for alleviating muscle-related adverse effects (SIM) associated with statin therapy.

Objectives of the thesis

- 1) Define the chemical signature of conifer-derived polyphenols
 - Isolate and quantify individual homologues (Pren-11 → Pren-20) from *Abies sibirica* and *Picea abies* using UHPLC-DAD-MS to establish purity, chain-length distribution and dominant species
- 2) Optimise an oral delivery platform for polyphenols
 - Develop a phosphatidylcholine-based multilamellar liposomes by modified ethanol-injection; determine particle size, encapsulation efficiency, and stability.
- 3) Demonstrate pre-clinical efficacy against statin-induced myopathy
 - In a rat model receiving high-dose atorvastatin, evaluate polyphenol (1, 10, 20 mg/kg/day) protection of muscle strength and behavioural endpoints; measure serum creatine kinase, cholesterol and stress-related biomarkers to characterise mechanistic benefit.
- 4) Generate first-in-human safety and proof-of-concept data
 - Conduct an eight-week open-label pilot of polyphenols 4 mg/day plus CoQ10 100 mg/day in patients with confirmed SIM; record changes in pain, weakness, willingness to re-escalate statin dose, and laboratory safety indices.

Thesis for defense

- 1) We are the first to show that exogenous conifer-derived polyphenols can reconstitute the dolichol pool that is secondarily depleted by statin blockade of the mevalonate pathway. In rat SIM models, this biochemical rescue translates into complete normalisation of grip-strength and hanging-time despite high-dose atorvastatin.
- 2) We developed a novel method based upon co-solubilization and a modified ethanol injection approach within an ethanol-phospholipid system (liposomes) that provides an improved strategy for encapsulating hydrophobic bioactive compounds, particularly polyphenols. This technological approach

improves their bioavailability, thus addressing traditional limitations associated with their poor gastrointestinal absorption and solubility.

- 3) Our first-in-human pilot demonstrates that, eight-week daily co-supplementation of polyprenols (4 mg) + CoQ₁₀ (100 mg) produced a 50 % reduction in muscle-pain scores and allowed 40 % of symptomatic patients to consider increase in the statin dose, with no laboratory indices or neuro-behavioural changes. This establishes the polyprenol preparation as a realistic long-term adjunct for statin-intolerant individuals and justifies a placebo-controlled phase-II trial.
- 4) Because polyprenols (i) restore dolichol-dependent glycosylation, (ii) stabilise membrane lipids and (iii) act as chain-length-selective antioxidants, they can be a versatile ingredient. The liposomal technology developed here enables their incorporation into oral food supplements and fixed-dose medical formulations aimed not only at statin-induced myopathy (SIM) but also at any condition characterised by mevalonate-pathway insufficiency or oxidative membrane stress (e.g., age-related sarcopenia, non-alcoholic fatty liver disease).

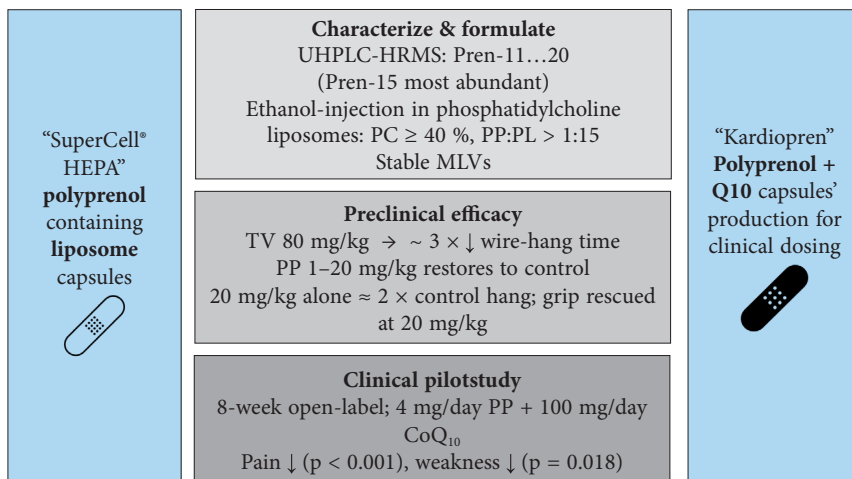


Fig. 1. Graphical abstract.

Publications

This thesis is based on the following papers, which are referred to in the text by their Roman numerals

Paper I **Vanaga, I.**, Gubernator, J., Nakurte, I., Kletnieks, U., Muceniece, R., Jansone, B. (2020) Identification of *Abies sibirica* L. Polyprenols

and Characterisation of Polyphenol – Containing Liposomes. *Molecules* 25, 1801. <https://doi.org/10.3390/molecules25081801>.

Paper II Jansone, B., Dzirkale, Z., Jekabsons, K., Pilipenko, V., Beitnere, U., Magure, I., Skumbins, R., Kletnieks, U., **Vanaga, I.**, Muceniece, R., Klusa, V. (2016). Spruce needle polyphenols protect against atorvastatin-induced muscle weakness and do not influence central nervous system functions in rats. *Proc. Latv. Acad. Sci., B Nat. exact appl. sci.*, 70. <https://doi.org/10.1515/prolas-2016-0003>

Paper III Latkovskis, G., Saripo, V., Sokolova, E., Upite, D., **Vanaga, I.**, Kletnieks, U., Erglis, A. (2016). Pilot study of safety and efficacy of polyphenols in combination with coenzyme Q10 in patients with statin-induced myopathy. *Medicina*, 52, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2016.05.002>.

Other publications

Ušacka, L., Plakane, L., **Vanaga, I.**, Klētnieks, K., Jansone, B., Muceniece, R., Klētnieks, U., Pahirko L. (2022). Polyphenol liposomes improve the efficiency of oxygen usage in welltrained amateur athletes. *Proc. Latv. Acad. Sci., B Nat. exact appl. sci.*, 76 (1), 58–63.

Patents

1. Vanaga, I., Rateniece, A., Kletnieks, U. A nutritional supplement for improvement of muscle strength and load tolerance. Latvian Patent No. LV 15 338 B. 17.04.2018.
2. I. Vanaga, U. Kletnieks. Nutritional supplement for heart health. Latvian Patent No. LV 15057 B. A23L1/30, A23L1/302, A61K36/13, A61K36/55. 20.12.2015.

Conference thesis

1. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Jansone, B., Muceniece, R. Ancient survivors – conifer polyphenol studies for modern applications. 2nd Drug Discovery Conference, September 22–24, 2022, Riga, Latvia.
2. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Ancāns, J., Blāķe, I., Gubernator, J., Jansone, B. *In vitro* study to assess the safety profile of conifer needle extractives for potential topical applications. 76th University of Latvia International Scientific Conference on Medicine, February 23rd, 2018, Riga, Latvia.
3. **Vanaga, I.**, Nakurte, I., Rozenstoka, S., Steina, S., Suna, D., Kletnieks, U., Jansone, B. Characterization of *Abies Sibirica* L. needle polyphenols and safety of their liposome product in marathoners”. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and 10th International Conference on Biodiversity. Athens, Greece, November 25–29, 2018.

4. **Vanaga, I.**, Ancans, J., Blake, I., Kletnieks, U., Gubernator, J. The effects of conifer polyprenol nanoemulsions on skin cell culture proliferation rate and gene expression levels of structural proteins, growth factor and inflammatory cytokines. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology . Kyoto, Japan, July 1–7, 2018.
5. **Vanaga, I.**, Gubernator, J., Kletnieks, U., Plakane, L., Plakane, L., Muceniece, R., Jansone, B. Physico-chemical characterization of polyprenol-loaded liposomes. 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets, October 19–20, 2017, Riga, Latvia. Abstract. *Intrinsic Activity*, 2017; 5(Suppl.2):A2.32. doi:10.25006/IA.5.S2-A2.32 doi:10.25006/IA.5.S2-A2.32
6. **Vanaga, I.**, Klētnieks, U., Plakane, L., Plakane, L., Muceniece, R., Jansone, B. Development of polyprenol proliposomes. 75th Scientific Conference of the University of Latvia, February 24, 2017, Riga, Latvia.
7. **Vanaga, I.**, Nakurte. I., Korica, A.M., Polis, O., Muceniece, R., Jansone, B. Composition profiles of various conifer polyprenols. 75th Scientific Conference of the University of Latvia, February 24, 2017, Riga, Latvia.
8. **Vanaga, I.**, Nakurte, I., Jekabsons, K., Muceniece, R., Jansone, B., Klusa, V., Latkovskis, G., Saripo, V., Kletnieks, K., Kletnieks, U. Advances in research of polyprenol chemistry and biological activity. 6th Global Summit on Medicinal and Aromatic Plants, May 23–26, 2016, Riga, Latvia. Abstract book p. 18.
9. **Ilona Vanaga**, Ilva Nakurte, Ewa Swiezewska, Ausma Korica, Ugis Kletnieks, Ruta Muceniece. Separation of polyprenols isolated from *Picea abies* L. spruce needles by ultra-performance-liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry. 7th EU FP project Innovabalt and Latvian institute of organic synthesis, August 27–29, 2015, Riga, Latvia. Abstract OP53, 73.
10. Jansone, B., Dzirkale, Z., Jekabsons, K., Pilipenko, V., Beitnere, U., Skumbins, R., Kletnieks, K., **Vanaga, I.**, Muceniece, R., Klusa, V. Polyprenols isolated from *Picea abies* L. spruce needles influence atorvastatin-mediated muscle strength weakness in *Wistar* female rats. IUPHAR World Conference on the Pharmacology of Natural and Traditional Medicine, July 22–24, 2015, Singapore, Singapore. Abstract. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.*, 29 (1), 113.
11. **Ilona Vanaga**, Baiba Jansone, Gustavs Latkovskis, Vita Saripo, Vija Klusa, Ruta Muceniece, Kaspars Jekabsons, Karlis Kletnieks. Polyprenol effects on blood biochemical parameters in Atorvastatin-induced myasthenia model rats and humans with statin-induced myopathies. NUGO: Mechanisms of a long-life health, September 7–9, 2015, Barcelona, Spain. Abstract book p. 133.

1. THEORETICAL BACKGROUND

1.1. Research problem

Statin-induced myopathy (SIM) represents one of the principal barriers to lifelong lipid-lowering therapy. Its pathogenesis is increasingly attributed to collateral inhibition of the mevalonate pathway – a biosynthetic route that feeds not only cholesterol but also a range of isoprenoids essential for mitochondrial bioenergetics and N-glycoprotein assembly. Accordingly, the downstream products polyprenols and coenzyme Q10 constitute the central focus of this doctoral dissertation.

In contrast to CoQ₁₀, the role of polyprenols in statin-induced muscle pathology has received comparatively less attention. Given their critical function as precursors to dolichols and their involvement in glycoprotein biosynthesis, a reduction in polyprenol levels could contribute to impaired cellular repair and membrane integrity in muscle tissue. Moreover, the potential antioxidant and cytoprotective effects of polyprenols suggest that their supplementation might help counteract the oxidative and metabolic stresses induced by statin therapy [1], [2].

Notably, the combined therapeutic potential of polyprenols and CoQ₁₀ has not been investigated. Considering that these compounds operate in complementary pathways – one primarily safeguarding mitochondrial bioenergetics and the other ensuring proper protein modification and membrane stability – their co-administration could potentially offer synergistic benefits in mitigating SIM.

1.2. Hypothesis

Conifer-derived polyprenols, formulated for oral delivery and combined where appropriate with CoQ₁₀, can alleviate SIM while preserving lipid-lowering efficacy.

This dissertation addresses the plausibility that exogenous, conifer-derived polyprenols long-chain isoprenoid alcohols naturally abundant in needles of *Abies sibirica* and *Picea abies* – can be converted *in vivo* to dolichols and support N-glycosylation and membrane integrity in skeletal muscle. The problem is not purely biochemical. Polyprenols are profoundly hydrophobic, demonstrate minimal aqueous solubility, and historically suffered from poor oral bioavailability. Accordingly, our research integrates analytical chemistry, delivery (phosphatidylcholine-rich liposomes), a controlled rat model of SIM,

and an exploratory clinical study in verified SIM patients to test mechanistic and translational hypotheses [2], [3], [4], [5], [6], [7].

The thesis contributes: (i) a reproducible analytical fingerprint for conifer polyprenols anchored by a dominant Pren-15 species (~ 37 % of total), enabling quality control and dose justification; (ii) an ethanol-injection/co-solubilisation strategy that reliably produces multilamellar liposomes and overcomes absorption barriers; (iii) dose-dependent rescue of muscle strength in an atorvastatin model without behavioural confounds; and (iv) first-in-human feasibility and tolerability of daily polyprenols 4 mg/day + 100 mg/day CoQ₁₀ in verified SIM [5], [6], [7], [8].

1.3. Polyprenols: sources, chemical properties, and biological roles.

Polyprenols are widespread naturally occurring long-chain isoprenoid alcohols found throughout the plant kingdom, especially abundant in coniferous trees such as *Picea abies* (Norway spruce), and various pine species [9], but also *Ginkgo biloba*. As can be seen in Fig. 2, they consist of multiple isoprene units, with chain lengths that can vary significantly depending on the plant source, typically ranging from 15 to over 100 isoprene units [4], [10]. Polyprenols exist in various forms, including free alcohols, esters with carboxylic acids, and phosphates [10].

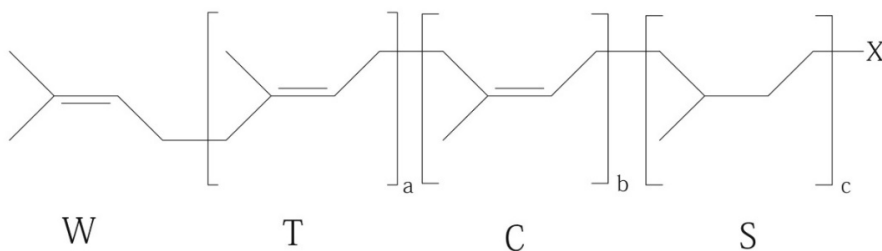


Fig. 2. Common formula of polyisoprenoid alcohols and their phosphates.

W, x-isoprene unit; T, trans-isoprene unit; C, cisisoprene unit;

S, 2,3-dihydroisoprene unit; a, b, and c means a number of T, C, and S-isoprene

units, respectively; S = 0 (for polyprenols) or 1 (for 2,3-dihydropolyprenols); X, OH for polyprenols and dihydropolyprenols (dolichols); and X, -O-PO₃²⁻ for polyprenyl phosphates and 2,3-dihydropolyprenyl (dolichyl) phosphates. Adapted from (Pronin et al., 2014) [2]

The structural difference between polyprenols (α-unsaturated) and dolichols (α-saturated) is significant in their biological functions [11], [12]. Isoprenoids

are lipophilic, contributing to their ability to integrate into lipid membranes and affect membrane fluidity [13].

Extraction methods strive to preserve chain integrity and bioactivity. Supercritical CO₂ (SC-CO₂) yields high-purity, solvent-free material suitable for pharmaceutical use, though at higher capital cost [9], [14], [15].

Conventional solid-liquid extraction remains scalable but co-extracts impurities and requires substantial solvent removal [16]. Process-intensified routes – ultrasound- and microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction – shorten cycle times and reduce solvent burden but demand careful control to avoid thermal degradation [17], [18], [19]. Enzyme-assisted extraction improves selectivity under mild conditions, while ionic-liquid systems offer tunable solvation at the expense of cost and regulatory maturity [20], [21]. Method choice balances purity, throughput, footprint, and economics, with SC-CO₂ preferred when pharmaceutical-grade fractions are needed.

Ginkgo biloba leaves illustrate the co-occurrence of polyprenols with flavonoids and terpenoids that together confer antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, and hepatoprotective effects [2], [22], [23]. Conifer-derived polyprenols similarly exhibit broad bioactivity: in *Pinus massoniana* preparations they enhanced total antioxidative capacity and key enzymes (SOD, GSH-Px) while lowering MDA, NO, and BACE1-biomarker shifts aligned with neuroprotection against oxidative and inflammatory insults [24]. Beyond direct antioxidant effects, polyprenols show antibacterial activity and immunomodulation, including up-regulation of interferons and activation of innate cells, with antiviral activity reported for phosphate fractions [2], [9], [25], [26].

In animals and humans, dietary polyprenols enter a tightly regulated metabolic network centered in the endoplasmic reticulum. They are elongated by cis-prenyltransferases from IPP (mevalonate pathway), generating species-specific chain lengths that influence solubility, membrane anchoring, and enzyme recognition [27]. Polyprenol reductase (encoded by SRD5A3) then saturates the terminal α -isoprene to produce dolichols, which are phosphorylated to dolichol phosphate-the indispensable lipid carrier for N-linked glycosylation and GPI anchor biosynthesis [4], [11], [28], [29]. Disruption of this reduction (e.g., SRD5A3 mutations) causes polyprenol accumulation with secondary dolichol deficiency and congenital disorders of glycosylation, underscoring clinical relevance [4], [27]. Chain length and saturation modulate interactions with the glycosylation apparatus and thus the efficiency of downstream glycoprotein assembly.

The functional portfolio of polyprenols and their phosphate derivatives spans protein processing (cofactors for N-/O-glycosylation; putative roles in protein prenylation), lipid-linked sugar transport, antioxidant defense, neuro- and hepatoprotection, immunomodulation/antiviral action, lipid lowering

(including synergy with β -sitosterol to limit intestinal sterol absorption), anti-inflammatory effects via 5-lipoxygenase inhibition and cytokine down-regulation, and adjunctive oncological activity (apoptosis induction; improved drug delivery in liposomal form) [2], [22], [25], [26], [30], [31], [32], [33], [34], [35], [36], [37], [38]. While mechanistic and preclinical data are compelling, clinical confirmation is strongest for glycosylation support and antioxidant actions; larger trials are needed for lipid-lowering and immune outcomes.

Delivery science addresses poor aqueous solubility and membrane-centric targets. Liposomes (the most mature platform) embed polyprenols in bilayers, protect from oxidation, and allow targeted release; polymeric micelles and nano-emulsions boost apparent solubility and uptake; PLGA nanoparticles and SLN/NLC provide oxidative shielding and sustained release; hydrogels support topical/mucosal delivery; transdermal systems exploit intrinsic lipophilicity; and next-generation nanogels/dendrimers offer precise size/surface control albeit with cost and regulatory hurdles [3], [39], [40], [41], [42], [43], [44], [45], [46], [47]. In the present thesis context, liposomes achieved > 70 % encapsulation and six-month stability, illustrating feasibility for translational work.

Isoprenoid relevance to muscle biology stems from the dolichol-dependent glycosylation axis and membrane homeostasis. Dolichol phosphate is essential for assembling oligosaccharides used to glycosylate structural and signaling proteins. In skeletal muscle, α -dystroglycan requires proper O-mannose-rich glycosylation to anchor the sarcolemma to extracellular matrix; defects in DPM complex, DOLK, or related enzymes cause dystroglycanopathies with membrane fragility and progressive weakness [4], [31], [48], [49]. Beyond glycan assembly, dolichols are enriched in plasma membrane and Golgi, tuning bilayer fluidity and possibly contributing to intrinsic antioxidant defense-features likely pertinent to mechanically stressed muscle fibers [11], [50].

Perturbing polyprenol/dolichol pools *in vitro* reproduces myopathic phenotypes. Statins, by limiting mevalonate flux, depress prenylation and glycosylation, reduce Akt/mTOR signaling, and trigger apoptosis/ER stress in myotubes; add-back with mevalonate or geranylgeraniol restores prenylation (e.g., Rap1), normalizes autophagy markers, and rescues survival [29], [51], [52]. Genetic depletion of cis-prenyltransferase or polyprenol reductase similarly impairs myogenesis and glycosylation [53]. *In vivo*, zebrafish DPM knockdown causes hypoglycosylated α -dystroglycan, disorganized fibers, and severe motility defects, highlighting pathway indispensability [31]. Dietary polyprenol uptake is limited (\sim 1 % or less), though liposomal encapsulation modestly increases tissue delivery; endogenous dolichol pools remain tightly regulated, complicating attempts to expand them nutritionally [4], [54]. Consequently, emerging strategies include gene therapy to correct glycosylation enzymes, pathway-stabilizing pharmacology (e.g., rapamycin in fukutin-deficiency), and

substrate augmentation (ribitol/CDP-ribitol) to bypass bottlenecks [55], [56], [57], [58].

Aging muscles accumulate dolichol-possibly an adaptive antioxidant response. Caloric restriction attenuates this rise and reduces oxidative damage, consistent with dolichol's membrane-protective role [32], [33], [59]. Although direct ergogenic evidence for polyprenols is sparse, a randomized trial in trained athletes reported improved oxygen pulse, lower diastolic pressure, and increased stroke volume after polyprenol-liposome supplementation, suggesting enhanced cardiovascular efficiency and stress resilience during exercise [60]. These early data, together with antioxidant and membrane-stabilizing properties, motivate further evaluation of polyprenols as adjuncts in conditions of high metabolic demand or statin-related intolerance.

In sum, plant polyprenols are structurally versatile membrane lipids that enter human metabolism as dolichol precursors, thereby supporting glycoprotein biosynthesis and membrane integrity.

Their antioxidant, anti-inflammatory, hepatoneuroprotective, and lipid-modulating actions-combined with maturing extraction and delivery technologies-position them as promising agents for neuromuscular and metabolic indications. Nonetheless, translational progress will depend on overcoming bioavailability constraints, delineating chain-length-specific biology, and generating robust clinical evidence, particularly in muscle health and statin-associated symptomatology.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Polyphenol analysis and quantification

Polyphenols from Norway spruce (*Picea abies* L.) and Siberian fir (*Abies sibirica* L.) (purity 80–95 %) were supplied by AS Biolat (Salaspils, Latvia), extracted per RU Patent No. 2259991 [61], [62]. *Abies sibirica* polyphenols (PPs) were structurally characterized and homologues quantified.

External standards included Pren-14 and a P14-P18 polyphenol mixture (*Pinus sylvestris*, Batch 08–10 JTC; Code 89-5170; Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences). Homologue identity was confirmed by high-resolution TOF LC/MS (Agilent 6230, ESI+) with MassHunter Qualitative Analyses B.05.00. Multilamellar liposomes were examined by Nomarski optics (Nikon Eclipse 90i) and TEM (Tesla BS 540 / JEOL 100) with negative staining. All LC solvents were HPLC grade.

2.1.1. UHPLC analysis

Abies sibirica extract was fractionated on silica gel column (sample:silica 1:25–1:30) with PE/EA (93:7), ~ 1 drop/s; fractions were monitored by Silufol TLC. The pooled PP fraction (70–85 % purity; 0.7–0.8 % w/w yield) was a pale-yellow, low-viscosity oil, insoluble in water/methanol and soluble in hexane, acetone, and other non-polar solvents.

2.1.2. Sample preparation for UHPLC analysis

Stock solutions were prepared by dissolving 1 mL of PP in 35 % isopropanol/65 % methanol at room temperature, vortexed 1 min. (2,500 rpm) and filtered (0.45 μ m nylon). Calibration standards were prepared separately. Samples were centrifuged (Mikro 200R) and supernatants injected into the HPLC-DAD-MS. A P14-P18 reference mix (*Pinus sylvestris*) aided peak assignment; HRMS confirmed identities.

2.1.3. Reverse-phase UHPLC analysis

Analyses used an Agilent 1290 Infinity with DAD and an Extend-C18 column (2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) at 40 \pm 1 $^{\circ}$ C; λ = 210 nm; 0.5 μ L injection. Mobile phase: A = isopropanol, B = methanol; 0.22 mL/min. Elution: 35 %A/65 %B (0–1.5 min) \rightarrow 75 %A/25 %B (1.5–10 min), hold to 25 min \rightarrow 45 %A/55 %B (25–30 min) \rightarrow re-equilibrate 35 %A/65 %B (30–32 min) [8].

2.1.4. Identification of polyprenols by TOF LC/MS

Source: drying gas 10 L/min at 325 °C; fragmentor 130 V; m/z 100–2000; internal mass refs m/z 121.050873 and 922.009798 (G1969-85001). Quantification employed external Pren-14 and the P14-P18 mix. Calibration used DAD peak area vs mass concentration; triplicate injections (RSD < 2.0 %). Linearity showed $R^2 = 0.9978$ over the working range ($p < 0.001$; Microsoft Excel 2013).

2.1.5. Preparation of proliposomal polyprenol solution

Phosal 40 IP and Lipoid P75 (25–75 % soybean phosphatidylcholine; Lipoid GmbH) were used. 4.7 g Phosal 40 IP was magnetically stirred; 3 g PPs were added incrementally and mixed to homogeneity (1:1.7 w/w polyprenol:lecithin in concentrate; used to formulate 1:17 w/w PP:total lipid in final systems as indicated).

2.1.6. Determination of solubility of polyprenols

PP (100 mg) was mixed with 2 mL ethanol solutions containing 0–25 % Lipoid P75 at 24 °C, vortexed ≤ 2 min. After 1 h stabilization and centrifugation (14,000 rpm, 5 min), supernatants were diluted in chloroform and PP content determined by HPLC. At 15 % lecithin, higher PP load was required to reach saturation; at 25 %, solutions mixed without observable saturation (not instrumentally quantified).

2.1.7. Polyprenol incorporation efficiency into liposomes

PPs were mixed with Phosal 40 IP or Lipoid 75 SA across 1:5 to 1:40 (PP:lipid, w/w). Because free PPs are liquid and water-insoluble, a density-based separation was developed. Briefly, 100 mg mixtures + 900 μ L water were vortexed to form MLV suspensions. Aliquots (100 μ L) were combined with 900 μ L 200 mM sucrose and centrifuged (14,000 rpm, 10 min) to float free PP droplets. The upper oily phase was removed; the supernatant (liposomes) was assayed for phospholipids (modified Stewart) and PPs (HPLC). Incorporation efficiency was calculated vs non-centrifuged input.

2.1.8. The HPLC determination of polyprenols in liposomes

Samples were dissolved in isopropanol (1:10) and diluted in chloroform. Chromatography: Waters 660 pump, Nova-Pak® Silica (150 \times 3.9 mm, 5 μ m); mobile phase chloroform or chloroform:hexane (90:10) at 1 mL/min; detection at 335 nm (Waters 996 DAD).

2.1.9. Preparation for microscopy

For light/TEM imaging, proliposomal mass with PPs was hydrated to 5 % lipid and vortexed. Staining on Formvar grids used: Method A (mix 1:1 with 2 % ammonium molybdate; dry; positive staining) and Method B (dry specimen, then apply 2 % ammonium molybdate; blot; negative staining).

2.1.10. Size distribution of liposomes containing polyprenols

Diluted PP-loaded liposomes were measured at 25 °C with Zetasizer Nano ZS (Malvern) to obtain volume-weighted mean diameter and PDI.

2.2. *In vivo* animal experiments

2.2.1. Substances used for *in vivo* animal experiments

Spruce needle polyprenols (C55-C95; 1, 10, 20, 50 mg/kg; JSC Biolat) and atorvastatin 80 mg/kg (Atoris, KRKA) were administered once daily p.o. Polyprenols were dissolved in refined sunflower oil; atorvastatin in saline. Accutrend GCT strips (Roche) and a creatine kinase assay kit (MAK116, Sigma-Aldrich) were used; other reagents were from Sigma-Aldrich.

2.2.2. Experimental animals

Female Wistar rats (230–245 g; Riga Stradins University) were housed 5 per cage with chow/water *ad libitum*, 22 °C, 50–60 % humidity, 12-h light/dark. Females were selected given higher SIM risk (Sathasivam & Lecky, 2008). Testing occurred 09:00–15:00.

2.2.3. Ethics of experimental animals

All procedures complied with EU Directive 2010/63/EU and local regulations; protocol approved by the Animal Ethics Committee, Food and Veterinary Service, Riga (PVD No. 59).

2.2.4. Experimental design

After ≤ 7-day acclimatization, rats (n = 9–10 per group) received daily oral dosing for 16 days (atorvastatin/saline in the morning; PPs/oil in the afternoon). Body weight was tracked on day 1 and every 2 days. Two setups were used (Fig. 3):

Setup 1: PPs (1, 10, 20 mg/kg), atorvastatin (80 mg/kg), alone and combined; controls received saline (10 mL/kg) and oil (2 mL/kg). Behavioral tests (wire hang, open field, grip strength, rotarod) ran 09:00–15:00 with ≥ 2 h intervals.

Setup 2: As above, focusing on PP 20 mg/kg (alone/combined).

Additional sequence: tail-flick (day 8; 2.5 h post-atorvastatin and 16.5 h post-PP) and passive avoidance (days 13–15), with adaptation, acquisition (shock on entry to dark), and retention trials; re-test occurred 2 days after last dosing.

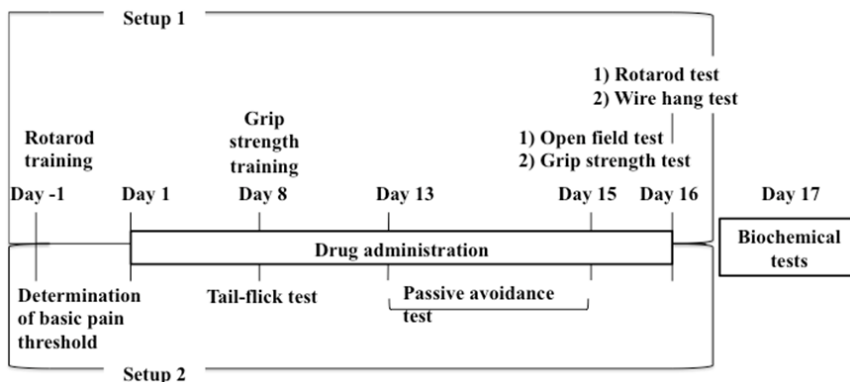


Fig. 3. Experimental setups

On day 17, animals were anesthetized (ketamine 100 mg/kg; xylazine 10 mg/kg) for cardiac puncture and blood collection (cholesterol, CK).

2.2.5. In vivo behavioural methods

- Open field (day 15): 98-cm circular arena, 40-cm walls; illumination at 100 cm. Locomotion (total distance, cm) was video-tracked (Panlab Smart v2.5).
- Passive avoidance: Ugo Basile step-through apparatus. Acquisition: 0.5 mA, 2 s foot-shock upon entry to dark; retention 24 h later (no shock). Step-through latencies (max 240 s) were recorded and differences computed.
- Tail flick (day 8): Analgesy-Meter LE7106; radiant heat to tail; baseline 2.5–4.5 s; 10 s cut-off; %MPE = $[(\text{post-drug} - \text{pre-drug}) / (10 \text{ s} - \text{pre-drug})] \times 100$; duplicate trials 5 min apart.
- Wire hang (day 16): 90 cm, 3 mm wire at 60 cm height; latency to fall (max 120 s) recorded across three trials (3-min rests); best value analyzed.
- Grip strength: Ugo Basile 47105; six training trials (day 8); testing (day 15). Mean of five pulls (30-s rests), expressed in grams.
- Rotarod (day 16): Ugo Basile 47700; pre-training (five trials). Test: 4 → 40 rpm over 5 min; four trials (1-h intervals). Latency to fall and speed recorded; mean reported.

2.2.6. Biochemical analysis

- Cholesterol: Accutrend GCT (mmol/L).
- Creatine kinase: Heparinized plasma, centrifuged (3,000 rpm, 10 min), stored at -80°C ; assayed per MAK116 (37°C ; A340 nm; INFINITE M200 PRO). One unit = 1 μmol phosphate transferred from phosphocreatine to ADP per min at pH 6. Results in U/L.

2.2.7. Statistics

Data were summarized as mean \pm SEM. Group differences used one-way ANOVA with Fisher's LSD (GraphPad Prism 6); significance at $p < 0.05$. Microsoft Excel 2007 supported data handling.

2.3. Pilot study of safety and efficacy of polyprenols

2.3.1. Design and patients

Open-label, single-center prospective pilot at the Latvian Center of Cardiology: 50 patients screened (June 2014–July 2015) for suspected SIM; 12 enrolled, 10 completed. Ethics approval: P. Stradins Clinical University Hospital (protocol 160414-3L).

The inclusion criteria (all required): current statin use ≥ 4 weeks; at least one muscle symptom ≥ 2 weeks (pain, weakness, cramps) or CK $> 2 \times$ UNL but $< 10 \times$ UNL; no indication to reduce dose; likely to continue the same statin/dose for 2 months; written informed consent.

Key exclusion criteria (summary): CK $> 10 \times$ UNL; pre-existing muscle symptoms; recent MI/major surgery/trauma; planned near-term surgery; interacting drugs (fibrates, niacin, red-yeast rice, macrolides, azoles, HIV protease inhibitors, cyclosporine), grapefruit juice; significant hepatic/renal dysfunction; endocrine or neuromuscular disorders requiring dose changes; poor adherence; high alcohol intake; heavy/competitive exercise; pregnancy; allergy to study supplements. Full list per protocol.

Intervention: conifer PPs 4 mg/day + CoQ₁₀ 100 mg/day for 8 weeks using Latvian-registered supplements: “Poliprenols[®]” (1 mg PP per capsule; 2 capsules nightly) and “Kardiopren[®]” (2 mg PP + 100 mg CoQ₁₀ per capsule; 1 capsule morning). Doses were separated by ~ 12 h, taken fasting with $\sim \frac{1}{2}$ glass water.

2.3.2. Data collection

- Visits: V0 screening; V1 inclusion (≤ 7 days after V0); V2 week 4 (± 7 days); V3 week 8 (± 7 days).

- Laboratory (V0): CBC, CK, total/LDL/HDL cholesterol, triglycerides, ALAT/ASAT, direct/indirect bilirubin, glucose, creatinine, GFR, potassium, TSH, FT4, FT3.
- Baseline and week 8 endpoints:
- Subjective symptoms: pain/weakness/cramps (0–10 VAS); distribution; relation to exertion; weekly physical activity categorized by METs (≤ 3 , 3–6, > 6).
- Dynamometry: Baseline* handgrip (3 trials/arm; dominant hand noted).
- Exercise ECG (cycle ergometry): workload (W), HR (baseline/max), total ST-depression (mm), time to 1 mm ST-depression (s), HR/ST index.
- Electroneuromyography: motor (median/ulnar/tibial/peroneal) and sensory (median/radial/sural) neurography (latency, amplitude, velocity); if normal, EMG of six muscles (two distal, four proximal): mean MUAP amplitude/duration, out-of-range counts, myopathic phenomena (fibrillation/PSWs/polyphasia), interference pattern and recruitment; classification: nerve damage/normal/myopathy/pronounced myopathy.
- Additional (V1): ECG; glucose, GGT, alkaline phosphatase, hs-CRP, 25-OH-vitamin D.
- Week 4 (V2): repeat symptoms, physical activity, cycle ergometry, key labs; unused supplements returned.

2.3.3. Statistical analysis

Analyses used IBM SPSS v22.0. Quantitative data are mean \pm SD (or median [IQR] for non-normal). Categorical data are n (%). Between-group comparisons employed independent-samples t-test, Mann-Whitney U, χ^2 or Fisher's exact as appropriate. Repeated measures ANOVA assessed within-subject change; if Mauchly's sphericity was violated, Greenhouse-Geisser correction was applied with Sidak adjustments for pairwise contrasts. Non-normal repeated measures used Friedman's test; binary repeated outcomes used Cochran's Q. Significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Results of polyprenol analysis and quantification

3.1.1. The identification of Siberian fir (*Abies sibirica* L.) polyprenol homologues

UHPLC-DAD coupled with HRMS confirmed ten polyprenol peaks in *Abies sibirica* extract (Fig. 4). Homologues P14-P17 were validated by $[M+Na]^+$ exact masses with ppm-level agreement to calculated values (P14 993.8779; P15 1061.9372; P16 1130.0017; P17 1198.0650). Relative composition (Table 1) was dominated by P15 (37.23 ± 0.56 %), followed by P16 (29.11 ± 0.51 %), P14 (15.26 ± 0.78 %), P17 (11.31 ± 0.01 %); minor amounts of P13, P18-P20 and lower (C55, C60) were present.

Table 1. Identification and quantification of the separated polyprenol homologues from Siberian fir (*Abies sibirica* L.)

Polyprenol	Molecular formula	t_R , min (UHPLC-DAD)	Relative amount, % <i>Abies sibirica</i> L.	Mode of identification	$(M+Na)^+$ (HRMS)
11	C ₃₅ H ₉₀ O	4.86	0.06 \pm 0.01	Standard	
12	C ₆₀ H ₉₈ O	5.88	0.26 \pm 0.04	Standard	
P13	C ₆₅ H ₁₀₆ O	7.16	2.05 \pm 0.04	Standard	
P14	C ₇₀ H ₁₁₄ O	8.78	15.26 \pm 0.78	Standard/HRMS	993.8779
P15	C ₇₅ H ₁₂₂ O	10.81	37.23 \pm 0.56	Standard/HRMS	1061.9372
P16	C ₈₀ H ₁₃₀ O	13.25	29.11 \pm 0.51	Standard/HRMS	1130.0017
P17	C ₈₅ H ₁₃₈ O	14.86	11.31 \pm 0.01	Standard/HRMS	1198.0650
P18	C ₉₀ H ₁₄₆ O	15.98	3.36 \pm 0.06	Standard	
P19	C ₉₅ H ₁₅₄ O	16.86	1.01 \pm 0.04	Standard	
P20	C ₁₀₀ H ₁₆₂ O	17.59	0.31 \pm 0.11	Standard	

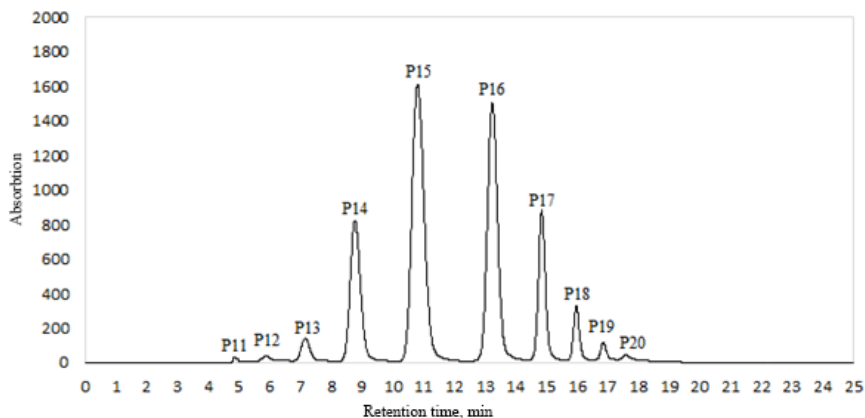


Fig. 4. UHPLC-DAD chromatogram of extracted polyphenols from Siberian fir (*Abies sibirica* L.).

3.1.2. Solubility in ethanol/lecithin systems and incorporation efficiency

A co-solubilisation/modified ethanol-injection approach was established. Polyphenol solubility in 96 % ethanol increased monotonically with soy phosphatidylcholine content, reaching practical miscibility for 80 % polyphenols at 25 % Lipoid P75 at 24 °C (Fig. 5). For lecithin dissolution in ethanol, ≥ 40 % phosphatidylcholine in the raw material was required; stable liposomes formed when phospholipid:polyphenol exceeded $\sim 1:15$. Incorporation efficiency into Phosal 40 IP or 75 SA liposomes displayed a negative correlation with the dissolved PP ratio; maximal incorporation occurred at PP:Phosal 1:40 (w/w) for both systems (Fig. 6). At lower phospholipid content, formulations separated into PP emulsions plus phospholipid liposomes rather than PP-loaded liposomes; macroscopic appearance and lamellarity outcomes are summarized in Table 2 (stable systems were multilamellar or oligo/uni-lamellar depending on composition).

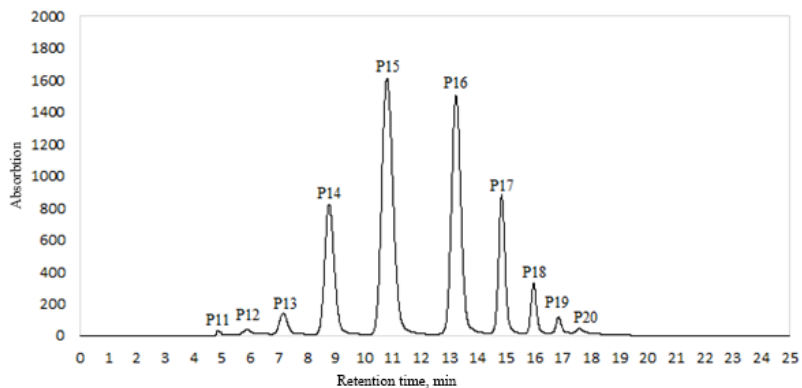


Fig. 5. Influence of the lecithin (Lipoid P75) concentration in ethanol on the solubility of *Abies sibirica* L. spruce polyprenols.

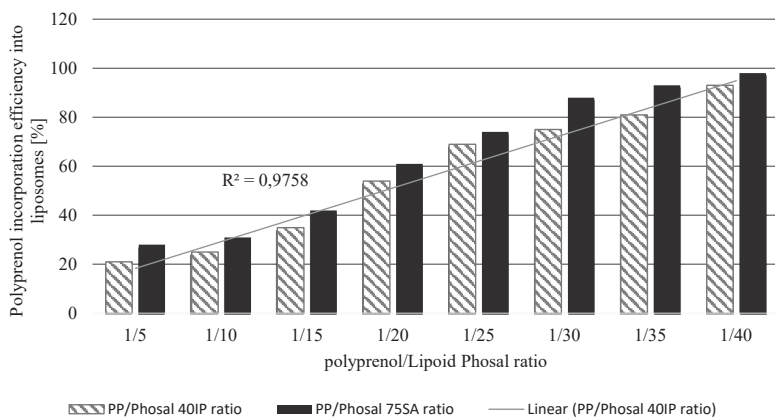


Fig. 6. Influence of the polyprenol/lecithin (Phosal IP40 and Phosal 75SA) ratio on the *Abies sibirica* L. spruce polyprenol incorporation efficiency into liposomes.

Table 2. Liposomal polyprenol sample compositions and appearance.

Lipoid/lecithin amount	Ethanol amount	Polyprenol amount	Water amount	Appearance of the sample	Stability after one month	Liposome structure
Lipoid P45/150 mg	50 mg	30 mg	up to 5g	Semiliquid	Not stable	Oligolamellar
Lipoid P45/150 mg	50 mg	30 mg	up to 5g	Semiliquid	Not stable	Oligolamellar
Lipoid P75/105 mg	50 mg	30 mg	up to 5g	Semiliquid	Not stable	Oligolamellar
Lipoid P75/150 mg	50 mg	30 mg	up to 5g	Semiliquid	Not stable	Oligolamellar
Lipoid Phosal 40 IP/1000 mg	0 mg	30 mg	up to 5g	Liquid	Stable	Multilamellar
Lipoid P45/500 mg	150 mg	30 mg	up to 5g	Semiliquid	Stable	Oligolamellar
Lipoid P45/1000 mg	200 mg	30 mg	up to 5g	Dense jelly past	Stable	Uni/Oligolamellar

3.1.3. Morphological observations of polyprenol-loaded liposomes

TEM with positive (phospholipid-layer highlighting) and negative staining demonstrated nearly spherical, multilamellar vesicles (“onion-like” lamellae) at a 1:17 (w/w) PP:lecithin ratio (Fig. 7a-b). Light microscopy showed a uniformly turbid suspension without phase separation (Fig. 7c). Dynamic light scattering yielded a trimodal, volume-weighted distribution (Fig. 8): a dominant ~ 1.36 μm population (~ 90 % of volume) with minor sub-micron modes at ~ 307 nm and ~ 62 nm (~ 5 % each); >5 μm particles were rare. Collectively, the ethanol-injection/co-solubilisation protocol produced well-defined, high-load MLVs suitable for nutraceutical delivery.

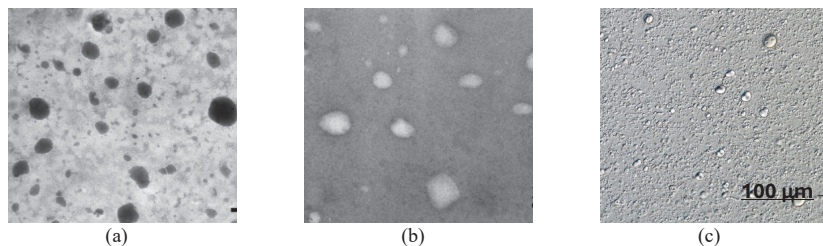


Fig. 7. Images of polyprenol/Phosal 40 IP liposomes (1:17 w/w) by TEM (a) positive staining; (b) negative staining; and (c) light microscope.

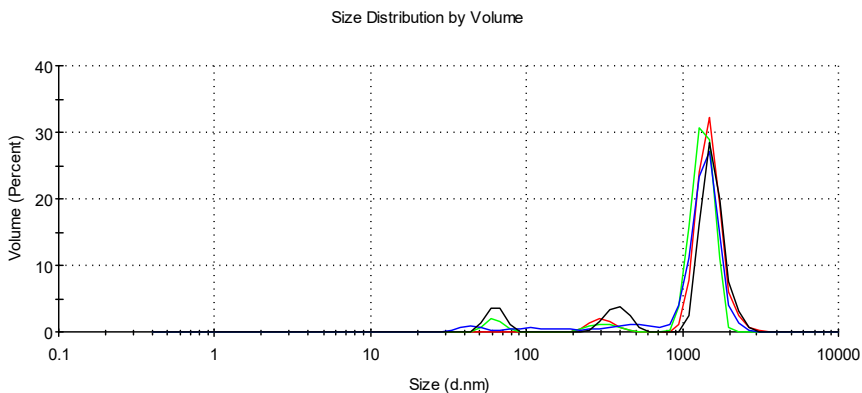


Fig. 8. Size distribution of polyprenol/Phosal 40 IP liposomes (1:17 w/w).

3.2. Spruce needle polyprenol studies in rats

3.2.1. Muscle strength/tone and coordination

Wire hang (day 16): PP 1 or 10 mg/kg had no effect; PP 20 mg/kg doubled hanging time vs control. Atorvastatin (AT) 80 mg/kg reduced hanging time ~ 3-fold; co-administration of PP at all doses restored performance to control levels (Fig. 9; ANOVA with Fisher's LSD: $p < 0.05$ to $**p < 0.001$ vs control; # $p < 0.05$ to ## $p < 0.01$ vs AT).

Grip strength (day 15): PP alone (1–20 mg/kg) did not alter grip vs control; AT 80 mg/kg decreased grip strength; PP 20 mg/kg + AT reversed this decrease to control (Fig. 10; $** p < 0.01$ vs control; # $p < 0.05$ vs AT).

Rotarod: No significant effects for PP (all doses), AT, or their combinations (data not shown).

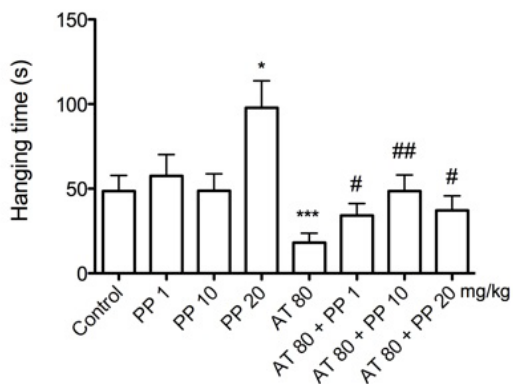


Fig. 9. Muscle strength in wire hang test in rats.

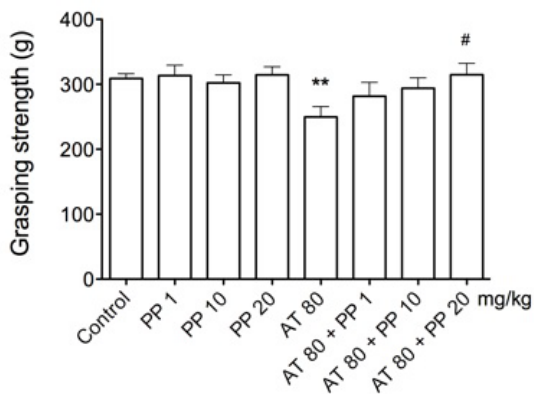


Fig. 10. Muscle strength in the grip strength test in rats.

3.2.2. General locomotor activity

Open-field total distance was unchanged by PP (1–20 mg/kg), AT 80 mg/kg, or co-administration (Fig. 11).

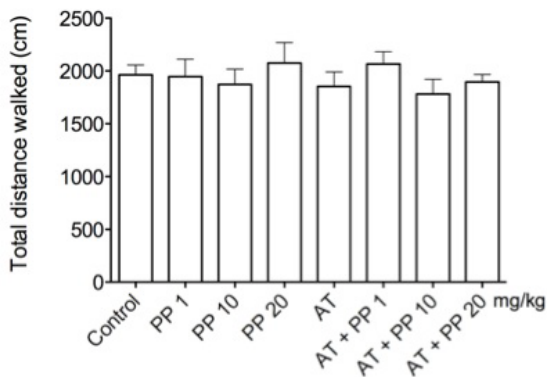


Fig. 11. Locomotor activity in the open field test in rats.

3.2.3. Learning/memory

Passive avoidance showed no differences among PP 20 mg/kg, AT 80 mg/kg, combined treatment, and controls (Fig. 12).

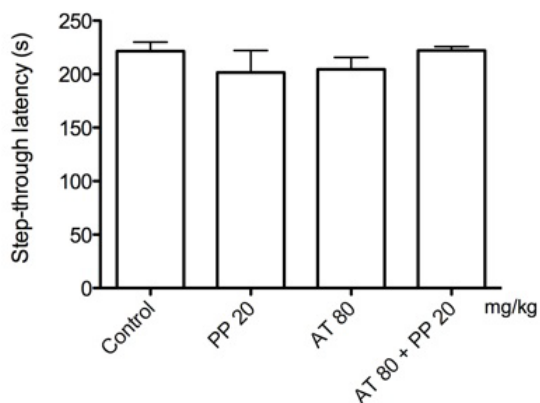


Fig. 12. Influence on memory in passive avoidance response test in rats.

3.2.4. Analgesic activity

Tail-flick %MPE was unaffected by PP 20 mg/kg; AT 80 mg/kg increased %MPE vs control; PP+AT did not modify AT's analgesic effect (Fig. 13; $p < 0.05$ vs control).

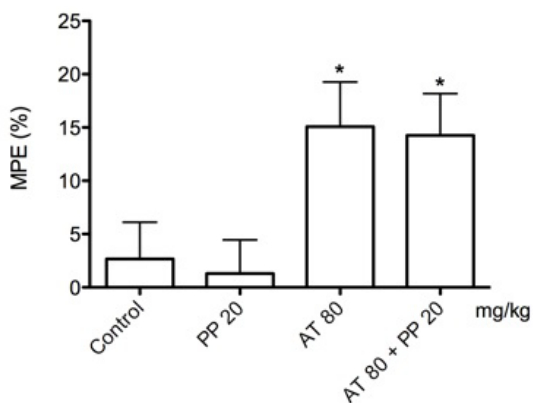


Fig. 13. Analgesic activity in tail flick test in rats.

3.2.5. Plasma cholesterol and creatine kinase (CK)

Total cholesterol did not differ among groups (not shown). PP 20 mg/kg increased plasma CK by ~ 25 % vs control (** $p < 0.01$; Fig. 14), whereas AT 80 mg/kg and PP+AT CK values were comparable to control.

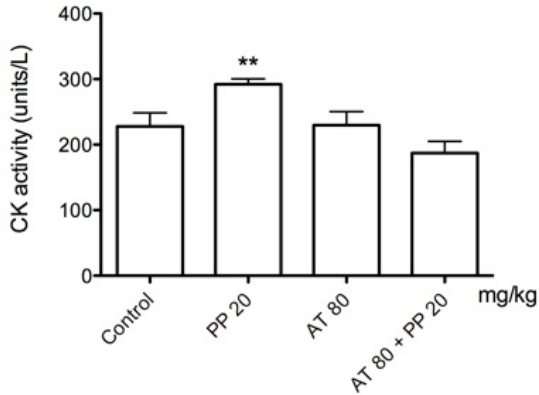


Fig. 14. Creatine kinase (CK) activity in rat plasma (units/l).

3.3. Safety and efficacy of polyphenols (pilot study)

3.3.1. Baseline characteristics

Fourteen patients were enrolled; 11 completed per protocol (Fig. 15). Groups (per protocol vs excluded, $n = 3$) were similar at baseline (Table 3), except lower alkaline phosphatase in excluded patients ($p = 0.015$). Most had established ASCVD. Statin regimens spanned atorvastatin 20-40 mg and rosuvastatin 5-40 mg (Table 4); mean duration at current dose ~ 10 months. Muscle symptoms at inclusion were frequent (pain 93 %, weakness 57 %, cramps 43 %); only 29 % had LDL-C < 1.8 mmol/L.

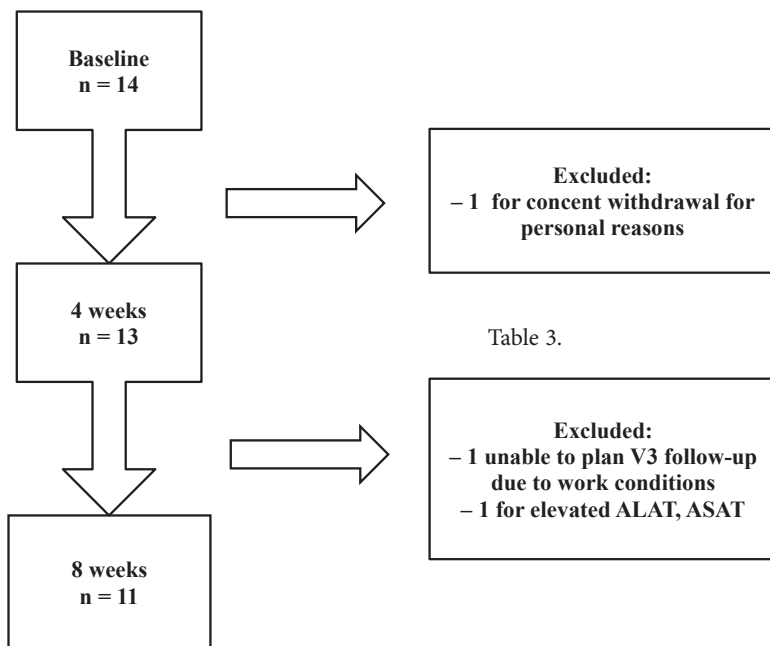


Fig. 15. Study flow diagram.

Table 3. Baseline characteristics of the study patients.

Characteristics	Per protocol group (n = 11)	Excluded (n = 3)
Female gender (n, %)	5 (45.5 %)	2 (66,7 %)
Age, years (mean, SD)	67.73 ± 8.59	55.00 ± 18.19
History of coronary heart disease	11 (100 %)	3 (100 %)
Myocardial infarction	6 (54.5 %)	1 (33.3 %)
PCI	8 (72.7 %)	2 (66.7 %)
CABG	1 (9.1 %)	1 (33.3 %)
Peripheral artery disease	2 (18.2 %)	0
Blood biochemistry (mean, SD)	Per protocol group (n = 11)	Excluded (n = 3)
Total cholesterol, mmol/l	4.45 ± 1.24	4.30 ± 0.78
Triglycerides, mmol/l	2.25 ± 1.39	1.56 ± 0.75
HDL-cholesterol, mmol/l	1.33 ± 0.27	1.09 ± 0.24
LDL-cholesterol, mmol/l	2.25 ± 0.95	2.76 ± 0.83

Table 3. *Continue*

Characteristics	Per protocol group (n = 11)	Excluded (n = 3)
Glucose, mmol/l	5.43 ± 0.77	5.53 ± 1.06
Creatine kinase (CK), U/l	240.09±303.08	236.00 ± 204.21
CK >ULR (n, %)	2 (18.2 %)	1 (33.3 %)
ALAT, U/l	29.82 ± 11.69	32.22 ± 6.11
ASAT, U/l	34.27 ± 14.00	25.33 ±5.69
GGT, U/l	65.82 ± 74.83	22.33 ± 8.96
AP, U/l	89.91 ± 15.16	64.33 ± 3.21*
Conjugated bilirubin, µmol /l	3.85 ± 1.55	2.97 ± 0.91
Unconjugated bilirubin µmol /l	7.28 ± 2.37	5.20 ±1.06
Creatinine, µmol /l	73.18 ± 17.93	95.33 ±30.29
GFR ml/min	96.30 ± 25.61	97.67 ± 73.24
Potassium, mmol/l	4.60 ± 0.74	4.50 ± 0.26
TSH, mU/l	1.57 ± 1.25	2.37 ± 1.59
25-OH-Vitamin D, ng/l	24.17 ± 6.71	23.69 ± 5.06
CRP mg/l (medium, IQR)	1.17 (0.97-2.47)	1.07 (-)
<i>Other cardiovascular risk factors</i>	Per protocol group (n = 11)	Excluded (n = 3)
Smoking (n, %)	1 (9,09 %)	0 (0 %)
Hypertension (n, %)	8 (72.73 %)	2 (66.66 %)
Diabetes (n, %)	2 (18.18 %)	0 (0 %)
Body mass index, kg/m2 (mean SD)	27.96 ± 2.13	29.38 ± 5.53
Alcohol units per week (mean SD)	2.18 ± 1.54	1.67 ± 1.16
<i>Physical activities, h per week (mean, SD)</i>		
Mild	33.27 ±12.56	28.00 ± 12.12
Moderate	7.27 ± 8.46	8.33 ± 5.13
Intensive	1.18 ± 3.06	0

PCI – percutaneous coronary intervention, CABG – coronary artery bypass graft surgery, ULR – upper limit of reference range, SD – standard deviation, IQR – interquartile range, LDL – low density lipoprotein, HDL – high density lipoprotein, ALAT – alanine amino transferase, ASAT – aspartate amino transferase, GFR – glomerular filtration rate, GGT – gamma-glutamyl transpeptidase, AP – alkaline phosphatase, CRP – high sensitivity C-reactive protein, TSH – thyroid stimulating hormone

* p = 0.015, all other p > 0.05.

Table 4. Statin therapy and muscle symptoms at the inclusion.

<i>Statin therapy</i>	Total (n = 14)	Per protocol (n = 11)	Excluded (n = 3)
Atorvastatin 20 mg (n)	2 (14.29 %)	1 (9.09 %)	1 (33.33 %)
Atorvastatin 30 mg (n)	1 (7.14 %)	1 (9.09 %)	–
Atorvastatin 40 mg (n)	1 (7.14 %)	1 (9.09 %)	–
Rosuvastatin 5 mg (n)	2 (14.29 %)	1 (9.09 %)	1 (33.33 %)
Rosuvastatin 10 mg (n)	3 (21.43 %)	3 (27.27 %)	–
Rosuvastatin 20 mg (n)	4 (28.57 %)	3 (27.27 %)	1 (33.33 %)
Rosuvastatin 40 mg (n)	1 (7.14 %)	1 (9.09 %)	–
<i>Muscle symptoms and signs</i>	Total (n = 14)	Per protocol (n = 11)	Excluded (n = 3)
Pain (n, %)	13 (92.86 %)	10 (90.90 %)	3 (100 %)
Pain at rest (n, %)	11 (78.57 %)	9 (81.82 %)	2 (66.67 %)
Pain severity score (mean, SD)*	5.69 ± 1.84	6.00 ± 1.70	4.67 ± 2.31
Weakness (n, %)	8 (57.14 %)	7 (63.64 %)	1 (33.33 %)
Weakness severity score (mean, SD)	6.00 ± 1.51	6.14 ± 1.57	5.00
Cramps (n, %)	6 (42.86 %)	5 (45.46 %)	1 (33.33 %)
Cramps severity score	5.33 ± 2.58	6.00 ± 2.34	2.00
Elevated CK levels > ULR	577.00±342.46	614.00±409.51	466.00±0

* Symptom severity score based on subjective symptom assessment by a patient (range 0 to 10). The score is calculated only for the patients with presence of the symptom.

CK – creatine kinase, ULR – upper limit of reference range, SD – standard deviation

3.3.2. Safety

No major adverse events occurred in the per-protocol cohort over 8 weeks; one elective PCI was uneventful. Across repeated measures (Table 5), there were no significant changes in clinical chemistry, hematology, or ECG parameters, except a mild triglyceride reduction ($p = 0.023$). CK medians trended higher at weeks 4 and 8 but were not significantly different from baseline (Sidak-adjusted $p > 0.7$); the proportion with CK > ULR did not change significantly ($p = 0.223$).

One 65-year-old female was withdrawn at week 4 for asymptomatic transaminase elevation (ALAT 473 U/L; ASAT 189 U/L; GGT 282 U/L) with normal bilirubin and CK (Table 6). Viral hepatitis and structural hepatobiliary disease were excluded; values normalized within 7 days off products. Background factors included CKD (GFR 50 mL/min), subclinical hypothyroidism, and low 25-OH-vitamin D; renal function did not worsen. Her concurrent atorvastatin 20 mg (initiated 7 weeks pre-enrolment) was also discontinued.

Table 5. Safety parametrs.

Parameters (mean, SD)	Baseline	4 weeks	8 weeks	p value *
Total cholesterol, mmol/l	4.45 (1.24)	4.05 (0.62)	4.23 (0.57)	0.259
Triglycerides, mmol/l	2.25 (1.39)	1.72 (1.16)	1.87 (0.95)	0.023
HDL-cholesterol, mmol/l	1.33 (0.27)	1.32 (0.27)	1.37 (0.23)	0.844
LDL-cholesterol, mmol/l	2.25 (0.95)	1.99 (0.54)	2.02 (0.58)	0.305
Glucose, mmol/l	5.34 (0.77)	5.35 (0.77)	5.46 (0.67)	0.810
Creatine kinase, U/l **	107 (85-275)	176 (97-214)	178 (92-216)	0.231 ***
ALAT, U/l	29.82 (11.69)	29.36 (8.87)	31.27 (12.91)	0.796
ASAT, U/l	34.27 (13.99)	32.64 (11.29)	35.36 (19.03)	0.648
GGT, U/l	65.81 (74.83)	58.18 (61.60)	46.18 (38.36)	0.286
AP, U/l	89.91 (15.16)	86.64 (19.72)	82.00 (13.52)	0.338
Conjugated bilirubin, μ mol/l	3.85 (1.55)	4.03 (1.45)	3.54 (1.31)	0.538
Unconjugated bilirubin, μ mol/l	7.28 (2.37)	7.48 (2.22)	6.98 (2.28)	0.624
Creatinine, μ mol/l	73.18 (17.93)	71.64 (19.97)	73.00 (22.62)	0.292
GFR, ml/min	96.30 (25.61)	100.70 (30.35)	98.30 (28.90)	0.275
Potassium, ml/min	4.59 (0.74)	4.84 (0.72)	4.49 (0.28)	0.333
TSH, mU/l (n = 10)	1.57 (1.25)	–	2.07 (1.44)	0.059
25-OH-Vitamin D, ng/l (n = 10)	24.17 (6.71)	–	23.48 (8.27)	0.571
CRP, mg/l **	1.17 (0.97–2.47)	1.53 (0.99–3.61)	1.86 (0.83–4.70)	0.477 ****
Haematology	Baseline	4 weeks	8 weeks	p value *
Red blood cells, $10 \times 12/L$	4.86 (0.20)	4.79 (0.36)	4.79 (0.36)	0.599
White blood cells, $10 \times 9/L$	11.03 (12.10)	7.65 (2.47)	7.50 (1.92)	0.390
Platelets, $10 \times 9/L$	248.91 (37.70)	261.55 (34.45)	244.55 (37.32)	0.110
Haemoglobin, g/L	144.27 (8.84)	140.55 (11.64)	140.91 (13.19)	0.235
Electrocardiography	Baseline	4 weeks	8 weeks	p value *
Sinus rhythm (n, %)	9 (81.8 %)	9 (81.8 %)	9 (81.8 %)	1000
Heart rate (bpm)	71.91 (14.87)	63.18 (9.05)	67.64 (8.42)	0.097
PR (ms) (n = 9) *****	169.89 (30.23)	175.78 (36.49)	174.67 (30.97)	0.516
QRS (ms)	106.27 (24.46)	107.27 (24.73)	106.55 (23.24)	0.779
QT (ms)	407.27 (41.69)	427.45 (33.36)	412.00 (29.85)	0.125
QTc (ms)	382.82 (43.52)	394.27 (34.04)	371.64 (25.874)	0.217

* Repeated measures ANOVA; ** median and interquartile range; *** Friedman's test; **** median and interquartile range, comparisons performed with logarithmically transformed values; ***** in patients with sinus rhythm (n = 9).

SD – standard deviation, LDL – low density lipoprotein, HDL – high density lipoprotein, ALAT – alanine amino transferase, ASAT – aspartate amino transferase, GFR – glomerular filtration rate, GGT – gamma-glutamyl transpeptidase, AP – alkaline phosphatase, CRP – high sensitivity C-reactive protein, TSH – thyroid stimulating hormone, PR – PR interval, QRS – QRS complex, QT – QT interval, QTc – corrected QT interval

Table 6. Summary of the patient case with liver enzyme elevations.

Blood biochemistry	Baseline	4 weeks	+ 1 day FU	+ 7 FU days	Reference limits
ALAT	31.00	473	313	62	< 41 U/l
ASAT	27.00	189	82	34	< 37 U/l
GGT	28.00	282	250	154	< 61 U/l
AP	62.00	151	134	90	< 117 U/l
Total bilirubin	6.00	5.60	-	6.20	< 19 µmol/l
Conjugated bilirubin	2.00	1.70	-	-	< 3.4 µmol/l
Unconjugated bilirubin	4.00	3.90	-	-	- µmol/l
CK	166	191	-	-	190 U/l
Creatinine	130.00	113	-	-	30–106 µmol/l
GFR	50	58	-	-	> 90 ml/min
Potassium	4.70	4.90	-	-	3.50–5.30 mmol/l
25-OH-vitamine D	21.81	-	-	-	30–100 ng/ml
CRP	1.60	2.49	-	-	< 1.0 mg/l

FU – follow-up, ALAT – alanine amino transferase, ASAT – aspartate amino transferase, GGT – gamma-glutamyl transpeptidase, AP – alkaline phosphatase, CK – creatine kinase, GFR – glomerular filtration rate, CRP – high sensitivity C-reactive protein

3.3.3. Muscle symptoms

Self-reported scores improved over 8 weeks: pain (n = 10) decreased significantly overall (p < 0.001) with improvements at week 4 and 8 vs baseline (p = 0.010, p = 0.001) and a non-significant week-8 vs week-4 change (p = 0.070); weakness (n = 7) improved (p = 0.018). Cramps (n = 5) showed a non-significant overall trend (p = 0.069) but improved at week 8 vs baseline (adjusted p = 0.012) (Fig. 16). Response distribution: pain resolved in 2/10 (20 %) and fell ≥50 % in 4/10 (40 %); weakness resolved in 3/7 (42 %); cramps resolved in 2/5 (40 %) and decreased ≥50 % in 2/5 (40 %). Only 2/11 patients reported no improvement in any symptom. By study end, 4/10 (40 %) judged symptoms sufficiently improved to consider statin up-titration (1/10 at week 4).

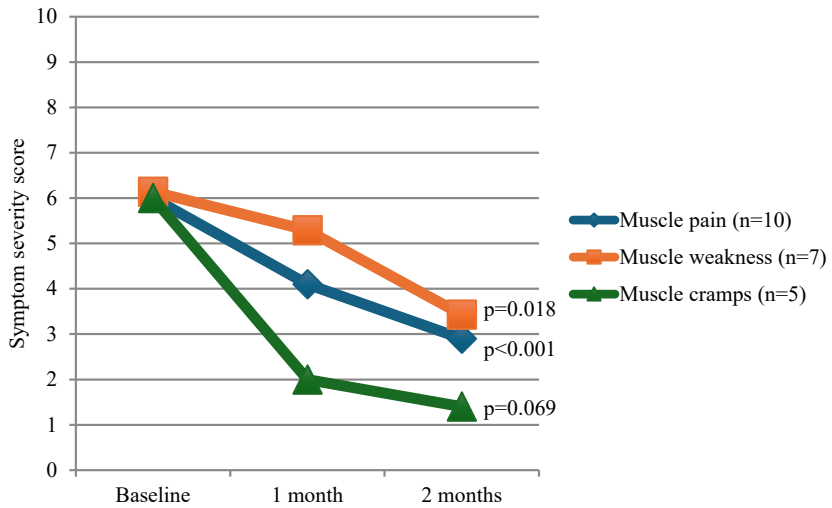


Fig. 16. Self-reported muscle symptom scores during the study period. P values represent statistical significance across all repeated measurements.

3.3.4. Dynamometry, exercise test and physical activities

Handgrip was largely unchanged; a small increase was seen for left-arm maximum at 8 weeks ($p = 0.047$), with other dynamometry endpoints non-significant (Table 7). Cycle-ergometry indices (workload, HR, blood pressure, ST-depression, HR/ST index) were unchanged. Self-reported mild physical activity (hours/week) increased over time (baseline $33.3 \pm 12.6 \rightarrow 35.8 \pm 16.2$ at week 4 $\rightarrow 39.6 \pm 18.9$ at week 8; $p = 0.008$; Fig. 17).

Table 7. Physical tests (n = 11).

Dynamometry	Baseline	4 weeks	8 weeks	p value	
Right arm, maximum (kg)	39.73 (20.80)	38.36 (20.09)	40.36 (22.77)	0.425	
Right arm, average (kg)	35.94 (20.21)	35.88 (18.94)	36.09 (20.03)	0.985	
Left arm, maximum (kg)	35.18 (20.83)	36.45 (20.97)	39.36 (18.60)	0.047	
Left arm, average (kg)	33.09 (20.31)	34.73 (20.17)	36.91 (18.09)	0.102	
<i>Exercise test</i>		Baseline	4 weeks	8 weeks	p value
Load (watts)	106.82 (37.23)	–	100.00 (29.58)	0.192	
Peak pulse (bpm)	107.36 (18.05)	–	108.73 (15.14)	0.728	

Table 7. *Continue*

<i>Exercise test</i>	Baseline	4 weeks	8 weeks	p value
Peak SBP (mmHg)	172.18 (17.53)	–	160.00 (23.18)	0.087
Peak DBP (mmHg)	89.82 (6.13)	–	94.73 (17.60)	0.443
ST depressions (mm)	2.23 (1.77)	–	1.96 (1.10)	0.433
Heart rate / ST index (bpm/mm)	1.00 (1.02)	–	1.24 (1.03)	0.609

SBP – systolic blood pressure, DBP – diastolic blood pressure

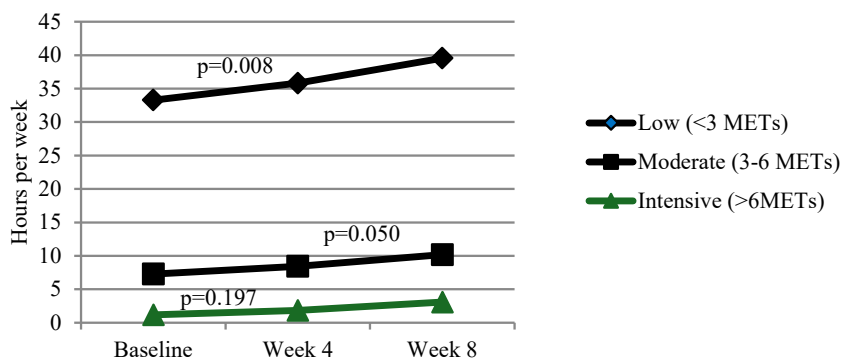


Fig. 17. **Self-reported physical activities in hours per week (n = 11).**

Analytical work identified a P15-rich *Abies sibirica* polyphenol profile and established an ethanol-lecithin co-solubilisation route yielding stable, high-load multilamellar liposomes. In rats, PP 20 mg/kg improved wire-hang performance and rescued atorvastatin-induced declines in muscle strength without affecting locomotion, memory, or rotarod performance; PP alone increased CK modestly, while atorvastatin and co-treatment did not. In a small, open-label clinical cohort, 8-week PP + CoQ₁₀ supplementation was generally safe, produced significant improvements in self-reported muscle pain and weakness, and increased low-intensity physical activity, with unchanged objective exercise capacity. One reversible transaminase elevation prompted discontinuation. These results support further controlled evaluation of conifer-derived polyphenols (with optimized delivery) as adjuncts for statin-associated muscle symptoms.

4. DISCUSSION

Conifer polyprenols-long-chain isoprenoid alcohols abundant in *Pinus* and *Picea*-support membrane integrity, glycosylation, and lipid metabolism. Statins reduce mevalonate-derived intermediates (CoQ₁₀, dolichols, prenyl donors), predisposing to statin-induced myopathy (SIM). Given evidence for antioxidant and anti-inflammatory actions of polyprenols-and their potential to restore dolichol-linked pathways-this work examined analytical characterization, liposomal delivery, preclinical efficacy, and an exploratory clinical application, with and without CoQ₁₀.

This discussion provides an overview and analyzes the principal findings from the three peer-reviewed studies that underpin this doctoral thesis:

Table 8. **Doctoral thesis publications.**

Thesis component	Principal results	Interpretation	Paper
Polyprenol analytics and Liposomal delivery	UHPLC-DAD-HRMS resolved ten homologues (Pren-11 → Pren-20) with Pren-15 most abundant (≈ 37 %) and batch-to-batch CV < 3 %. 25 % phosphatidylcholine in ethanol enabled full co-solubilisation of 80 % polyprenol extract; multilamellar vesicles (peak diameter ≈ 1.36 μm) remained physically stable ≥ 6 months.	Provides a reproducible chemical fingerprint necessary for regulatory and GMP qualification. Overcomes poor aqueous solubility – a historic hurdle to clinical translation.	Paper I (Vanaga <i>et al.</i> , 2020) [5]
Rat preclinical SIM model	Spruce polyprenols (10–20 mg/kg/day, p.o.) prevented atorvastatin-induced falls in wire-hang and grip strength without altering plasma cholesterol or CNS behaviour.	Confirms muscle-specific protection and safety at effective doses.	Paper II (Jansone <i>et al.</i> , 2016) [6]
Patient SIM pilotstudy	11 SIM patients given polyprenols 4 mg/day + CoQ ₁₀ 100 mg/day for 8 weeks showed significant pain and weakness score reductions (P < 0.001 and P = 0.018) with no serious AEs; CK rose non-significantly and lipid targets were maintained.	Provides first-in-human results of efficacy and confirms compatibility with statin therapy.	Paper III (Latkovskis <i>et al.</i> , 2016) [7]

By integrating these data with prior literature, we outline how polyphenols – alone and alongside CoQ₁₀ – can address gaps in SIM prevention and management.

4.1. Biochemical characterization of conifer polyphenols (paper I)

UHPLC-DAD-HRMS defined a Siberian-fir profile of Pren-11 → Pren-20 with Pren-15 most abundant (~ 37 %); Pren-15 + Pren-16 comprised > 65 % of total [63]. This clarity (≈ 80 % purity extract) enabled standardization, dose accuracy, and mechanistic inference, recognizing chain-length effects on membrane affinity and conversion to dolichol.

4.2. Formulation strategies for lipophilic polyphenols (paper I)

PPs are water-insoluble; phospholipid carriers were therefore explored. Stable systems required ≥ 40 % phosphatidylcholine and lipid:PP >15:1 (w/w); optimal incorporation at 1:40 PP:phospholipid (Phosal 40 IP/75 SA; Lipoid P45). These conditions minimized precipitation and supported uniform entrapment.

4.3. Development of a liposomal polyphenol delivery system (paper I)

Co-solubilisation with modified ethanol-injection yielded multilamellar vesicles (MLVs) peaking ~ 1.36 μm with sub-micron modes. The oral-oriented design favors gastric transit and potential lymphatic uptake [64], while protecting PPs from oxidation/aggregation. This practical platform underpinned human studies and informed supplement development (e.g., SuperCell®HEPA) [65].

4.4. Future directions of polyphenol liposome optimization

Microfluidic ethanol-injection to narrow size distribution; PEGylation for mucus penetration; labelled PPs to track uptake in Caco-2 and *in situ* intestinal loops; and comparisons with nano-emulsions, micelles, and solid-lipid nanoparticles-balancing regulatory simplicity against higher encapsulation efficiency [66], [67].

4.5. Broader pharmacological potential of polyphenols

Preclinical data (e.g., Ginkgo-derived PPs) show protection in toxin hepatitis; Ropren® has been used clinically in chronic liver disease in Russia, plausibly

via membrane stabilization and antioxidant effects [68], [69]. PPs/derivatives can modestly down-tune sterol synthesis via pathways distinct from statins. Downstream isoprenoids (e.g., GGOH) reduce cholesterol synthesis and ACAT activity *in vitro*, with feedback on LDLR expression [70], [71], [72]; combined PP-phosphate + β -sitosterol may enhance lipid-lowering [2], [73]. In our rats PPs did not lower cholesterol – this was desirable alongside statins [6]. Isoprenoid family compounds (CoQ₁₀, tocotrienols, astaxanthin, GGOH) indicate plausible glucose/insulin cross-talk meriting longer PP studies [74], [75], [76], [77]. Polyphenols improved cognition in AD-like rodent models [78]; our rat work found no CNS detriment, suggesting neurological safety and potential benefit in oxidative/neuroinflammatory settings [6], [78], [79], [80], [81].

PPs are dietary precursors to dolichols. Statins deplete mevalonate products (CoQ₁₀, dolichols, prenyl donors), impairing muscle energetics, glycosylation, and signalling. Polyphenols are absorbed and reduced to dolichol; Dol-P supports N-glycosylation in ER. Repleting dolichol may stabilize sarcolemmal glycoproteins (e.g., dystroglycans) and repair capacity, aligning with preserved strength *in vivo* [6], [82]. Statins can reduce muscle CoQ₁₀ by 30-50 % [83]. In rats, PPs alone maintained performance; clinically, pairing PPs with CoQ₁₀ is rational to address dual deficits, consistent with symptom relief in Paper III and mixed CoQ₁₀ monotherapy literature [6], [7], [84].

Atorvastatin (80 mg/kg) impaired wire-hang and grip strength in rats; co-administered PPs (1–20 mg/kg) dose-dependently restored performance to control without affecting locomotion, learning, or coordination. Cholesterol was unchanged across groups. CK rose ~ 25 % with PP 20 mg/kg alone (without functional harm) but not with atorvastatin \pm PPs, suggesting benign membrane turnover rather than injury. The data support muscle-targeted protection and informed human translation [6].

4.6. Clinical evaluation (paper III)

- In 11 SIM patients, 8 weeks of PP 4 mg/day + CoQ10 100 mg/day reduced pain and weakness scores (pain $P < 0.001$; weakness $P = 0.018$); 40 % considered statin up-titration. Objective performance changes were minimal-likely reflecting small sample, short duration, and modest baseline impairment [7].
- No serious AEs occurred; CK increases were non-significant. One patient with CKD had transient, asymptomatic transaminase elevation resolving off products; caution and monitoring are prudent in at-risk individuals.
- Findings align with rat data: functional protection/symptom relief at low human doses when paired with CoQ10. Controlled trials are needed to isolate PP effects versus combination therapy.

4.7. Polyprenols, statins, and CoQ₁₀: a therapeutic intersection

PPs + CoQ₁₀ target complementary mevalonate deficits (dolichol/ER homeostasis and ubiquinone/mitochondria). Compared with other SIM strategies (vitamin D, carnitine, vitamin E), this approach is mechanistically grounded and aims to preserve statin efficacy while improving tolerability. Safety was acceptable across studies, with one reversible hepatic signal requiring vigilance [85], [86].

4.8. Study limitations

- The studies conducted in the bounds of this doctoral thesis have several limitations that warrant consideration.
- True oral bioavailability and tissue conversion to dolichol remain unquantified; human dose (4 mg) may under-expose tissues. Pharmacokinetic and labelled-PP studies are priorities.
- We lacked muscle histology, tissue dolichol, glycosylation status, or intramuscular CoQ₁₀-mechanisms therefore remain inferential.
- High statin dose, female Wistar rats, and limited duration constrain generalizability; chronic, clinically relevant dosing with deeper tissue analytics is needed (paper II).
- Open-label, small sample, short follow-up, and combination with CoQ₁₀ preclude causal attribution and dose-response modelling; objective function endpoints were largely unchanged (paper III).

4.9. Research gaps and future studies

- Mechanisms: Define PP effects on mevalonate flux, Dol-P pools, glycosylation, prenylation, and mitochondrial signalling (stable-isotope tracing; targeted proteomics) [9], [27].
- Delivery/PK: Head-to-head of liposomes vs nano-emulsions/micelles; human PK/PD, tissue distribution, and conversion kinetics [40], [87], [88].
- Clinical evidence: Adequately powered RCTs in SIM with PROs, CK, MRI muscle fat-fraction; factorial arms (PP alone vs CoQ₁₀ vs combination); athlete crossover under oxidative stress [78], [89], [90], [91], [92].
- Comparators: Positioning versus PCSK9 inhibitors, bempedoic acid, inclisiran in statin-intolerant care pathways [85], [93], [94], [95], [96].
- Standardization/safety: GMP-grade PP homolog profiles, batch consistency, drug-supplement interactions, long-term hepatic/renal safety, and bone health.

- Personalization/omics: Pharmacogenomics for SIM risk [97], [98]; multi-omics to map responders [99], [100], [101].

4.10. Concluding remarks

This thesis delivers: (i) a pharmaceutically realistic liposomal PP formulation; (ii) preclinical proof-of-concept for SIM mitigation; and (iii) first-in-human safety/feasibility for PP+CoQ₁₀ therapy. Collectively, plant-derived PPs mitigated statin-associated muscle symptoms *in vivo* and in an exploratory clinical setting – particularly with CoQ₁₀ – without compromising lipid control. These findings justify rigorously controlled trials, PK/PD characterization, and refinement of delivery systems to embed PPs within precision strategies for statin intolerance, metabolic syndrome, and age-related performance decline.

Thesis goal: to demonstrate that conifer-derived polyphenols – through chemical characterization, liposomal formulation, preclinical efficacy testing, and exploratory clinical study – can replenish mevalonate-dependent intermediates and serve as a safe, effective adjunct to prevent or alleviate statin-induced myopathies (SIM).

5. CONCLUSIONS

Statin-induced myopathy (SIM) limits adherence to lipid-lowering therapy. This thesis builds a full translational arc for conifer-derived polyphenols—from chemical definition and liposomal delivery to preclinical efficacy and first-in-human feasibility—targeting mevalonate-pathway shortfalls (dolichol, ubiquinone) to preserve muscle function without blunting statin benefit.

5.1. Chemical characterization achieved

- UHPLC-DAD-MS resolved ten homologues (Pren-11 → Pren-20) in *Abies sibirica/Picea abies*, with Pren-15 predominant (~ 37 %).
- A reproducible fingerprint met Objective 1, enabling consistent dosing and regulatory readiness.

5.2. Innovative liposomal delivery platform developed

- Modified ethanol-injection/co-solubilisation with phosphatidylcholine (≥ 40 % of lipid; PP/lipid ~ 1:33-1:40, w/w) produced stable multilamellar vesicles (modal diameter ~ 1.36 μm ; stability ≥ 6 months).
- Objective 2 was met: the system preserves PP integrity, overcomes hydrophobicity, and is suitable for *in vivo* use.

5.3. Preclinical efficacy in a rat SIM model

- In female Wistar rats receiving atorvastatin 80 mg/kg/day, spruce polyphenols (1–20 mg/kg/day) prevented declines in wire-hang and grip strength without altering behaviour, cholesterol, or causing toxicity.
- Objective 3 was fulfilled, supporting dose-dependent muscle protection consistent with dolichol repletion and antioxidant action.

5.4. First-in-human safety and proof-of-concept

- An 8-week open-label pilot (n = 11) of polyphenols 4 mg/day + CoQ₁₀ 100 mg/day in confirmed SIM reduced pain and weakness scores, enabled 40 % of participants to consider statin re-escalation, and showed a benign safety profile (no serious AEs; no CK spikes).
- Objective 4 was achieved, demonstrating tolerability with preliminary efficacy.

5.5. Strategic therapeutic implications

- Polyprenol + CoQ₁₀ co-therapy addresses complementary mevalonate deficits (dolichol and ubiquinone), comparing favourably with existing SIM strategies by alleviating myotoxicity while preserving statin lipid-lowering.
- The liposomal platform may extend to other conditions marked by mevalonate insufficiency or oxidative membrane stress (e.g., sarcopenia, NAFLD).

5.6. Future directions

- Phase II RCTs: Placebo-controlled trials to confirm efficacy, define optimal dosing, and disentangle mono- vs. combination effects.
- Mechanistic biomarkers: Stable-isotope tracing of PP → dolichol, muscle Dol/Dol-P quantification, glycoprotein/prenylation status, and imaging of mitochondrial/ER function.
- Formulation/PK: Pharmacokinetics of individual homologues; microfluidic sizing; exploration of nanoemulsions/polymeric carriers to enhance bioavailability.

Overall: the thesis validates a coherent bench-to-bedside path-defining chemical signatures, optimising oral delivery, demonstrating muscle protection in rodents, and showing encouraging human outcomes-supporting advancement to adequately powered randomized trials. Beyond SIM, this platform invites broader application in isoprenoid-deficiency and oxidative-stress disorders, laying groundwork for future therapeutic innovation.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

I would first and foremost like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Prof. *Dr. Med.* **Baiba Jansone**, for her unwavering support and mentorship throughout this nine-year journey. Her belief in my abilities, even during the times when life required me to pause my research, sustained my motivation. **Prof. Jansone** not only guided me scientifically but also gave me the confidence to persevere and to view myself as a scientist capable of completing this work.

I would also like to sincerely thank my former employers, **JSC “Biolat”** and **LTD “Silv EXPO”**, for their financial support and industry insights, which greatly facilitated the execution of my research projects. Their flexibility in allowing me to balance full-time work with my PhD studies made a real difference. Special thanks go to Dr. **Ugis Kletnieks**, whose encouragement to pursue a PhD was instrumental in setting me on this path, and to **Viesturs Varpins** for his continued support.

I am also grateful to my scientific advisors and collaborators who contributed to the research projects forming the basis of this thesis, particularly Prof. *Dr. Med. Habil.* **Ruta Muceniece** and Prof. *Dr. Med.* **Gustavs Latkovskis**, whose expertise and guidance were greatly valued throughout the process.

I gratefully acknowledge the financial contributions that enabled this research. This work was supported by several Competence Centre projects, including:

P20 project “Technology development for the encapsulation of bioactive substances into phospholipid liposomes” (Agreement No. 1.2.1.1/16/A/005).

P29 project “The conifer isoprene alcohol biological activity studies in pathology models” (Agreement No. L-KC-11-0001).

In addition, I am thankful for the PhD scholarship provided by the **University of Latvia** (funding from CFLA) under **project No. 8.2.2.0/18/A/010 “Akadēmiskā personāla atjaunotne un kompetenču pilnveide Latvijas Universitātē”** (01.11.2021–01.01.2022).

On a personal note, I would like to acknowledge the people closest to me, who shared in the challenges of this journey. My fiancée, **Pavels Ostrovskis**, who passed away in 2014 while pursuing his own PhD, inspired me with his dedication to science. Most of all, I wish to thank my husband, **Andris Vanags**, for his endless patience, encouragement, and love. His support has been the foundation that allowed me to complete this thesis despite the pressures of work, family, and health challenges.

Completing this PhD has required balancing multiple jobs, raising two young children, and navigating personal hardships. There were times when I questioned whether the sacrifices were worth it. Yet this accomplishment stands as a testament to resilience and to the incredible support I have received from my family, friends, colleagues, and mentors.

*This work is dedicated to my children and the memory of my maternal
grandmother,
Janina Blazevisa (1932–2011),
who first instilled in me a love of learning and supported me in my earliest years,
shaping the person and scholar I have ultimately become.*

REFERENCES

- [1] T. Chojnacki and G. Dallner, 'The biological role of dolichol', *Biochemical Journal*, vol. 251, no. 1, pp. 1–9, 1988, doi: 10.1042/bj2510001.
- [2] A. V. Pronin, L. L. Danilov, A. N. Narovlyansky, and A. V. Sanin, 'Plant Polyisoprenoids and Control of Cholesterol Level', *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, vol. 62, no. 1, pp. 31–39, Feb. 2014, doi: 10.1007/s00005-013-0253-y.
- [3] O. Gawrys *et al.*, 'Effects of liposomes with polyisoprenoids, potential drug carriers, on the cardiovascular and excretory system in rats', *Pharmacological Reports*, vol. 66, no. 2, pp. 273–278, 2014, doi: 10.1016/j.pharep.2013.09.009.
- [4] V. Cantagrel and D. J. Lefeber, 'From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: A new class of metabolic diseases', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 34, no. 4, pp. 859–867, 2011, doi: 10.1007/s10545-011-9301-0.
- [5] V. I, G. J, N. I, K. U, M. R, and J. B, 'Identification of *Abies sibirica* L. Polyphenols and Characterisation of Polyphenol-Containing Liposomes', *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 25, no. 8, Apr. 2020, doi: 10.3390/molecules25081801.
- [6] B. Jansone *et al.*, 'Spruce needle polyphenols protect against atorvastatin-induced muscle weakness and do not influence central nervous system functions in rats', *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, vol. 70, no. 1, 2016, doi: 10.1515/prolas-2016-0003.
- [7] G. Latkovskis *et al.*, 'Pilot study of safety and efficacy of polyphenols in combination with coenzyme Q10 in patients with statin-induced myopathy', *Medicina (Lithuania)*, vol. 52, no. 3, 2016, doi: 10.1016/j.medic.2016.05.002.
- [8] R. Tao *et al.*, 'Polyphenols of *Ginkgo biloba* Enhance Antibacterial Activity of Five Classes of Antibiotics', *BioMed Research International*, vol. 2016, pp. 1–8, 2016, doi: 10.1155/2016/4191938.
- [9] I. D. Boateng, 'Polyphenols in *Ginkgo biloba*; a review of their chemistry (synthesis of polyphenols and their derivatives), extraction, purification, and bioactivities', *Food Chemistry*, vol. 418, p. 136006, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136006.
- [10] M. Chouda, W. W. J. Jankowski, E. Swiezewska, W. Sasak, and T. Chojnacki, 'Occurrence of Polyphenols and Dolichols in Plants', *Journal of Plant Physiology*, vol. 143, no. 4, pp. 448–452, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81806-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81806-7).
- [11] J. W. Rip and K. K. Carroll, 'Distribution, metabolism and excretion of [1-¹⁴C] dolichol injected intravenously into rats', *The Biochemical journal*, vol. 227, no. 3, pp. 705–10, 1985, doi: 10.1042/bj2270705.
- [12] L. Surmacz and E. Swiezewska, 'Polyisoprenoids – Secondary metabolites or physiologically important superlipids?', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 407, no. 4, pp. 627–632, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.059.
- [13] R. Paliwal, S. R. Paliwal, R. Kenwat, B. D. Kurmi, and M. K. Sahu, 'Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents', *Expert Opin Ther Pat*, vol. 30, no. 3, pp. 179–194, Mar. 2020, doi: 10.1080/13543776.2020.1720649.
- [14] H. Alaydi, P. Downey, M. McKeon-Bennett, and T. Beletskaya, 'Supercritical-CO₂ extraction, identification and quantification of polyphenol as a bioactive ingredient

- from Irish trees species, *Scientific Reports*, vol. 11, p. 7461, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-86393-x.
- [15] A. Jozwiak, R. Brzozowski, Z. Bujnowski, T. Chojnacki, and E. Swiezewska, 'Application of supercritical CO₂ for extraction of polyisoprenoid alcohols and their esters from plant tissues', *The Journal of Lipid Research*, vol. 54, no. 7, pp. 2023–2028, 2013, doi: 10.1194/jlr.D038794.
 - [16] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, and J. Hernández-Méndez, 'Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples', *J Chromatogr A*, vol. 1089, no. 1–2, pp. 1–17, Sept. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.06.072.
 - [17] J. Dai and R. J. Mumper, 'Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties', *Molecules*, vol. 15, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2010, doi: 10.3390/molecules15107313.
 - [18] P. C. Veggi, J. Martinez, and M. A. A. Meireles, 'Fundamentals of Microwave Extraction', in *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, F. Chemat and G. Cravotto, Eds, Boston, MA: Springer US, 2013, pp. 15–52. doi: 10.1007/978-1-4614-4830-3_2.
 - [19] B. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalovic, and C. Pohl, 'Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation', *Analytical Chemistry*, vol. 68, pp. 1033–1039, Jan. 1996.
 - [20] M. Puri, D. Sharma, and C. J. Barrow, 'Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants', *Trends Biotechnol*, vol. 30, no. 1, pp. 37–44, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014.
 - [21] R. Soukup-Hein, M. Warnke, and D. Armstrong, 'Ionic Liquids in Analytical Chemistry', *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 2, pp. 145–168, July 2009, doi: 10.1146/annurev-anchem-060908-155150.
 - [22] I. D. Boateng, D. A. Soetanto, F. Li, X.-M. Yang, and Y.-Y. Li, 'Separation and purification of polyphenols from Ginkgo biloba L. leaves by bulk ionic liquid membrane and optimizing parameters', *Industrial Crops and Products*, vol. 170, p. 113828, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113828.
 - [23] A. A. Antipina, V. S. Popov, and V. Y. Balabaniyan, 'Polyphenols as an original class of natural compounds having a wide spectrum of pharmacological activity', *Farmaciya (Pharmacy)*, vol. 70, no. 5, pp. 15–21, 2021, doi: 10.29296/25419218-2021-05-02.
 - [24] K. Bhardwaj *et al.*, 'Conifers Phytochemicals: A Valuable Forest with Therapeutic Potential', *Molecules*, vol. 26, no. 10, p. 3005, May 2021, doi: 10.3390/molecules26103005.
 - [25] A. V. Pronin *et al.*, 'POLYPRENYL PHOSPHATES AS ADJUVANTS, POLARIZING THE IMMUNE RESPONSE TO Th1', *Russian Journal of Infection and Immunity*, vol. 2, no. 3, Art. no. 3, 2012, doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-645-650.
 - [26] A. V. Sanin, A. V. Pronin, A. N. Narovlyanskiy, S. V. Ozherelkov, and A. M. Sedov, 'Phosphorilated Polyphenols as Universal Agents of Viral Reproduction Suppression', *Biol Bull Rev*, vol. 12, no. 6, pp. 609–624, Dec. 2022, doi: 10.1134/S207908642206007X.
 - [27] E. Swiezewska and W. Danikiewicz, 'Polyisoprenoids: Structure, biosynthesis and function', *Progress in Lipid Research*, vol. 44, no. 4, pp. 235–258, 2005, doi: 10.1016/j.plipres.2005.05.002.

- [28] P. Shridas, J. S. Rush, and C. J. Waechter, 'Identification and characterization of a cDNA encoding a long-chain cis-isoprenyltransferase involved in dolichyl monophosphate biosynthesis in the ER of brain cells', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 312, no. 4, pp. 1349–1356, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.065.
- [29] S. Bellosta, R. Paoletti, and A. Corsini, 'Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions', *Circulation*, vol. 109, no. 23 Suppl 1, pp. III50–57, June 2004, doi: 10.1161/01.CIR.0000131519.15067.1f.
- [30] G. Annibalini *et al.*, 'Impaired myoblast differentiation and muscle IGF-1 receptor signaling pathway activation after N-glycosylation inhibition', *FASEB J*, vol. 38, no. 13, p. e23797, July 2024, doi: 10.1096/fj.202400213RR.
- [31] M. Marchese *et al.*, 'Dolichol-phosphate mannose synthase depletion in zebrafish leads to dystrophic muscle with hypoglycosylated α -dystroglycan', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 477, no. 1, pp. 137–143, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.033.
- [32] G. Cavallini *et al.*, 'Effect of increasing age on tissue dolichol levels in ad libitum fed and food-restricted rats', *Biogerontology*, vol. 4, no. 6, pp. 341–345, 2003, doi: 10.1023/B:BGEN.0000006553.13232.a5.
- [33] G. Cavallini *et al.*, 'Dolichol: A Component of the Cellular Antioxidant Machinery', *Lipids*, vol. 51, no. 4, pp. 477–486, Apr. 2016, doi: 10.1007/s11745-016-4137-x.
- [34] E. V. Vyshlov, E. I. Tsoy, V. S. Sultanov, V. B. Trusov, and V. V. Ryabov, 'Hypolipidemic and Hepatoprotective Effects of a Polyphenol-Containing Drug in Patients with Acute Coronary Syndrome', *Bull Exp Biol Med*, vol. 165, no. 3, pp. 319–321, July 2018, doi: 10.1007/s10517-018-4159-x.
- [35] J. Plat and R. P. Mensink, 'Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects', *Am J Cardiol*, vol. 96, no. 1A, pp. 15D–22D, July 2005, doi: 10.1016/j.amjcard.2005.03.015.
- [36] P. Biernacka, I. Adamska, and K. Felisiak, 'The Potential of Ginkgo biloba as a Source of Biologically Active Compounds – A Review of the Recent Literature and Patents', *Molecules*, vol. 28, no. 10, p. 3993, May 2023, doi: 10.3390/molecules28103993.
- [37] J. K. Liao, 'Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins', *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 3, p. 285, Aug. 2002, doi: 10.1172/JCI16421.
- [38] H. Mo, R. Jeter, A. Bachmann, S. T. Yount, C.-L. Shen, and H. Yeganehjoo, 'The Potential of Isoprenoids in Adjuvant Cancer Therapy to Reduce Adverse Effects of Statins', *Front. Pharmacol.*, vol. 9, p. 1515, Jan. 2019, doi: 10.3389/fphar.2018.01515.
- [39] H. Yuan *et al.*, 'Preparation of polyphenol/poly (β -amino ester)/galactose targeted micelle carrier for enhancing cancer therapy', *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 16, no. 5, p. 104679, May 2023, doi: 10.1016/j.arabjc.2023.104679.
- [40] O. Gawrys *et al.*, 'Cationic derivative of polyphenol, a potential component of liposomal drug carriers, does not alter renal function in rats', *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 116, no. 5, pp. 659–662, 2014, doi: 10.1002/ejlt.201300489.
- [41] V. P. Torchilin, 'Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging', *AAPS J*, vol. 9, p. E128–E147, 2007.
- [42] O. C. Farokhzad and R. Langer, 'Impact of Nanotechnology on Drug Delivery', *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 16–20, Jan. 2009, doi: 10.1021/nn900002m.

- [43] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, and C. Solans, 'Formation and stability of nano-emulsions', *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 108–109, pp. 303–318, May 2004, doi: 10.1016/j.cis.2003.10.023.
- [44] W. Mehnert and K. Mäder, 'Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications', *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 47, no. 2–3, pp. 165–196, Apr. 2001, doi: 10.1016/s0169-409x(01)00105-3.
- [45] T. R. Hoare and D. S. Kohane, 'Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges', *Polymer*, vol. 49, no. 8, pp. 1993–2007, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
- [46] M. R. Prausnitz and R. Langer, 'Transdermal drug delivery', *Nat Biotechnol*, vol. 26, no. 11, pp. 1261–1268, Nov. 2008, doi: 10.1038/nbt.1504.
- [47] A. V. Kabanov and S. V. Vinogradov, 'Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities', *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 48, no. 30, pp. 5418–5429, 2009, doi: 10.1002/anie.200900441.
- [48] J. E. H. Gründahl *et al.*, 'Life with too much polyprenol: polyprenol reductase deficiency', *Mol Genet Metab*, vol. 105, no. 4, pp. 642–651, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ymgme.2011.12.017.
- [49] P. Y. K. Van den Bergh *et al.*, 'A homozygous DPM3 mutation in a patient with alpha-dystroglycan-related limb girdle muscular dystrophy', *Neuromuscul Disord*, vol. 27, no. 11, pp. 1043–1046, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.nmd.2017.07.006.
- [50] A. Buczkowska, E. Swiezewska, and D. J. Lefeber, 'Genetic defects in dolichol metabolism', *J Inherit Metab Dis*, vol. 38, no. 1, pp. 157–169, 2015, doi: 10.1007/s10545-014-9760-1.
- [51] A. Jaśkiewicz, B. Pająk, A. Litwiniuk, K. Urbańska, and A. Orzechowski, 'Geranylgeraniol Prevents Statin-Dependent Myotoxicity in C2C12 Muscle Cells through RAP1 GTPase Prenylation and Cytoprotective Autophagy', *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, p. 6463807, May 2018, doi: 10.1155/2018/6463807.
- [52] A. Jaśkiewicz, B. Pająk, M. Łabieniec-Watała, C. D. Palma, and A. Orzechowski, 'Diverse Action of Selected Statins on Skeletal Muscle Cells-An Attempt to Explain the Protective Effect of Geranylgeraniol (GGOH) in Statin-Associated Myopathy (SAM)', *J Clin Med*, vol. 8, no. 5, p. 694, May 2019, doi: 10.3390/jcm8050694.
- [53] C. Vaklavas, Y. S. Chatzizisis, A. Ziakas, C. Zamboulis, and G. D. Giannoglou, 'Molecular basis of statin-associated myopathy', *Atherosclerosis*, vol. 202, no. 1, pp. 18–28, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.021.
- [54] Å. Jakobsson, E. Swiezewska, T. Chojnacki, and G. Dallner, 'Uptake and modification of dietary polyprenols and dolichols in rat liver', *FEBS Letters*, vol. 255, no. 1, pp. 32–36, 1989, doi: 10.1016/0014-5793(89)81055-5.
- [55] M. Kanagawa *et al.*, 'Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression', *Hum Mol Genet*, vol. 22, no. 15, pp. 3003–3015, Aug. 2013, doi: 10.1093/hmg/ddt157.
- [56] S. J. Foltz *et al.*, 'Four-week rapamycin treatment improves muscular dystrophy in a fukutin-deficient mouse model of dystroglycanopathy', *Skeletal Muscle*, vol. 6, no. 1, p. 20, June 2016, doi: 10.1186/s13395-016-0091-9.
- [57] C. Ortiz-Cordero *et al.*, 'NAD⁺ enhances ribitol and ribose rescue of α -dystroglycan functional glycosylation in human FKRP-mutant myotubes', *eLife*, vol. 10, p. e65443, Jan. 2021, doi: 10.7554/eLife.65443.

- [58] M. Kanagawa, 'Ribitol phosphate and therapeutic strategy of muscular dystrophy', *Glycoforum*, vol. 25, p. A14, Oct. 2022.
- [59] E. Bergamini *et al.*, 'Ageing and oxidative stress: a role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes?', *J Alzheimers Dis*, vol. 6, no. 2, pp. 129–135, Apr. 2004, doi: 10.3233/jad-2004-6204.
- [60] L. Ušacka *et al.*, 'Polyprenol Liposomes Improve the Efficiency of Oxygen Usage in Well-Trained Amateur Athletes', *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, vol. 76, no. 1, pp. 58–63, Mar. 2022, doi: 10.2478/prolas-2022-0009.
- [61] V. I. Karpickiy, 'METHOD FOR PREPARING POLYPRENOLS', 2005
- [62] 郑光耀, 薄采颖, 宋强, 王成章, and 周维纯, 'Method for extracting high purity polyprenol from plant needle leaf raw material', CN101654398B, Sept. 05, 2012 Accessed: Mar. 31, 2025. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/CN101654398B/en>
- [63] K. B, H. J, S. E, C. T, and M. A, 'On the specific pattern of long chain polyprenols in green needles of Pinus mugo Turra', *Acta biochimica Polonica*, vol. 44, no. 4, 1997, Accessed: July 26, 2025. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9584863/>
- [64] H. H, L. Y, Q. J, Z. Q, C. Z, and W. W, 'Adapting liposomes for oral drug delivery', *Acta pharmaceutica Sinica. B*, vol. 9, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.apsb.2018.06.005.
- [65] 'SuperCell® HEPA (2017.) · Uztura bagātinātāji – Pārtikas un veterinārā dienesta e-pakalpojumu vietne'. Accessed: Aug. 09, 2025. [Online]. Available: <https://pikalpojumi.pvd.gov.lv/lv/supplements/8915>
- [66] M. Patel and K. Sawant, 'Enhanced Bioavailability and Intestinal Uptake of Nanoparticles After Oral Delivery', in *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, J. K. Patel and Y. V. Pathak, Eds, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 385–397. doi: 10.1007/978-3-030-83395-4_21.
- [67] S.-J. Jeong, W.-Y. Song, C.-W. Park, and D.-W. Kim, 'Recent approaches to investigate drug delivery systems through the lymphatic pathway using oral lipid-based formulations', *J. Pharm. Investig.*, vol. 54, no. 2, pp. 131–144, Mar. 2024, doi: 10.1007/s40005-023-00656-5.
- [68] L. Yang, C. Z. Wang, J. Z. Ye, and H. T. Li, 'Hepatoprotective effects of polyprenols from Ginkgo biloba L. leaves on CCl4-induced hepatotoxicity in rats', *Fitoterapia*, vol. 82, no. 6, pp. 834–840, 2011, doi: 10.1016/j.fitote.2011.04.009.
- [69] S. V.s, S. V.p, R. V.i, R. E.b, and N. T.v, 'Plant long-chain isoprenoid alcohols (polyprenols) protect liver via stabilisation of cell membranes and organelle structure in a carbon tetrachloride animal model of toxic liver damage', *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, no. 10 (146), Art. no. 10 (146), 2017.
- [70] V. Ib, C. M, H. A, and K. Am, 'The Biomedical Importance of the Missing Pathway for Farnesol and Geranylgeraniol Salvage', *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 27, no. 24, Dec. 2022, doi: 10.3390/molecules27248691.
- [71] C. I, L. C, P. G, G. D, B. A, and R. C, 'Geranylgeraniol prevents the cytotoxic effects of mevastatin in THP-1 cells, without decreasing the beneficial effects on cholesterol synthesis', *British journal of pharmacology*, vol. 158, no. 7, Dec. 2009, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00465.x.

- [72] B. M, G. J, P. E, S. E, and D. G, 'Phosphorylation of farnesol in rat liver microsomes: properties of farnesol kinase and farnesyl phosphate kinase', *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 353, no. 2, May 1998, doi: 10.1006/abbi.1998.0611.
- [73] M. Te, R. Ds, and S. Rd, 'Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation by the nonsterol mevalonate metabolite farnesol in vivo', *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 14, Apr. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.14.7916.
- [74] L. Y *et al.*, 'Effects of coenzyme Q10 supplementation on glycemic control: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials', *EclinicalMedicine*, vol. 52, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101602.
- [75] W. Mahjabeen, D. A. Khan, S. A. Mirza, and M. A. Pervez, 'Effects of delta-tocotrienol supplementation on Glycemic Control, oxidative stress, inflammatory biomarkers and miRNA expression in type 2 diabetes mellitus: A randomized control trial', *Phytotherapy Research*, vol. 35, no. 7, pp. 3968–3976, 2021, doi: 10.1002/ptr.7113.
- [76] A. Medoro, M. Intrieri, D. Passarella, D. C. Willcox, S. Davinelli, and G. Scapagnini, 'Astaxanthin as a metabolic regulator of glucose and lipid homeostasis', *Journal of Functional Foods*, vol. 112, p. 105937, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.jff.2023.105937.
- [77] E. Chung *et al.*, 'Beneficial effect of dietary geranylgeraniol on glucose homeostasis and bone microstructure in obese mice is associated with suppression of proinflammation and modification of gut microbiome', *Nutrition Research*, vol. 93, pp. 27–37, Sept. 2021, doi: 10.1016/j.nutres.2021.07.001.
- [78] J. Fedotova, V. Soultanov, T. Nikitina, V. Roschin, N. Ordyan, and L. Hritcu, 'Ropen® treatment reverses anxiety-like behavior and monoamines levels in gonadectomized rat model of Alzheimer's disease', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 83, pp. 1444–1455, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.08.065.
- [79] W. C, H. L, Y. M, Z. Gy, and L. Xy, 'Effects of polyprenols from pine needles of *Pinus massoniana* on ameliorating cognitive impairment in a D-galactose-induced mouse model', *Age (Dordrecht, Netherlands)*, vol. 36, no. 4, 2014, doi: 10.1007/s11357-014-9676-6.
- [80] M. Welti, 'Regulation of dolichol-linked glycosylation', *Glycoconj J*, vol. 30, no. 1, pp. 51–56, Jan. 2013, doi: 10.1007/s10719-012-9417-y.
- [81] V. Cantagrel *et al.*, 'SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder', *Cell*, vol. 142, no. 2, pp. 203–217, July 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.001.
- [82] T. Chojnacki and G. Dallner, 'The uptake of dietary polyprenols and their modification to active dolichols by the rat liver', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, no. 2, pp. 916–922, 1983.
- [83] R. Deichmann, C. Lavie, and S. Andrews, 'Coenzyme Q10 and Statin-Induced Mitochondrial Dysfunction', *Ochsner Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 16–21, Mar. 2010.
- [84] H. Qu, M. Guo, H. Chai, W.-T. Wang, Z.-Y. Gao, and D.-Z. Shi, 'Effects of Coenzyme Q10 on Statin-Induced Myopathy: An Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials', *J Am Heart Assoc*, vol. 7, no. 19, p. e009835, Oct. 2018, doi: 10.1161/JAHA.118.009835.

- [85] M. A. Hlatky *et al.*, 'Statin-Associated Muscle Symptoms Among New Statin Users Randomly Assigned to Vitamin D or Placebo', *JAMA Cardiol*, vol. 8, no. 1, pp. 74–80, Jan. 2023, doi: 10.1001/jamacardio.2022.4250.
- [86] B. Atıl, E. Siczkowski, and M. Hohenegger, 'Statins reduce endogenous dolichol levels in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y', *BMC Pharmacology and Toxicology*, vol. 13, no. 1, p. A51, Sept. 2012, doi: 10.1186/2050-6511-13-S1-A51.
- [87] O. Gawrys *et al.*, 'Polyprenol-Based Lipofecting Agents for In Vivo Delivery of Therapeutic DNA to Treat Hypertensive Rats', *Biochem Genet*, vol. 59, no. 1, pp. 62–82, Feb. 2021, doi: 10.1007/s10528-020-09992-9.
- [88] M. Fathi, Á. Martín, and D. J. McClements, 'Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems', *Trends in Food Science and Technology*, vol. 39, no. 1, pp. 18–39, 2014, doi: 10.1016/j.tifs.2014.06.007.
- [89] H. Sagami, E. Swiezewska, and Y. Shidoji, 'The history and recent advances in research of polyprenol and its derivatives', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 82, no. 6, pp. 947–955, June 2018, doi: 10.1080/09168451.2017.1411775.
- [90] E. Tsoi, E. Vyshlov, and V. Ryabov, 'Positive effect of polyprenol-containing drug on anxiety, depression and cognitive disorders in patients with acute coronary syndrome', *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*, vol. 10, no. Supplement_1, p. zuab020.107, Apr. 2021, doi: 10.1093/ehjacc/zuab020.107.
- [91] V. S. Soultanov *et al.*, 'Ropren® improves liver and pancreatic function in patients with chronic alcoholism', pp. 12–18, 2010.
- [92] J. Fedotova, V. Soultanov, T. Nikitina, V. Roschin, N. Ordyan, and L. Hritcu, 'Cognitive-enhancing activities of the polyprenol preparation Ropren® in gonadectomized β -amyloid (25–35) rat model of Alzheimer's disease', *Physiology and Behavior*, vol. 157, pp. 55–62, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.01.035.
- [93] 'PCSK-9 Inhibitors for Statin Intolerance: Lessons and Considerations from the GAUSS-3 Trial', American College of Cardiology. Accessed: July 28, 2025. [Online]. Available: https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2016/10/04/08/08/http%3a%2f%2fwww.acc.org%2flatest-in-cardiology%2farticles%2f2016%2f10%2f04%2f08%2f08%2fpcsk-9-inhibitors-for-statin-intolerance%3futm_source%3dchatgpt.com
- [94] S. E. Nissen *et al.*, 'Bempedoic Acid and Cardiovascular Outcomes in Statin-Intolerant Patients', *N Engl J Med*, vol. 388, no. 15, pp. 1353–1364, Apr. 2023, doi: 10.1056/NEJMoa2215024.
- [95] K. K. Ray *et al.*, 'Safety and Efficacy of Bempedoic Acid to Reduce LDL Cholesterol', *New England Journal of Medicine*, vol. 380, no. 11, pp. 1022–1032, Mar. 2019, doi: 10.1056/NEJMoa1803917.
- [96] F. J. Raal *et al.*, 'Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia', *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 16, pp. 1520–1530, Apr. 2020, doi: 10.1056/NEJMoa1913805.
- [97] SEARCH Collaborative Group *et al.*, 'SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy – a genomewide study', *N Engl J Med*, vol. 359, no. 8, pp. 789–799, Aug. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0801936.
- [98] A. Stewart, 'SLCO1B1 Polymorphisms and Statin-Induced Myopathy', *PLoS Currents*, vol. 5, p. ecurrents.eogt.d21e7f0c58463571bb0d9d3a19b82203, Dec. 2013, doi: 10.1371/currents.eogt.d21e7f0c58463571bb0d9d3a19b82203.

- [99] S. Manickam, V. R. Rajagopalan, R. Kambale, R. Rajasekaran, S. Kanagarajan, and R. Muthurajan, 'Plant Metabolomics: Current Initiatives and Future Prospects', *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 45, no. 11, p. 8894, Nov. 2023, doi: 10.3390/cimb45110558.
- [100] D. Milenkovic, B. Jude, and C. Morand, 'miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 64, pp. 40–51, Sept. 2013, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.046.
- [101] M. Waris, E. Koçak, E. M. Gonulalan, L. O. Demirezer, S. Kır, and E. Nemitlu, 'Metabolomics analysis insight into medicinal plant science', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 157, p. 116795, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116795.

