

Is there any effect of coenzyme Q10 on prevention of myringosclerosis? Experimental study with rats

A coenzima Q10 produz efeito sobre a prevenção da miringoesclerose? Estudo experimental com ratos

Filiz Aydoğan¹, Emine Aydın¹, Eren Taştan¹, Şükran Akgedik², Ahmet Tekeli³, Hüseyin Üstün²

Keywords:

antioxidants;
sclerosis;
tympanic membrane.

Abstract

Recent studies have shown that the formation of myringosclerosis could be reduced by the application of antioxidant enzymes and elements. **Objective:** The aim of this study was to investigate the effectiveness of coenzyme Q10 on the prevention of experimentally induced myringosclerosis. **Method:** Forty-eight healthy female wistar albino rats were bilaterally myringotomized and divided into four groups randomly. Group A received no treatment, group B was administered oral coenzyme Q10. Group C was treated with topical saline solution, group D received topically coenzyme Q10. On the 15th day of treatment, tympanic membranes were examined by otomicroscopy. Myringosclerotic lesions were documented semiquantitatively by using 4-point scale. After harvesting tympanic membranes were evaluated histopathologically. **Results:** In group D (topical coenzyme Q10), we observed otitis within the first four days of the study and this group was excluded from the study. Regarding otomicroscopic examinations, there were no significant differences among groups in myringosclerosis formation ($p = 0.241$). When group A (non treatment) compared to groups B and C regarding histopathologic examination, the results demonstrated statistical significant differences ($p = 0.004$; $p < 0.001$), respectively. There was no statistically significant difference between groups B and C ($p = 0.160$). **Conclusion:** Oral administration of coenzyme Q10 did not reduce myringosclerosis formation in myringotomized rats.

Palavras-chave:

antioxidantes;
esclerose;
membrana timpânica.

Resumo

Estudos recentes demonstram que a formação de miringoesclerose pode ser reduzida pela aplicação de enzimas e elementos antioxidantes. **Objetivo:** Investigar a eficácia da coenzima Q10 na prevenção de miringoesclerose experimentalmente induzida. **Método:** Quarenta e oito ratas Wistar albinas saudáveis sofreram miringotomia e foram divididas aleatoriamente em quatro grupos. O Grupo A não recebeu tratamento algum; o Grupo B recebeu coenzima Q10 por via oral; o Grupo C foi tratado com soro fisiológico tópico; e o Grupo D recebeu coenzima Q10 tópica. No 15^o dia de tratamento, as membranas timpânicas foram examinadas por otomicroscopia. As lesões miringoescleróticas foram documentadas de forma semiquantitativa por meio de uma escala de quatro pontos. Após a coleta, as membranas timpânicas foram avaliadas por histopatologia. **Resultados:** No grupo D (coenzima Q10 tópica) foi observada a ocorrência de otite nos primeiros quatro dias do estudo, o que levou à sua exclusão do estudo. O exame de otomicroscopia não revelou diferenças significativas entre grupos em termos de formação de miringoesclerose ($p = 0,241$). Diferenças estatisticamente significativas foram observada quando os exames histopatológicos do grupo A foram comparados aos dos grupos B e C ($p = 0,004$; $p < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos B e C ($p = 0,160$). **Conclusão:** A administração oral de coenzima Q10 não reduziu a formação de miringoesclerose nos ratos submetidos à miringotomia.

¹ Médico (Departamento de Otorrinolaringologia, Hospital de Ensino e Pesquisa de Ankara).

² Médico (Departamento de Patologia, Hospital de Ensino e Pesquisa de Ankara).

³ Professor Doutor Assistente. (Departamento de Zootecnia e Nutrição Animal, Faculdade de Agricultura da Universidade Yuzuncu Yil).
Departamento de Otorrinolaringologia, Hospital de Pesquisa e Treinamento Ankara.

Endereço para correspondência: Filiz Aydoğan. Konutkent Mah. Oyak 1 Blok 20/9 Çayyolu, Ankara. Turquia.

E-mail: flzydgn@yahoo.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) do BJORL em 23 de setembro de 2012. cod. 10471.

Artigo aceito em 4 de março de 2013.

INTRODUÇÃO

A timpanosclerose é um processo degenerativo da camada de tecido conjuntivo que afeta tanto a membrana timpânica (MT) como a mucosa do ouvido médio^{1,2}. A localização mais comum da timpanosclerose é a MT, na chamada miringoesclerose (ME)¹. É caracterizada pela hialinização e calcificação da camada de colágeno em certas áreas da MT³⁻⁶. Histologicamente, há um aumento das fibras de colágeno devido à infiltração progressiva de fibroblastos, à degeneração hialina e à deposição extracelular de cálcio na lâmina própria^{2,4}. Ela se manifesta como uma lesão de forma semicircular ou de ferradura com manchas brancas normalmente nos quadrantes anterior e posterior da MT⁶. A miringoesclerose (ME) é uma seqüela comum em pacientes com otite média recorrente, otite média supurativa, otite média crônica e inserção de tubo de ventilação³⁻⁵. Apesar da morfologia da ME já ter sido bem descrita, a exata etiologia e a patogenia ainda carecem de melhor compreensão. Várias hipóteses foram propostas para a etiologia da ME, incluindo espécies reativas de oxigênio, sensibilidade imunológica, lesão mecânica, distúrbio metabólico e reação inflamatória^{3,7-9}.

A coenzima Q10 (CoQ10) é um poderoso antioxidante intracelular regenerável e bioenergético^{10,11}. Está presente em todas as células e é sintetizada endogenamente, além de através da ingestão de alimentos^{11,12}. Age como um portador de elétrons e prótons na cadeia respiratória mitocondrial e é necessária na produção de ATP¹⁰. Protege fosfolípidios e proteínas da membrana mitocondrial contra a peroxidação e protege o DNA contra o dano oxidativo que acompanha a peroxidação de lípidos¹¹. A CoQ10 age como um antioxidante, apoiando a regeneração de outros antioxidantes, influenciando a estabilidade, fluidez e permeabilidade das membranas, estimulando o crescimento celular e inibindo a apoptose celular¹². Está presente no corpo na forma reduzida (ubiquinol) como oxidada (ubiquinona)¹³. Sua forma reduzida, o ubiquinol, também é um antioxidante¹⁰. Quando as membranas celulares são oxidadas, o ubiquinol é o primeiro antioxidante a ser consumido¹⁴. Além disso, a formação de lípidos oxidados e o consumo de α -tocoferol são suprimidos na presença de ubiquinol¹⁴.

Estudos recentes demonstram que a formação de ME após miringotomia experimental pode ser reduzida com a aplicação de enzimas e elementos antioxidantes^{1,3}. À luz destes estudos, consideramos que a ME também poderia ser reduzida ou prevenida com a aplicação do antioxidante CoQ10.

O presente estudo pretende investigar o possível efeito preventivo da CoQ10 sobre o desenvolvimento de ME na MT de ratos submetidos a miringotomia avaliados por otomicroscopia e histopatologia. Pelo que sabemos, este é o primeiro estudo desenhado para avaliar os efeitos preventivos da administração tópica e oral de CoQ10 sobre o desenvolvimento da ME.

MÉTODO

Desenho experimental

O presente estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (protocolo 31/03/2010-60/308) e foi conduzido em conformidade com as diretrizes para experimentação com animais do Laboratório de Zootecnia da Escola de Medicina. Os animais foram mantidos em gaiolas normais com acesso livre a alimentos e água a uma temperatura de 20 a 22°C e sob iluminação artificial por 12 horas diárias. Foi fornecida ração em pellets (2700 ME Kcal/kg, 23% HP) e água à vontade. Houve um período de quarentena e aclimação de uma semana.

Quarenta e oito ratas Wistar albinas com peso médio de 220 gramas foram utilizadas no estudo. Os animais que apresentaram infecção externa ou de ouvido médio, aderências, perfurações ou retrações da MT durante o exame por otomicroscopia foram excluídos do estudo. As ratas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (50 mg/kg, intramuscular). A miringotomia foi executada bilateralmente no quadrante superior posterior da MT com o uso de espéculo auricular sob otomicroscopia (Opmi 1, Zeiss, Alemanha). Não foi observado sangramento intratimpânico durante o procedimento.

As ratas foram separadas aleatoriamente em quatro grupos, cada um com 12 animais. O grupo A serviu de controle, não recebendo tratamento algum. No grupo B, os animais receberam 100 mg/kg/dia de CoQ10 por agulha de alimentação. Os sujeitos do grupo C receberam aplicação tópica de 0,1 ml de soro fisiológico em ambos os ouvidos. O grupo D recebeu 100 mg/kg/dia de CoQ10 (GNC 50 mg cápsula gelatinosa diluída em 0,2 ml de soro fisiológico) tópicos em ambos os ouvidos. O soro fisiológico e a CoQ10 diluída em soro fisiológico foram pingados no meato acústico externo com o uso de uma seringa. O medicamento foi administrado diariamente por 15 dias. A dose do suplemento de CoQ10 foi determinada segundo a literatura¹⁴. Duas membranas timpânicas de outro rato foram usadas na comparação entre as membranas timpânicas dos grupos de estudo e a MT saudável intacta⁷. As membranas timpânicas das ratas anestesiadas foram examinadas por otomicroscopia no 15º dia após o tratamento. A situação das membranas timpânicas foi avaliada e as lesões miringoescleróticas documentadas de forma semiquantitativa por meio de uma escala de quatro pontos: (0) ausência de placas miringoescleróticas visíveis; (1) ME ocasional com halo esbranquiçado ao redor do tímpano; (2) ME moderada com alo esbranquiçado ao redor do tímpano e linha branca ao lado do manúbrio do martelo e ao longo do anel; e (3) ME grave com depósitos esbranquiçados confluentes formando padrão em ferradura¹⁵.

Avaliação histopatológica

No 15º, as ratas foram sacrificadas com pentobarbital (80 mg/kg, injeção intraperitoneal). A MT e seu anel

foram removidos conjuntamente. As peças foram fixadas em formol 10% e descalcificadas em solução de óxido nítrico 7%. As peças foram então incluídas em parafina. Após processamento de rotina, as peças foram cortadas em seções de 4 µm de espessura. Os cortes foram preparados no nível da pars tensa onde foi feita a miringotomia e corados com hematoxilina-eosina e azul de toluidina. O azul de toluidina foi usado para avaliar as mudanças escleróticas no tecido conjuntivo da lâmina própria. No microscópio óptico, as peças coradas foram avaliadas por um patologista cegado em termos de grau de esclerose, hialinização e intensidade da proliferação de fibroblastos na lâmina própria e espessura da MT. Os dados foram documentados e comparados à MT da rata normal por meio da escala de cinco pontos de 0 (normal) a 4. Os grupos foram comparados segundo os achados da otomicroscopia e exames histopatológicos.

Análise estatística

A análise estatística foi feita com o uso do *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, United States). Os dados foram expressos em medianas (mínimo-máximo) para dados ordinais e número de casos e percentuais para variáveis nominais. As diferenças medianas entre grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal Wallis. Quando o *p*-valor pelo teste de Kruskal Wallis denotou significância estatística, foi usado o teste de comparações múltiplas de Conover para identificar qual grupo se diferenciava dos demais. Dados nominais foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado de Pearson ou pelo teste exato de Fisher, quando adequado. O nível de significância estatística foi firmado em 5%.

RESULTADOS

Grupo excluído por causa de otite e óbitos

Duas ratas (1/B,1/C) foram a óbito por conta de causas naturais ao fim do estudo. No grupo D (tóxico), foram observados casos de otite durante os primeiros quatro dias do estudo, o que levou à sua exclusão do estudo. Cinco ouvidos (2/A, 1/B, 2/C) e mais um ouvido (1/C) foram identificados nos exames por otomicroscopia e histopatologia respectivamente como tendo otite média e foram excluídos do estudo. Consequentemente, um total de seis ouvidos e o grupo D (tóxico) foram excluídos do estudo por causa de otite.

Exame por otomicroscopia

Todas as perfurações de MT nos quatro grupos cicatrizaram. A Tabela 1 resume os resultados dos exames por otomicroscopia. A análise estatística dos exames por otomicroscopia não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em termos de formação de ME ($p = 0,241$). As comparações das medianas oriundas

das avaliações por otomicroscopia e histopatologia são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 1. Exame por otomicroscopia das lesões escleróticas.

Grupos	Ouvidos	Escala de miringoesclerose (pontos)			
		0	1	2	3
A (sem tratamento)	22	3	8	11	0
B (CoQ10 oral)	21	1	6	14	0
C (soro fisiológico)	19	3	3	9	4

CoQ10: Coenzima Q10.

Tabela 2. Comparação das medianas dos exames por otomicroscopia e histopatologia.

Grupos e ouvidos	Otomicroscopia	Histopatologia
A (sem tratamento) 22	1,5 (0-2)	1 (0-4)
B (CoQ10 oral) 21	2 (0-2)	2 (0-4)
C (soro fisiológico) 19	2 (0-3)	3 (1-4)
<i>p</i> -valor	241	< 0,001

Dados expressos em medianas (mínimo-máximo); CoQ10: Coenzima Q10.

Exame histopatológico

As membranas timpânicas normais eram delgadas e livres de células inflamatórias (Figura 1). Houve extensas lesões escleróticas e intensa presença de fibroblastos na lâmina própria e aumento da espessura da MT nos grupos B (oral) e C (soro fisiológico) (Figuras 2 e 3). As membranas timpânicas do grupo A (sem tratamento) eram mais delgadas que as do grupo B e C. A atividade de fibroblastos na lâmina própria e as lesões escleróticas eram também menos acentuadas neste grupo. Os achados histopatológicos por grupo são demonstrados na Tabela 3. A comparação dos achados histopatológicos do grupo A em relação aos grupos B e C suscitou diferenças estatísticas ($p = 0,004$; $p < 0,001$, respectivamente). Não houve diferença estatística entre os grupos B e C ($p = 0,160$).

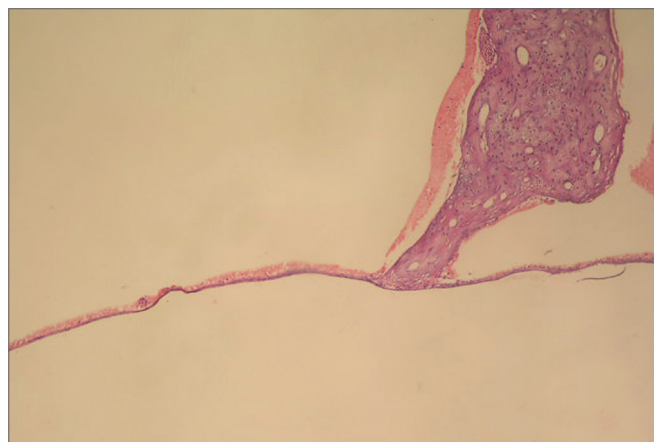


Figura 1. Aparência de membrana timpânica normal (0 pontos na escala) do grupo A (hematoxilina e eosina, ampliação original x100).

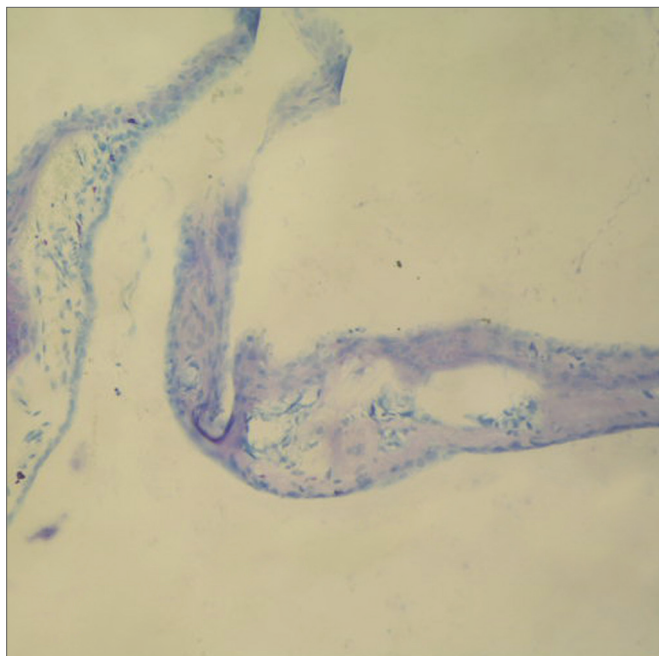


Figura 2. Membrana timpânica avaliada com 4 pontos na escala, pertencente ao grupo B; Pode-se observar proliferação de fibroblastos, aumento acentuado da espessura da membrana e mudanças escleróticas (azul de toluidina, ampliação original x200).

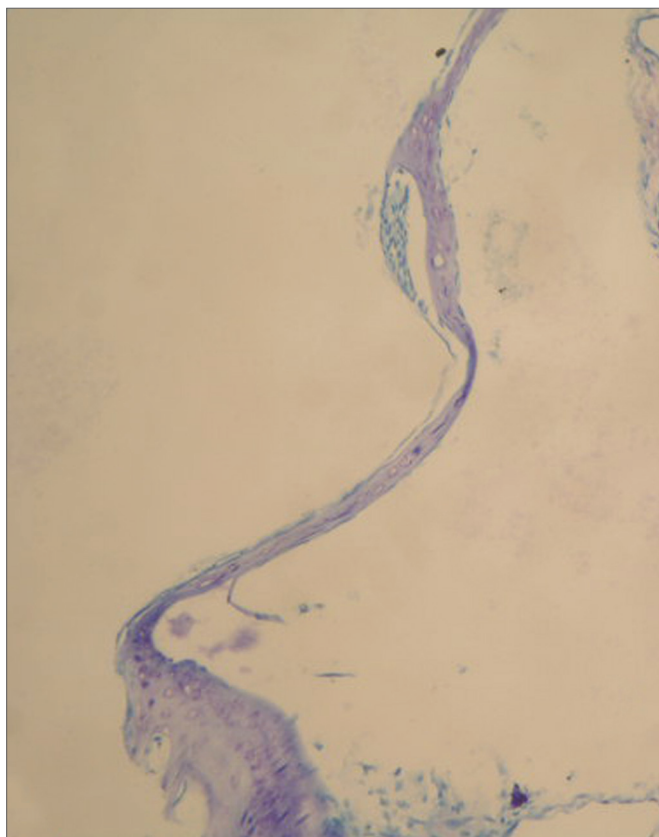


Figura 3. Membrana timpânica avaliada com 2 pontos na escala, pertencente ao grupo C; Pode-se observar placa moderadamente espessada e esclerótica (azul de toluidina, ampliação original x200).

Tabela 3. Achados histopatológicos das membranas timpânicas.

Grupos	Ouvidos	Escala histopatológica				
		0	1	2	3	4
A (sem tratamento)	22	1	12	6	2	1
B (CoQ10 oral)	21	3	0	8	8	2
C (soro fisiológico)	19	0	2	4	10	3

CoQ10: Coenzima Q10.

DISCUSSÃO

Estudos recentes enfatizam que radicais livres derivados do oxigênio, lesões mecânicas e doenças inflamatórias podem ser os principais fatores na formação da ME^{8,9}. Mattsson et al.⁹ observaram que lesões de ME ocorriam em maior número com o aumento das concentrações de oxigênio quando ratos submetidos à miringotomia eram expostos a diferentes concentrações de oxigênio, sugerindo que o mecanismo envolvido poderia estar relacionado à formação de radicais de oxigênio. A miringotomia permite a passagem do ar ambiente pela cavidade do ouvido médio, resultando em condição relativamente hiperóxica. Esta condição levaria a um aumento na oxigenação dos tecidos, provocando aumento na produção de radicais livres derivados do oxigênio, o que poderia deflagrar dano tecidual irreversível, fibrose e degeneração hialina, como visto na ME⁹.

Muitos estudos experimentais tentaram evitar o desenvolvimento da ME por meio da aplicação de agentes quelantes de radicais livres por via tópica ou sistêmica^{3-5,7,15,16}. Foi relatado que a aplicação tópica de agentes como ácido ascórbico¹⁵, N-acetilcisteína¹⁶, cobre-zinco superóxido dismutase mais catalase e deferoxamina inibiu o desenvolvimento de ME⁶. Por outro lado, estudos anteriores também observaram que a administração sistêmica de L-carnitina¹⁷, selênio⁵, éster fenetil do ácido cafeico³, vitamina E (alfa-tocoferol)⁴ e ginkgo biloba⁷ foram eficazes na prevenção da formação de ME. Além disso, Polat et al.¹ demonstraram que a aplicação tópica e intramuscular de vitamina E reduz a formação de ME e das espécies reativas de oxigênio na MT. Consequentemente, os achados publicados têm corroborado a hipótese de que a formação de espécies reativas de oxigênio contribui significativamente para o desenvolvimento de ME^{1,15}.

Foi identificado que o desenvolvimento de ME após miringotomia pode ser retardado com medicamentos anti-inflamatórios como dexametasona ou fenspirida tópica⁸. Alguns agentes que reduziram o desenvolvimento de ME têm propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias^{3,7,16}.

No grupo D foi observada a ocorrência de otite, fato não descrito em outros estudos com animais em que houve aplicação de agentes tópicos^{1,15,16}. Acreditamos que uma possível irritação química causada pela aplicação tópica de CoQ10 possa ter causado inflamação das membranas timpânicas dos animais incluídos em nosso estudo.

Mattsson et al.⁸ relataram que a observação de ME à otomicroscopia não corroborou plenamente os achados da microscopia óptica.

Ainda que vários agentes tenham comprovada eficácia na prevenção de ME em estudos experimentais, não há achados objetivos e padronizados para a avaliação histopatológica da ME². Utilizamos uma escala de cinco pontos (de 0 a 4) para avaliar o grau de esclerose, hialinização, intensidade da proliferação de fibroblastos e espessura da MT. Alguns estudos indicaram que a redução da evolução da ME levou a um aumento indesejável da MT devido ao aumento no número de fibroblastos no exame histopatológico^{5,15,16}. Contrariamente a estes estudos, alguns autores observaram uma relação positiva entre espessura de MT e grau de ME^{2-4,7,17}. Nossos resultados foram semelhantes aos da literatura.

A CoQ10 é uma molécula hidrofóbica relativamente grande. Portanto, sua absorção tecidual é frequentemente lenta e limitada¹². Tecidos com exigências energéticas maiores, como coração, rins, fígado e músculos esqueléticos, contêm altos teores de CoQ10¹⁰. Foi sugerido que há possível discrepância entre as concentrações extra e intracelulares de CoQ10¹¹.

CONCLUSÃO

Na presente pesquisa, identificamos que a administração sistêmica de CoQ10 por 15 dias em ratas submetidas à miringotomia não evitou o desenvolvimento de miringoesclerose. Neste contexto, a ineficácia devido à dosagem e duração de aplicação de CoQ10 pode ser reavaliada. Apesar de não termos medido os níveis plasmáticos de CoQ10, confirmamos que a dosagem e a duração da administração de CoQ10 preconizadas neste estudo resultaram em eficiente efeito antioxidante segundo a literatura^{11,12,18,19}.

Considerando a ineficácia da CoQ10 sobre a ME, especulamos que a CoQ10 tem mecanismo de ação ainda não esclarecido sobre o desenvolvimento de ME.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos Salih Ergöçen por sua ajuda na análise estatística dos dados de nosso estudo.

REFERÊNCIAS

1. Polat S, Oztürk O, Uneri C, Yüksel M, Haklar G, Bozkurt S, et al. Determination of reactive oxygen species in myringotomized tympanic membranes: effect of vitamin E treatment. *Laryngoscope*. 2004;114(4):720-5. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-200404000-00023> PMID:15064630
2. Ozcan I, Selcuk A, Ozcan KM, Akdogan O, Giray SG, Dere H, et al. The effect of topical doxycycline in the prevention of experimental tympanosclerosis. *Laryngoscope*. 2008;118(6):1051-6. <http://dx.doi.org/10.1097/MLG.0b013e31816770ba> PMID:18388770
3. Song JJ, Kwon SK, Cho CG, Park SW. The effect of caffeic acid phenethyl ester on the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71(8):1287-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2007.05.003> PMID:17544518
4. Kazikdas KC, Uguz MZ, Erbil G, Tugyan K, Yilmaz O, Guneli E, et al. The anti-oxidant effect of alpha-tocopherol in the prevention of experimentally induced myringosclerosis. *Otol Neurotol*. 2006;27(6):882-6. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mao.0000224089.00721.8d> PMID:16788415
5. Görür K, Ozcan C, Polat A, Unal M, Tamer L, Cinel I. The anti-oxidant and anti-apoptotic activities of selenium in the prevention of myringosclerosis in rats. *J Laryngol Otol*. 2002;116(6):426-9. <http://dx.doi.org/10.1258/0022215021911202> PMID:12385352
6. Mattsson C, Marklund SL, Hellström S. Application of oxygen free radical scavengers to diminish the occurrence of myringosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997;106(6):513-8. PMID:9199613
7. Emir H, Kaptan ZK, Samim E, Sungu N, Ceylan K, Ustun H. The preventive effect of ginkgo biloba extract in myringosclerosis: study in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;140(2):171-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.otohns.2008.10.027> PMID:19201283
8. Mattsson C, Stierna P, Hellström S. Treatment with dexamethasone arrests the development of myringosclerosis after myringotomy. *Am J Otol*. 2000;21(6):804-8. PMID:11078067
9. Mattsson C, Magnuson K, Hellström S. Myringosclerosis caused by increased oxygen concentration in traumatized tympanic membranes. Experimental study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104(8):625-32. PMID:7639472
10. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Coenzyme Q10 supplementation and heart failure. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 1):286-93. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00306.x> PMID:17605305
11. Niklowitz P, Sonnenschein A, Janetzky B, Andler W, Menke T. Enrichment of coenzyme Q10 in plasma and blood cells: defense against oxidative damage. *Int J Biol Sci*. 2007;5(4):257-62. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.3.257>
12. Cooke M, Iosia M, Buford T, Shelmadine B, Hudson G, Kerksick C, et al. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J Int Soc Sports Nutr*. 2008;5:8. <http://dx.doi.org/10.1186/1550-2783-5-8> PMID:18318910 PMCid:2315638
13. Molyneux SL, Young JM, Florkowski CM, Lever M, George PM. Coenzyme Q10: is there a clinical role and a case for measurement? *Clin Biochem Rev*. 2008;29(2):71-82. PMID:18787645 PMCid:2533152
14. Choi BS, Song HS, Kim HR, Park TW, Kim TD, Cho BJ, et al. Effect of coenzyme Q10 on cutaneous healing in skin-incised mice. *Arch Pharm Res*. 2009;32(6):907-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-009-1613-3> PMID:19557369
15. Spratley JE, Hellström SO, Mattsson CK, Pais-Clemente M. Topical ascorbic acid reduces myringosclerosis in perforated tympanic membranes. A study in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110(6):585-91. PMID:11407852
16. Ozcan C, Görür K, Cinel I, Talas DU, Unal M, Cinel I. The inhibitory effect of topical N-acetylcysteine application on myringosclerosis in perforated rat tympanic membrane. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2002;63(3):179-84. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5876\(01\)00640-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5876(01)00640-1)
17. Akbaş Y, Pata YS, Görür K, Polat G, Polat A, Ozcan C, et al. The effect of L-carnitine on the prevention of experimentally induced myringosclerosis in rats. *Hear Res*. 2003;184(1-2):107-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5955\(03\)00229-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5955(03)00229-6)
18. Weber C, Jakobsen TS, Mortensen SA, Paulsen G, Hølmer G. Effect of dietary coenzyme Q10 as an antioxidant in human plasma. *Mol Aspects Med*. 1994;15 Suppl:s97-102. [http://dx.doi.org/10.1016/0098-2997\(94\)90018-3](http://dx.doi.org/10.1016/0098-2997(94)90018-3)
19. Kaikkonen J, Tuomainen TP, Nyssonen K, Salonen JT. Coenzyme Q10: absorption, antioxidative properties, determinants, and plasma levels. *Free Radic Res*. 2002;36(4):389-97. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760290021234> PMID:12069102