"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2023.1978256.1393**

Protective effect of coenzyme Q_{10} supplementation on the oxidative stress and histological injury caused by nicotine in the ovary of rats

Yousefizadeh, S.[1*], Louei Monfared, A.[2], Mohammadi, Y.[3]

1- Assistant Professor, Department of Laboratory and Clinical Sciences, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
2- Associate Professor, Department of Histology and Microbiology, Faculty of Paraveterinary, Ilam University, Ilam, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.
[*]Corresponding author's email: sh.yousefizadeh@ilam.ac.ir
(Received: 2023\3\3 Accepted: 2023\6\11)

Abstract

As a poison, nicotine leaves irreparable effects on various tissues of the body, including the reproductive system. Coenzyme Q_{10} has a tremendous effect in raising the body's antioxidant level and preventing poisoning. In the current study, the protective effect of coenzyme Q_{10} supplementation on the changes induced by nicotine in the rat ovary was investigated. For this purpose, 32 adult female Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 8. The rats of the first group (control) were only fed with the usual diet, but the animals of the second group were treated with nicotine at the rate of 0.2 mg/kg, the rats of the third group were treated with coenzyme Q_{10} at the rate of 75 mg/kg and the animals of the fourth group were treated simultaneously using nicotine and coenzyme Q_{10} (with the same amounts) through gavage. At the end of the study period (45 days), the animals were euthanised and blood samples were taken for hormonal and antioxidant tests. Also, ovarian tissue was sampled for histological studies. In animals treated with nicotine, there was an increase in follicular atresia, tissue damage, an increase in malondialdehyde and nitric oxide, along with a decrease in the number of ovarian follicles, a decrease in the amount of estrogen and follicle stimulating hormones, and the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase. But in animals receiving nicotine and coenzyme Q_{10} at the same time, there was a significant improvement in ovarian function and structure. This study shows coenzyme Q_{10} can play a protective role against oxidative stress and tissue changes caused by nicotine in the ovaries of rats with the mechanism of balancing the antioxidant status and reproductive hormones.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Oxidative stress, Coenzyme Q_{10} supplement, Nicotine, Ovary, Rat.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1978256.1393

اثرحفاظتی مکمل کوآنزیم Q_{10} بر استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی ناشی از نیکوتین در تخمدان موش‌های صحرایی

شهناز یوسفی‌زاده[۱*]، علی لویی‌منفرد[۲]، یحیی محمدی[۳]

۱- استادیار گروه علوم آزمایشگاهی و درمانگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲- دانشیار گروه بافت‌شناسی و میکروب‌شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام،ایلام، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: sh.yousefizadeh@ilam.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۳/۲۱)

چکیده

نیکوتین به‌عنوان یک سم، اثرات غیرقابل جبرانی بر بافت‌های مختلف بدن از جمله دستگاه تناسلی به جای می‌گذارد. کوآنزیم Q_{10} تاثیر شگرفی در بالابردن سطح آنتی‌اکسیدانی بدن و ممانعت از مسمومیت‌ها دارد. در مطالعه حاضر اثر محافظتی مکمل کوآنزیم Q_{10} بر تغییرات ناشی از نیکوتین در تخمدان موش صحرایی بررسی شد. بدین منظور، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار، به‌صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. موش‌های گروه اول (شاهد) فقط با جیره غذایی معمول تغذیه شدند، اما حیوانات گروه دوم با استفاده از نیکوتین به میزان ۰/۲ mg/kg، موش‌های گروه سوم با استفاده از کوآنزیم Q_{10} به میزان ۷۵ mg/kg و حیوانات گروه چهارم، همزمان با استفاده از نیکوتین و کوانزیم Q_{10} (با همان مقادیر) از طریق گاواژ، تیمار شدند. در پایان دوره مطالعه (۴۵ روز)، حیوانات آسان‌کشی شده و نمونه خون برای بررسی‌های هورمونی و عوامل آنتی‌اکسیدانی اخذ شد. همچنین از بافت تخمدان برای مطالعات بافت‌شناسی نمونه‌گیری انجام شد. در حیوانات تیمارشده با نیکوتین افزایش آترزی فولیکولی، آسیب‌های بافتی، افزایش مالون‌دی‌آلدئید و نیتریک اکساید همراه با کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدانی، کاهش میزان هورمون‌های استروژن و محرک فولیکول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپرکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پرکسیداز و کاتالاز مشاهده شد. اما در حیوانات دریافت‌کننده هم‌زمان نیکوتین و کوانزیم Q_{10}، بهبودی قابل توجهی در عملکرد و ساختار تخمدان رخ داد. این مطالعه نشان می دهد که کوآنزیم Q_{10} با مکانیسم ایجاد توازن در وضعیت آنتی‌اکسیدانی و میزان هورمون‌های تولیدمثلی می‌تواند در برابر استرس اکسیداتیو و تغییرات بافتی ناشی از نیکوتین در تخمدان موش‌ها نقش محافظتی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: استرس اکسیداتیو، مکمل کوآنزیم Q_{10}، نیکوتین، تخمدان، موش صحرایی.

مقدمه

نیکوتین ($C_{10}H_{14}N_2$)، به‌عنوان کلیدی‌ترین عامل سمی موجود در سیگار، مسئول اصلی صدمات ساختاری ناشی از مصرف سیگار می‌باشد (Bruin *et al.*, 2010). این ماده آثار مضر متعددی بر دستگاه تولید مثل در جنس نر و ماده به جا می‌گذارد (Kharrazi *et al.*, 2004). به علاوه، استعمال دخانیات خطر بروز مشکلات مرتبط با ناباروری را افزایش می دهد(Chenge *et al.*, 2018). همچنین اثرات مضر نیکوتین بر جنین نر و ماده حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (Mohammadghasemi *et al.*, 2021).

یکی از مشکلات جوامع امروزی ناباروری با منشأ اختلالات تخمدانی است که محققین برای یافتن راهکارهای درمانی برای برطرف کردن آن تلاش می‌کنند (Vander Borght and Wyns, 2018; Saha *et al.*, 2021). در پژوهشی گزارش شده است که تجویز ترکیبات موجود در تنباکو به ویژه نیکوتین از طریق افزایش القای استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی منجر به سرطان می شود (Valavanidis *et al.*, 2009). از طرف دیگر، مشخص شده که تجویز نیکوتین موجب بروز اختلالات باروری در هر دو جنس نر و ماده می‌شود (Mohammadghasemi and Jahromi, 2018; Faghani *et al.*, 2022). همچنین گزارش شده که قرار گرفتن جنین و نوزاد موش‌های صحرایی در معرض نیکوتین، احتمالاً از طریق ایجاد فشار موضعی سلولی بر روی مجموعه فولیکول‌های آغازین، باعث اختلال در عملکرد تخمدان و میزان باروری می‌شود (Holloway *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2018). به علاوه، عقیده بر این است که نیکوتین از طریق القاء آپوپتوز ناشی از تشکیل گونه‌ای فعال اکسیژن و آسیب به DNA فولیکول‌های تخمدانی، رشد سلول‌های زایا در تخمدان‌های جنین انسان در شرایط آزمایشگاهی را مختل می‌کند (Cheng *et al.*, 2018). همچنین در مطالعات قبلی به تاثیر منفی نیکوتین بر روی کاهش تعداد فولیکول‌ها و اجسام زرد تخمدانی و کاهش میزان استروژن اشاره گردیده‌است (Mohammadghasemi *et al.*, 2012). از طرف دیگر، اثرات سمی نیکوتین بر ساختار سلولی تخمدان در موش صحرایی و تاثیر حفاظتی گیاه صبر زرد بر آن اثبات شده است (Shahin *et al.*, 2022).

سلول های بدن در شرایط فیزیولوژیک دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی برای مقابله با آسیب های مختلف سلولی به ویژه رادیکال های آزاد می باشند (Halliwell, 2012). در بدن پستانداران رادیکال‌های آزاد در مقادیر اندک و به‌طور مستمر تولید می‌شوند، اما بالا رفتن حجم بافتی آنها، موجب بروز صدمات سلولی و عملکردی اندام ها می‌شود (Reuter *et al.*, 2010; Hallivell, 2012). در واقع رخداد استرس اکسیداتیو به معنی عدم توازن در میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی موجود در بافت های بدن است.لذا اندازه‌گیری بیومارکرهای استرس اکسیداتیو، در ارزیابی وضعیت بیماری و اثرات تقویت‌کننده آنتی‌اکسیدان‌ها بر سلامت، مفید هستند (Weydert and Cullen, 2010).

کوآنزیم Q_{10} (Q_{10} -Co) با فرمول شیمیایی ۳،۲- دی متوکسی۵- متیل۶- مولتی پرنیل۱-۱،۴- بنزوکینون (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-multiprenyl-1,4-benzoquinone)، یک آنتی‌اکسیدان

درون‌زا و محلول در چربی است که در غشاء اندامک‌های مختلف داخل سلولی به‌ویژه میتوکندری‌ها یافت می‌شود (Overvad *et al*., 1999; Heaton *et al*., 2020). از طرف دیگر گزارش‌هائی در مورد پتانسیل بالقوه این کوآنزیم برای جبران سمیت ایجادشده در سیستم تولیدمثلی، به دلیل قرار گرفتن در معرض بعضی از عوامل آسیب‌رسان خارجی ارائه شده‌است (Overvad *et al*., 1999; Quinzii *et al*., 2007). همچنین اثر محافظتی کوآنزیم Q_{10} بر آسیب اکسیداتیو تخمدان و رحم ناشی از متوتروکسات در موش صحرایی گزارش شده‌است (Kiremitli *et al*., 2021). از طرفی به کارآمدی کوآنزیم مذکور در درمان برخی از بیماری‌های مزمن قلبی و کلیوی (Gutierrez-Mariscal *et al*., 2020; Zhao *et al*., 2022)، ناباروری جنس نر (Hornos Carneiro *et al*., 2020) و ماده (Ozcan *et al*., 2016; Xu *et al*., 2018; Florou *et al*., 2020) اشاره شده است. همچنین تجویز کوآنزیم Q_{10} به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به مدت ۱۴روز از طریق جلوگیری از وقوع استرس اکسیداتیو توانسته است تخمدان را در برابر صدمات ناشی از تجویز سیس‌پلاتین محافظت کند (Ozcan *et al*., 2015).

با توجه به موارد فوق، اثرات آنتی اکسیدانی Q_{10} اثبات شده است، اما مطالعه مدون و جامعی بر روی اثرات محافظتی آن در بافت تخمدان و پیشگیری از آسیب ناشی از نیکوتین صورت نگرفته است. لذا این مطالعه برای بررسی اثرات حفاظتی Q_{10} در برابر آسیب ناشی از نیکوتین در بافت تخمدان موش صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در محل دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام به صورت مطالعه تجربی تصادفی کنترل‌شده (randomized-controlled experimental study) انجام شد. روش انجام مطالعه توسط کمیته اخلاق پژوهش و مراعات حقوق حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه ایلام تایید شد (کد اخلاق: IR.ILAM.REC.1401.009).

به منظور انجام این مطالعه، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم از محل تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ایلام خریداری شده و به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. برای سازگاری با شرایط محیطی جدید، موش‌ها به مدت یک هفته بدون هرگونه تیماری نگه‌داری شدند. همچنین برای تعیین مرحله سیکل استروس حیوانات، از هر موش به طور جداگانه نمونه‌های اسمیر واژن بر روی لام تمیز تهیه شد و با میکروسکوپ نوری (cx33، المپوس، آلمان) با بزرگنمایی‌های ۱۰ و۴۰ بررسی شدند. در این حال سه نوع سلول شناسایی شد. اول سلول‌های اپیتلیال گرد و هسته‌دار، دوم سلول‌های شاخی نامنظم بدون هسته و سوم سلول‌های گرد کوچک که لوکوسیت بودند. از نسبت این سلول‌ها به یکدیگر، برای تعیین مراحل چرخه فحلی استفاده شد (Marcondes *et al*., 2002). در طی دوره مطالعه (۴۵ روز) موش‌های گروه اول به عنوان شاهد، فقط با جیره غذایی معمول تغذیه شدند، اما حیوانات گروه دوم با نیکوتین به میزان ۰/۲ mg/kg، موش‌های گروه سوم با کوآنزیم Q_{10} به میزان ۷۵ mg/kg و حیوانات گروه چهارم، همزمان با

نیکوتین و کوانزیم Q_{10} (با مقادیر استفاده‌شده در گروه‌های دوم و سوم) تیمار شدند. روش تیمار حیوانات گاواژ با لوله معدی شماره ۴ و حجم محلول تلقیحی به میزان ۱ میلی‌لیتر بود. غلظت نیکوتین و کوآنزیم Q_{10} مورد استفاده نیز بر پایه مطالعات پیشین انجام‌شده بر روی انسان و حیوانات آزمایشگاهی انتخاب گردید (Holloway *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2018; Gutierrez-Mariscal *et al.*, 2020; Darabi *et al.*, 2022). نیکوتین مورد استفاده به‌صورت محلول با درجه خلوص ۹۹ درصد (شرکت مرک، آلمان) و مکمل کوانزیم Q_{10} به صورت قرص ۳۰ میلی‌گرمی (شرکت درمان یاب دارو، تهران، ایران)، تهیه شد. همچنین قبل از تجویز به حیوانات، نیکوتین در pH=۷/۴ در محلول سالین نرمال رقیق شد (Faghani *et al.*, 2022).

در پایان دوره آزمایشات، حیوانات با تزریق داخل عضلانی همزمان کتامین (روتکس مدیا، آلمان) (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین(کلا، بلژیک) (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آسان‌کشی شدند (Ozlem *et al.*, 2022) و نمونه خون از طریق قلب، اخذ شد (Karami *et al.*, 2022). نمونه‌های خون به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (طیف آزما طب، ایران) شدند و سرم جداشده برای بررسی‌های هورمونی و عوامل آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت سرمی هورمون‌های استروژن (E_2)، محرک فولیکول (FSH) و لوتئینی‌کننده (LH)، با کیت الایزا (Monobind, Lake Forest, CA, USA) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، کاتالاز(CAT) (Mohammadghasemi *et al.*, 2021)، گلوتاتیون پراکسیداز(GPx) (Karami *et al.*, 2022) و نیتریک اکساید (NO) (Ozlem *et al.*, 2022) در بافت تخمدان، با استفاده از کیت الایزای مخصوص موش (ZellBio، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

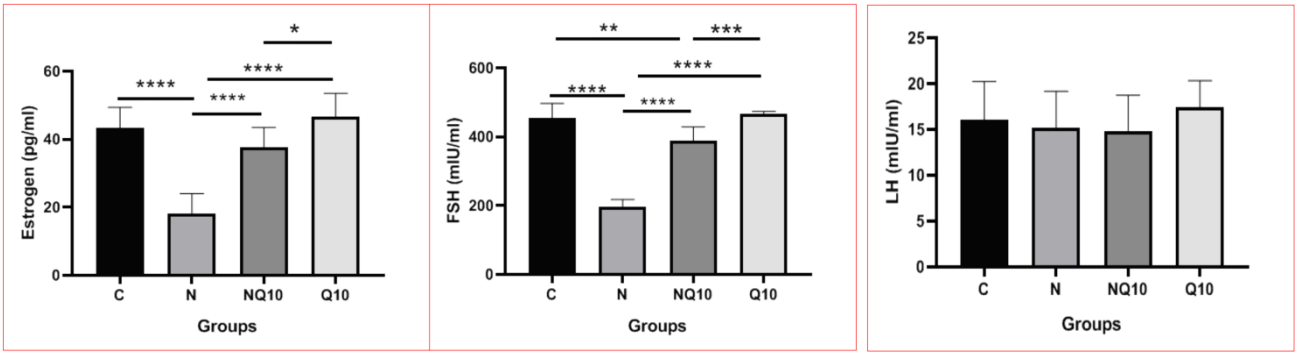
به منظور انجام مطالعه تغییرات بافتی، پس از بازکردن حفره شکم، تخمدان سمت راست جدا گردید و جهت ثبوت در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد (قطران‌شیمی تجهیز، ایران) قرار داده‌شد. یک روز بعد محلول فرمالین تعویض شد و نمونه‌ها در محلول جدید فرمالین قرار داده شدند. در آزمایشگاه بافت‌شناسی، مراحل متداول تهیه مقاطع بافت‌شناسی از جمله آب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف اتانول (پارس، ایران)، شفاف‌سازی آن‌ها با گزیلول (قطران شیمی تجهیز، ایران) وآغشتگی با پارافین (قطران شیمی تجهیز، ایران) و با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون (مدل DS2080/H) انجام شد. پس از قالب‌گیری با پارافین، با استفاده از میکروتوم (پاوندآب، ایران) از هر نمونه برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید، سپس رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین (مرک، آلمان) انجام شد. در همه گروه‌های مورد مطالعه، آسیب‌های بافت تخمدان بر اساس روش پیشنهادشده توسط محققین قبلی، مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفت، بر این اساس ابتدا آسیب‌های بافتی اعم از خونریزی، پرخونی، ارتشاح لوکوسیتی و دژنرسانس فولیکول‌های تخمدانی تعیین شد و سپس بر اساس شدت آسیب‌های بافتی، از ۰ تا ۳ درجه‌بندی صورت گرفت: ۰) بیانگر فقدان هرگونه آسیب‌های بافتی؛ ۱)

بیانگر وجود آسیب‌های بافتی به میزان کمتر از ۳۳ درصد؛ ۲) به معنی وجود آسیب‌های بافتی بین ۳۳ تا ۶۶ درصد و ۳: بیانگر وجود آسیب‌های بافتی به میزان بیشتر از۶۶ درصد (Ozlem *et al.*, 2022). همچنین تعداد فولیکول‌های تخمدانی اعم از نرمال و آترتیک و تعداد جسم زرد مورد شمارش قرار گرفت (Mohammadghasemi *et al.*, 2012).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: برای آنالیز آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS16.0 (شرکت IBM، آمریکا) استفاده شد. برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها (میانگین± انحراف معیار) از آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) و به دنبال آن از تست تکمیلی دانکن استفاده شد و مقادیر (p<۰/۰۵) به عنوان سطح آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

-**نتایج تغییرات هورمونی**: میزان سرمی هورمون‌های استروژن و تحریک‌کننده فولیکول (FSH) در حیوانات گروه نیکوتین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۰۰۱). همچنین از نظر مقادیر سرمی هورمون های استروژن و تحریک‌کننده فولیکول، بین حیوانات تیمارشده با کوآنزیم Q_{10} و گروه شاهد، اختلاف آماری معنی‌دار دیده نشد، هر چند که میزان این هورمون‌ها در حیوانات تیمارشده با کوآنزیم Q_{10} بالاتر از گروه شاهد بود. همچنین در حیوانات تیمارشده با نیکوتین + کوآنزیم Q_{10}، میزان سرمی هورمون‌های استروژن و FSH مشابه حیوانات گروه شاهد بود، اما نسبت به گروه تیمارشده با نیکوتین، افزایش معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۰۰۱). لازم به ذکر است که مقادیر سرمی هورمون LH در بین گروه‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌دار نشان نداد (نمودار ۱).

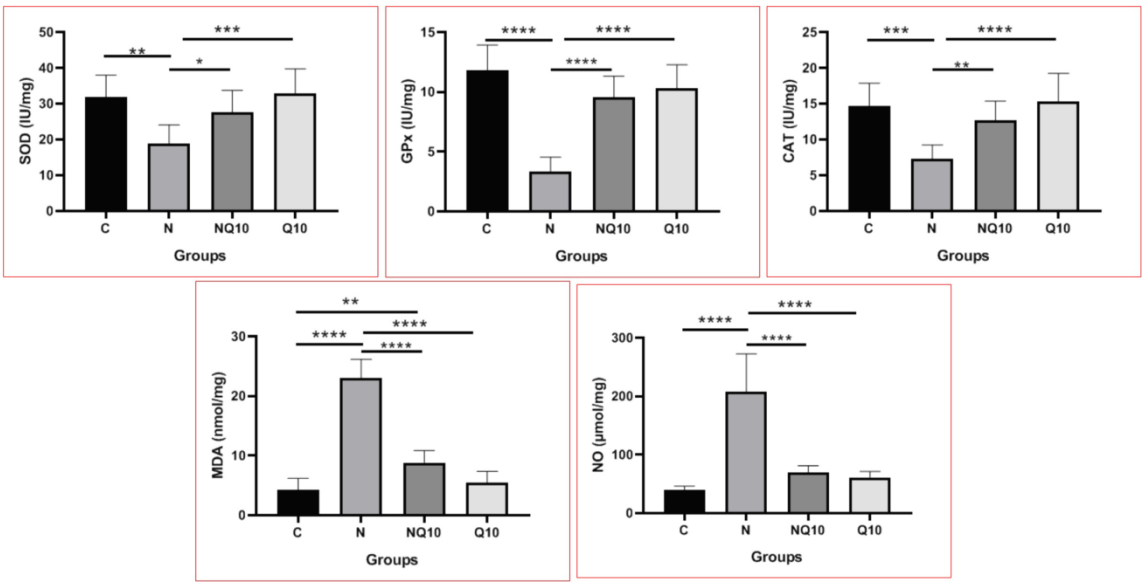


نمودار ۱- اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر میانگین± انحراف معیار تغییرات هورمونی مرتبط با تخمدان.

*میانگین‌های دارای اختلاف آماری معنی‌داری در حد p<۰/۰۵ ** میانگین‌های دارای اختلاف آماری معنی‌داری در حد p<۰/۰۱ *** میانگین‌های دارای اختلاف آماری معنی‌داری در حد p<۰/۰۰۱ **** میانگین‌های دارای اختلاف آماری معنی‌داری در حد p<۰/۰۰۰۱

-**نتایج شاخص‌های استرس اکسیداتیو**: میزان SOD، GPxو CAT در بافت تخمدان حیوانات تیمارشده با نیکوتین به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های کنترل (p<۰/۰۱)، تیمارشده با کوانزیم Q_{10} (p<۰/۰۰۱) و نیز

تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} ($p<۰/۰۰۱$) بود. اما از نظر میزان فاکتورهای فوق، بین حیوانات گروه‌های شاهد، تیمارشده با کوآنزیم Q_{10} و تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد (نمودار۲). همچنین در بافت تخمدان موش های تیمارشده با نیکوتین، مقادیر MDA به‌طور معنی‌داری بالاتر از بقیه گروه‌های مورد آزمایش بود. همچنین در گروه تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} مقادیر MDA در بافت تخمدان به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های کنترل و کوآنزیم Q_{10} بود ($p<۰/۰۰۱$)، اما بین گروه‌های کنترل و تیمار با کوآنزیم Q_{10} اختلاف آماری معنی‌داری ملاحظه نشد. از طرف دیگر میزان NO در بافت تخمدان حیوانات تیمارشده با نیکوتین به‌طور معنی‌داری بالاتر از بقیه گروه‌ها بود. همچنین مقادیر بافتی NO در گروه‌های تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} و تیمارشده فقط با کوآنزیم Q_{10}، نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). اما بین گروه‌های تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} و تیمارشده با کوآنزیم Q_{10}، اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد (نمودار ۲).

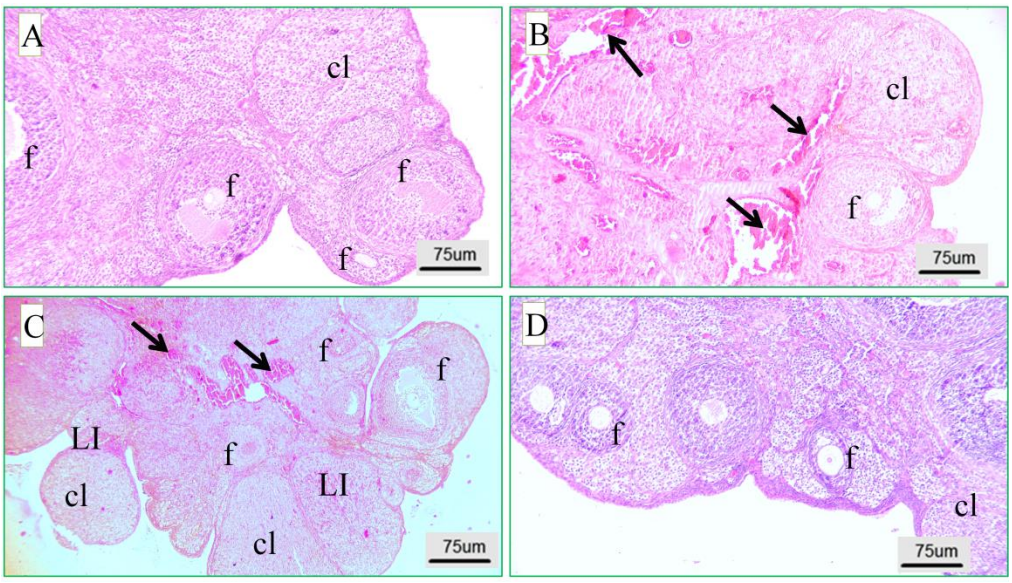


نمودار۲- اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر میانگین± انحراف معیار تغییرات عوامل استرس اکسیداتیو تخمدان.

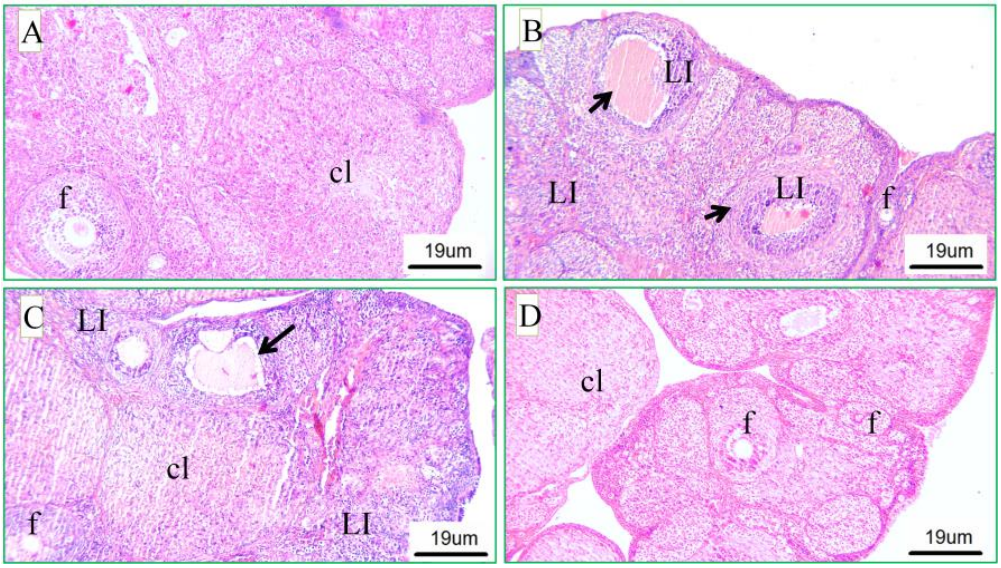
*میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۵$ ** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۱$ *** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۰۱$ **** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۰۰۱$

- **مشاهدات میکروسکوپی بافت تخمدان:** در نمونه‌های مربوط به گروه شاهد، ساختار میکروسکوپی تخمدان کاملاً طبیعی بود و در قشر تخمدان، فولیکول‌های مختلف اعم از آغازین، اولیه، ثانویه و گراف و همچنین جسم زرد به صورت نرمال مشاهده شد. اما تعداد فولیکول‌های مذکور در بافت تخمدان موش‌های گروه شاهد، به طور معنی‌دار بالاتر از تعداد آن در بافت تخمدان حیوانات گروه‌های تیمارشده با نیکوتین و تیمارشده با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} بود (شکل A،۱) ($p<۰/۰۵$). همچنین تعداد فولیکول‌های آترتیک در گروه مذکور، به‌طور معنی‌دار پایین‌تر از گروه‌های تیمارشده با نیکوتین و یا نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} بود

(شکل A،۲) ($p<۰/۰۵$)، (جدول ۱ و نمودار ۳). همچنین در گروه تیمارشده با نیکوتین، پرخونی و خونریزی شدید پارانشیم، ارتشاح لوکوسیتی، کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدانی شامل آغازین، ثانویه و گراف همراه با افزایش معنی‌دار فولیکول‌های آترتیک مشاهده‌شد (شکل B،۱) ($p<۰/۰۵$)، با این وجود در نمونه‌های گروه مذکور، تعداد جسم زرد نسبت به بقیه گروه‌ها، اختلاف آماری معنی‌دار نشان نداد (شکل B،۲) (جدول ۱ و نمودار ۳). از طرف دیگر در حیوانات گروه دریافت‌کننده همزمان نیکوتین و کوآنزیم Q_{10}، پرخونی جزئی و کانونی در پارانشیم تخمدان همراه با افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه تیمارشده با نیکوتین مشاهده شد (شکل C،۱) ($p<۰/۰۵$). همچنین در نمونه‌های بافتی گروه مذکور، از نظر تعداد فولیکول‌های آترتیک در مقایسه با موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین، کاهش معنی‌دار مشاهده شد (شکل C،۲) (جدول ۱ و نمودار ۳) ($p<۰/۰۰۱$). در گروه مکمل کوآنزیم Q_{10} وضعیت ساختار بافت‌شناسی و هیستومتریک پارانشیم تخمدان مشابه گروه کنترل بود (شکل D،۱)، هر چند تعداد فولیکول‌های اولیه، ثانویه و اجسام زرد در گروه مذکور بیشتر از تعداد آن در نمونه‌های گروه شاهد بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل D،۲) (جدول ۱ و نمودار ۳).



شکل ۱- اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر ساختار میکروسکوپی تخمدان گروه‌های مختلف: A) ساختار طبیعی فولیکول‌ها (f) و جسم زرد تخمدانی (cl) در نمونه‌های گروه شاهد مشاهده می‌شود. B) افزایش مشخص پرخونی در پارانشیم تخمدانی (فلش سیاه رنگ) و کاهش تعداد فولیکول‌ها و اجسام زرد در نمونه‌های گروه تیمارشده با نیکوتین مشاهده می‌شود. C): بهبودی نسبی در وسعت پرخونی (فلش سیاه رنگ) و افزایش تعداد فولیکول‌ها و اجسام زرد تخمدانی و وجود کانون‌های ارتشاح لوکوسیتی (LI) در نمونه‌های گروه تیمارشده با نیکوتین+مکمل کوآنزیمQ_{10} مشاهده می‌شود. D) در گروه تیمارشده با مکمل کوانزیم Q_{10}، ساختار طبیعی فولیکول‌ها (f) و اجسام زرد تخمدانی (cl) همراه با افزایش تعداد آن‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

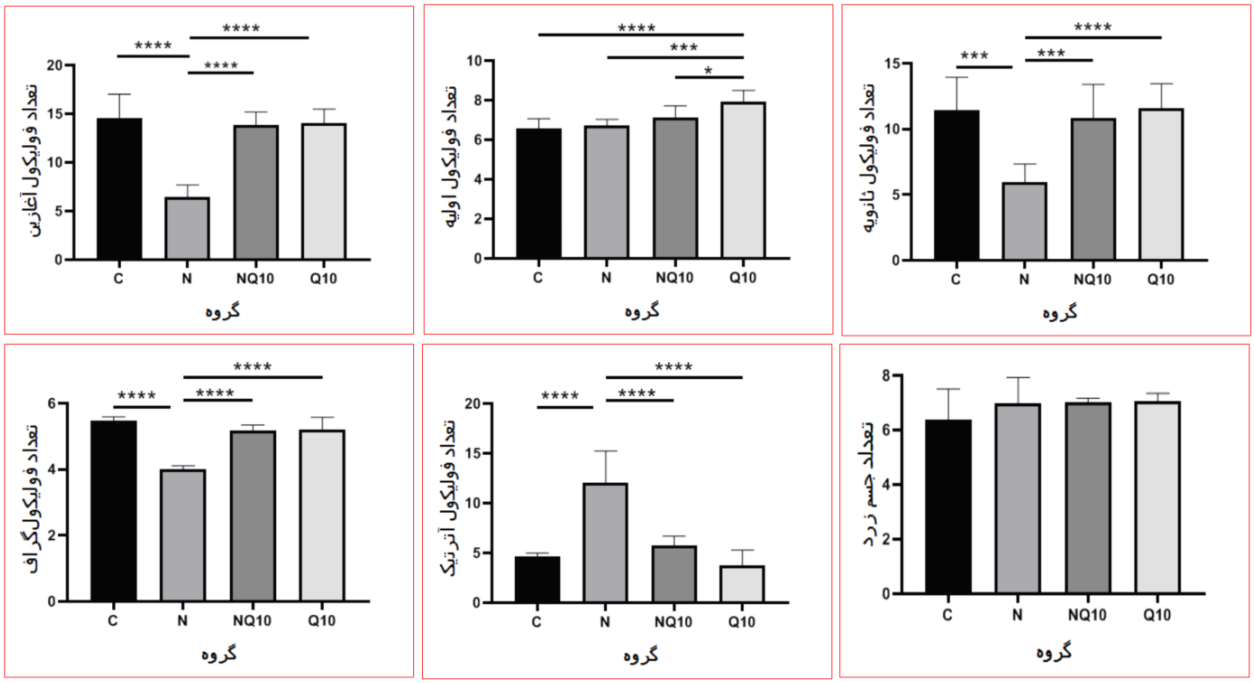


شکل۲- اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر ساختار میکروسکوپی تخمدان گروه‌های مختلف: A) ساختار طبیعی فولیکول‌ها (f) و اجسام زرد تخمدانی (cl) و عدم وجود فولیکول آترتیک در نمونه‌های گروه شاهد مشاهده می‌شود. B) افزایش کانون‌های ارتشاح لوکوسیتی (LI) و افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک (فلش سیاه رنگ) در نمونه‌های گروه تیمارشده با نیکوتین مشاهده می‌گردد. C) بهبودی نسبی در وسعت پرخونی، کاهش کانون‌های ارتشاح لوکوسیتی (LI) و کاهش دژنرسانس فولیکولی (فلش سیاه رنگ) در گروه تیمارشده با نیکوتین+مکمل‌کوآنزیم Q_{10}مشاهده می‌گردد. D) ساختار طبیعی فولیکول‌ها (f) و اجسام زرد تخمدانی (cl) و فقدان فولیکول آترتیک در نمونه‌های گروه تیمارشده با مکمل کوآنزیمQ_{10} مشاهده می‌شود. (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین).

جدول ۱- ارزیابی اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر میانگین± انحراف معیار تغییرات بافتی در تخمدان گروه‌های مختلف

گروه مورد آزمایش	خونریزی در پارانشیم تخمدان	پرخونی عروقی در پارانشیم تخمدان	ارتشاح لوکوسیتی	دژنرسانس فولیکولی
شاهد	۰	۰	۰	۰/۰±۳۰/۰۸^{c}
تیمار با نیکوتین	۳/۰±۰/۱^{a}	۲/۰±۶/۲^{a}	۲/۰±۵/۳^{a}	۳/۰±۰/۴^{a}
تیمار با نیکوتین + کوآنزیمQ_{10}	۱/۰±۹۰/۲^{b}	۰/۰±۹۰/۲^{b}	۱/۰±۱۰/۳^{b}	۲/۰±۱۰/۱^{b}
کوآنزیم Q_{10}	۰	۰	۰	۰/۰±۲۰/۰۱ ^{c}
p-value	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵

*حروف غیریکسان در هر ردیف، نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می باشد (p<۰/۰۵).



نمودار ۳- ارزیابی اثر مکمل کوآنزیم Q_{10} و نیکوتین بر میانگین± انحراف معیار تعداد فولیکول‌ها و اجسام زرد تخمدان موش‌های گروه‌های مورد آزمایش.
*میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۵$ ** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۱$ *** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۰۱$ **** میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۰۰۱$

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نتایج سنجش فاکتورهای مختلف بیوشیمیایی، هورمونی و بافت شناسی نشان داد که نیکوتین به میزان ۰/۲ mg/kg موجب بروز اختلالات متعدد تولیدمثلی در تخمدان موش‌های صحرایی می‌شود (نمودارهای ۱ تا ۳) (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین تجویز مکمل کوآنزیم Q_{10} به میزان ۷۵ mg/kg توانست بهبودی قابل قبولی در عملکرد و ساختار تخمدان در حیوانات مسموم‌شده با نیکوتین به‌وجود آورد(جدول ۱، نمودار ۳) . به علاوه با توجه به نتایج مطالعه حاضر، مشخص گردید که میزان سرمی هورمون‌های استروژن و تحریک‌کننده فولیکول (FSH) در حیوانات تیمار شده با نیکوتین نسبت به حیوانات گروه شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد، اما میزان سرمی هورمون لوتئینی‌کننده (LH) تحت تاثیر قرار نگرفت(نمودار۱) و این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین که نشان داده بود استعمال نیکوتین منجر به کاهش هورمون تحریک‌کننده فولیکولی و عدم تاثیر بر سطح هورمون لوتئینی‌کننده می شود، مطابقت دارد (Moshtaghi-Kashanian *et al*., 2005). در این راستا فغانی و همکاران در سال ۲۰۲۲، کاهش مقادیر سرمی هورمون‌های استروژن، FSH و LH در موش سوری را متعاقب تجویز نیکوتین به میزان ۰/۶ mg/kg گزارش کرده‌اند (Faghani *et al*., 2022) که کاهش مقادیر

استروژن و FSH با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (نمودار ۱) و عدم تشابه نتایج مربوط به میزان سرمی LH ممکن است به دلیل تفاوت در گونه، سن حیوان، غلظت نیکوتین، مدت زمان تیمار، روش تجویز و نوع مطالعات (*in vivo* یا *in vitro*) در دو مطالعه مذکور باشد. همچنین نشان داده شده‌است که در زنان سیگاری میزان استروژن در ادرار کمتر از زنان غیرسیگاری است (MacMahon *et al*., 1982). استروژن یک هورمون کلیدی در رشد و فیزیولوژی طبیعی دستگاه تناسلی جنس ماده است و سلول‌های گرانولوزا و تک داخلی به دنبال تحریک توسط FSH، استرادیول را در فولیکول های قبل از تخمک‌گذاری، سنتز می‌کنند (Emmen *et al*., 2005). لذا دلیل اصلی اختلال در مقادیر هورمون‌های تولیدمثلی جنس ماده از جمله استروژن، FSH و LH، متعاقب تیمار با نیکوتین، ناشی از اثرات منفی آن بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان و در نتیجه اختلال در فولیکولوژنز و استروئیدوژنز می‌باشد (Dechanet *et al*., 2011; Mohammadghasemi *et al*., 2021). همچنین یکی از یافته‌های مهم مطالعه حاضر، تاثیر حفاظتی و تنظیم‌گرانه مکمل کوآنزیم Q_{10} بر پروفایل هورمون‌های تولیدمثلی بود، به‌طوری که در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان مکمل مذکور و نیکوتین، تغییرات مربوط به هورمون‌های استروژن و FSH تقریباً مشابه گروه کنترل بود (نمودار ۱).در مطابقت با این یافته، مطالعات پیشین هم اثرات مفید کوآنزیم Q_{10} بر مقادیر سرمی هورمون‌های تناسلی ماده در بیماران مبتلا به سندرم تحریک بیش از حد تخمدان و سندرم تخمدان پلی‌کیستی، گزارش کرده و تاثیر مثبت کوآنزیم Q_{10} را به مکانیسم‌هایی مانند مهار بیان ژن‌های خاص و ممانعت از رگ‌زایی نسبت داده‌اند (Zhang *et al*., 2022; Darabi *et al*., 2022). از طرف دیگر، دلیل عمده بروز اختلالات هورمونی مرتبط با تخمدان، القای استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف نیکوتین است (Mohammadghasemi *et al*., 2021) که نتایج آزمایشات بیوشیمیایی تحقیق حاضر اعم از کاهش میزان بافتی SOD، GPx و CAT و افزایش معنی‌دار مقادیر MDA و NO در موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین، نشان‌دهنده وقوع استرس سلولی در بافت تخمدان می‌باشد (نمودار ۲). در این راستا محققین قبلی افزایش وقوع استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در تخمدان موش در محیط آزمایشگاهی (*in vitro*) متعاقب تجویز نیکوتین گزارش کرده‌اند (Cheng *et al*., 2018). همچنین افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و بالارفتن میزان فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو به ویژه MDA در بافت بیضه موش متعاقب تیمار با نیکوتین گزارش شده‌است (Mohammadghasemi *et al*., 2021). از نتایج مهم مطالعه حاضر، تاثیر تیمار با مکمل کوآنزیم Q_{10} بر روی مولفه‌های مربوط به استرس سلولی مبنی بر افزایش میزان بافتی SOD، GPx وCAT و کاهش معنی‌دار مقادیر MDA و NO در گروه تیمار با نیکوتین+ کوآنزیم Q_{10} بود (نمودار ۲). در تطابق با این نتایج، مطالعات قبلی هم یافته‌های مشابهی را مشتمل بر اثر آنتی‌اکسیدانی این مکمل بر آسیب اکسیداتیو تخمدان و رحم ناشی از متوترکسات در موش صحرایی گزارش کرده‌اند (Ozcan *et al*., 2016; Kiremitli *et al*., 2021). لذا یافته‌های مذکور، بیانگر اثر آنتی‌اکسیدانی این مکمل در برابر تغییرات تخمدانی ناشی از نیکوتین است.

از طرف دیگر، در تایید یافته‌های بیوشیمیایی و هورمونی، نتایج میکروسکوپی مطالعه حاضر نیز مبین ایجاد اختلالات ساختاری گسترده در بافت تخمدان در حیوانات دریافت‌کننده نیکوتین بود که این تغییرات عمدتاً به صورت پرخونی و خونریزی شدید پارانشیم، ارتشاح لوکوسیتی، کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدانی شامل آغازین، ثانویه و گراف همراه با افزایش معنی‌دار فولیکول‌های آترتیک مشاهده‌شد (شکل‌های ۱ و ۲). در این زمینه محققین قبلی به تاثیر سوء نیکوتین بر کاهش تعداد فولیکول‌های سالم تخمدانی و افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک اشاره کرده‌اند (Mohammadghasemi *et al*., 2012; Kole *et al*., 2020; Faghani *et al*., 2022; Shahin *et al*., 2022). همچنین در طی مطالعه‌ای، تیمار نیکوتین، با القاء استرس سلولی در تخمدان، موجب اختلال در روند فولیکولوژنز اولیه در موش سوری شده‌است (Wang *et al*., 2018). کاهش تعداد فولیکول‌های نرمال و افزایش فولیکول های آترتیک ممکن است به دلیل اختلالات هورمونی،درگیری محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان و افزایش مقادیر رادیکال های آزاد باشد.نیکوتین با مکانیسم اووتوکسیسیتی می تواند منجر به مشکلات باروری در جنس ماده شود (Faghani *et al*., 2022). در این مورد گزارش کرده‌اند که پیش درمانی با کوآنزیم Q_{10} در زنان جوان دارای مشکلات تخمدانی، پاسخ تخمدان و کیفیت جنین و باروری را بهبود می‌بخشد (Xu *et al*., 2018; Florou *et al*., 2020). همچنین در این زمینه استفاده از مکمل کوآنزیم Q_{10} برای برطرف شدن صدمات بافتی تخمدان و رحم از جمله پرخونی و التهاب ناشی از متوترکسات ذکر شده‌است (Kiremitli *et al*., 2021)، زیرا کوآنزیم Q_{10} در بلوغ نرمال، لقاح اووسیت و سنتز هورمون‌های تناسلی ایفای نقش می‌کند (Bentov *et al*., 2011). از طرف دیگر گزارش شده که افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و وقوع استرس سلولی می‌تواند منجر به ناکارآمدی میتوکندری‌های سلولی در تامین انرژی و بروز صدمات بافتی شود و از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله کوآنزیم Q_{10} به‌عنوان برطرف‌کننده تخریبات میتوکندریایی نام برده شده‌است (Bentov *et al*., 2010). بنابراین با توجه به نقش قطعی کوآنزیم Q_{10} در تامین انرژی سلولی، ممکن است مکانیسم بهبودگرانه این کوآنزیم، تنظیم متابولیسم انرژی به ویژه تسهیل انتقال الکترون‌ها به زنجیره فسفریلاسیون اکسیداتیو و تولید ATP در سلول‌های بافت تخمدان باشد (Ozcan *et al*., 2016).

همچنین استروژن یک هورمون محرک برای تکثیر سلول‌های گرانولوزا بوده و برای رشد فولیکول‌های تخمدانی ضروری و مهم است (Emmen *et al*., 2005). بنابراین در مطالعه حاضر از دلایل افزایش تعداد فولیکول‌های غیرطبیعی و کاهش فولیکول‌های نرمال در گروه دریافت‌کننده نیکوتین، ممکن است نارسایی تخمدان در سنتز و ترشح مقادیر کافی استروژن باشد (نمودار ۳). به علاوه، کاهش مقادیر استروژن می‌تواند منجر به افزایش مولفه‌های مرتبط با استرس سلولی به ویژه MDA توام با کاهش سطح CAT و SOD گردد (Faghani *et al*., 2022). همچنین، گزارش شده که استنشاق دود سیگار به مدت ۱۲ هفته، اثرات نامطلوبی بر کیفیت تخمک در موش‌ها دارد زیرا ضخامت زونا پلوسیدا را افزایش می‌دهد و تشکیل دوک در مرحله

متافاز II تقسیم اووسیت را تغییر می‌دهد (Jennings *et al.*, 2011). طی استروئیدوژنز تعداد زیادی ROS در جسم زرد تولید می‌شود. با این حال، به طور طبیعی سطوح بالایی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در جسم زرد وجود دارد که از سلول‌های لوتئال در برابر رادیکال‌های اکسیژن تولیدشده در طول استروئیدوژنز محافظت می‌کند (Selvaraju *et al.*, 2010). بنابراین در مطالعه حاضر عدم تاثیرپذیری جسم‌های زرد تخمدان در گروه تیمارشده با نیکوتین (نمودار ۳)، ممکن است بر پایه مکانیسم فوق باشد. همچنین از دلایل عدم تغییر تعداد جسم‌های زرد تخمدانی در گروه نیکوتین می‌تواند عدم تغییر میزان هورمون LH باشد.

به‌طورکلی، در تحقیق حاضر بهبود پارامترهای هورمونی، آنتی‌اکسیدانی و ساختار بافت‌شناسی تخمدان در گروه‌های تحت تیمار همزمان با نیکوتین و کوآنزیم Q_{10} نشان داده شد. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت که کوآنزیم Q_{10} با مکانیسم ایجاد توازن در وضعیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود فعالیت محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد و هورمون‌های تولیدمثلی، می‌تواند در برابر تغییرات تخمدانی ناشی از نیکوتین نقش محافظتی داشته باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه ایلام (IRILU-Vt-000182-22-04) می‌باشد، لذا بدین‌وسیله از زحمات پرسنل معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ایلام تقدیر می‌شود. همچنین از زحمات سرکار خانم دکتر هاجر عزیزیان و جناب آقای دکتر سلمان سلطانی بابت کمک به تهیه اسلایدهای بافتی قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Bentov, Y., Esfandiari, N., Burstein, E. and Casper, R.F. (2010). The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. Fertility and Sterility, 93(1): 272-275.
- Bentov, Y., Yavorska, T., Esfandiari, N., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (2011). The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 28(9): 773-783.
- Bruin, J.E., Gerstein, H.C. and Holloway, A.C. (2010). Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. Toxicolical Sciences, 116(2): 364-374.
- Cheng, S.F., Qin, X.S., Han, Z.L., Sun, X.F., Feng, Y.N., Yang, F., et al. (2018). Nicotine exposure impairs germ cell development in human fetal ovaries cultured in vitro. Aging, (Albany NY),10(7): 1556-1574.

- Darabi, Z., Basir, Z., Tabandeh, M. R. and Ghotbeddin, Z. (2022). Coenzyme Q10 improves ovarian histology and attenuates the expression of angiogenesis-associated proteins in the ovary of rats with experimental hyperstimulation syndrome. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 25(8): 989-996.
- Dechanet, C., Anahory, T., Mathieu Daude, J.C., Quantin, X., Reyftmann, L., Hamamah, S., et al. (2011). Effects of cigarette smoking on reproduction. Human Reproduction Update, 17(1): 76-95.
- Emmen, J.M., Couse, J.F., Elmore, S.A., Yates, M.M., Kissling, G.E. and Korach, K.S. (2005). In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER){alpha} and ER{beta} null mice indicate a role for ER{beta} in follicular maturation. Endocrinology, 146(6): 2817-2826.
- Faghani, M., Saedi, S., Khanaki, K. and Mohammadghasemi, F. (2022). Ginseng alleviates folliculogenesis disorders via induction of cell proliferation and downregulation of apoptotic markers in nicotine-treated mice. Journal of Ovarian Research, 15(1): 14.
- Florou, P., Anagnostis, P., Theocharis, P., Chourdakis, M. and Goulis, D.G. (2020). Does coenzyme Q10 supplementation improve fertility outcomes in women undergoing assisted reproductive technology procedures? A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 37(10): 2377-2387.
- Gutierrez-Mariscal, F.M., Arenas-de Larriva, A.P., Limia-Perez, L., Romero-Cabrera, J.L., Yubero-Serrano, E.M. and López-Miranda, J. (2020). Coenzyme Q10 supplementation for the reduction of oxidative stress: Clinical implications in the treatment of chronic diseases. International Journal of Molecular Sciences, 21(21): 7870.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition Reviews, 70(5): 257-265.
- Heaton, R.A., Heales, S., Rahman, K., Sexton, D.W. and Hargreaves, I. (2020). The effect of cellular coenzyme Q(10) deficiency on lysosomal acidification. Journal of Clinical Medicine, 9(6): 1923.
- Holloway, A.C., Kellenberger, L.D. and Petrik, J.J. (2006). Fetal and neonatal exposure to nicotine disrupts ovarian function and fertility in adult female rats. Endocrinology, 30(2): 213-216.
- Hornos Carneiro, M.F., Shin, N., Karthikraj, R., Barbosa, F.Jr., Kannan, K. and Colaiácovo, M.P. (2020). Antioxidant CoQ10 Restores Fertility by Rescuing Bisphenol A-Induced Oxidative DNA Damage in the Caenorhabditis elegans Germline. Genetics, 214(2): 381-395.
- Jennings, P.C., Merriman, J.A., Beckett, E.L., Hansbro, P.M. and Jones, K.T. (2011). Increased zona pellucida thickness and meiotic spindle disruption in oocytes from cigarette smoking mice. Human Reproduction, 26(4): 878-884.
- Karami, E., Goodarzi, Z., Ghanbari, A., Dehdashti, A., Bandegi, A.R. and Yosefi, S. (2022). Dataset on biochemical markers and histological alterations in rat kidney intoxicated with cadmium chloride and treated with antioxidant. Data in Brief, 43: 1-11.
- Kharrazi, M., DeLorenze, G.N., Kaufman, F.L., Eskenazi, B., Bernert, J.T.Jr, Graham, S., et al. (2004). Environmental tobacco smoke and pregnancy outcome. Epidemiology, 15(6): 660-670.
- Kiremitli, T., Kiremitli, S., Akselim, B., Yilmaz, B., Mammadov, R., Tor, I.H., et al. (2021). Protective effect of Coenzyme Q10 on oxidative ovarian and uterine damage induced by methotrexate in rats. Human & Experimental Toxicology, 40(9): 1537-1544.
- Kole, E., Ozkan, S.O., Eraldemir, C., Akar, F.Y., Ozbek, S.K., Kole, M.C., et al. (2020). Effects of melatonin on ovarian reserve in cigarette smoking: an experimental study. Archives of Medical Science, 16(6): 1376-1386.
- MacMahon, B., Trichopoulos, D., Cole, P. and Brown, J. (1982). Cigarette smoking and urinary estrogens. The New England Journal of Medicine, 307(17): 1062-1065.
- Marcondes, F., Bianchi, F. and Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Brazilian Journal of Biology, 62(4A): 609-614.

- Mohammadghasemi, F., Jahromi, S.K., Hajizadeh, H., Homafar, M.A. and Saadat, N. (2012). The Protective Effects of Exogenous Melatonin on Nicotine-induced Changes in Mouse Ovarian Follicles. Journal of Reproduction and Fertility, 13(3): 143-150.
- Mohammadghasemi, F. and Jahromi, S.K. (2018). Melatonin ameliorates testicular damages induced by nicotine in mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 21(6): 639-644.
- Mohammadghasemi, F., Khanaki, K., Moravati, H. and Faghani, M. (2021). The amelioration of nicotine-induced reproductive impairment in male mouse by Sambucus ebulus L. fruit extract. Anatomy and Cell Biology, 54(2): 232-240.
- Moshtaghi-Kashanian, G.R., Esmaeeli, F. and Dabiri, S. (2005). Enhanced prolactin levels in opium smokers. Addiction Biology, 10(4): 345-349.
- Overvad, K., Diamant, B., Holm, L., Holmer, G., Mortensen, S.A. and Stender, S. (1999). Coenzyme Q10 in health and disease. European Journal of Clinical Nutrition, 53(10): 764-770.
- Ozcan, P., Fıçıcıoğlu, C., Kizilkale, O., Yesiladali, M., Tok, O.E., Ozkan, F., et al. (2016). Can Coenzyme Q10 supplementation protect the ovarian reserve against oxidative damage? Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 33(9): 1223-1230.
- Ozcan, P., Ficicioglu, C. and Yesiladali, M. (2015). The protective effect of Coenzyme Q10 supplementation on decreased ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. Fertility and Sterility Abstract Only, 104(3): E255:437.
- Ozlem, K., Emin, K. and Birkan Y. (2022). Protective effect of edaravone on cisplatin-induced injury in rat ovary. Archives of Gynecology and Obstetrics, 306(5): 1673-1678.
- Quinzii, C.M., Hirano, M. and DiMauro, S. (2007). CoQ10 Deficiency Diseases in Adults. Mitochondrion. 7(Supp): S122-126.
- Rahmani Kahnemoei, J. (2016). The effect of passive inhalation of cigarette smoke on serum fat profile in rats. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 10(3): 245-250. [In Persian]
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M. and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radical Biology and Medicine, 49(11): 1603-1616.
- Selvaraju, S., Raghavendra, B.S., Subramani, T.S., Priyadharsini, R., Reddy, I.J., and Ravindra, J.P. (2010). Changes in luteal cells distribution, apoptotic rate, lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in buffalo (Bubalus bubalis) corpus luteum. Animal Reproduction Science, 120(1-4): 39-46.
- Shahin, A.M., Bahrami, A.M., Delkhosh, A. and Shakarami, N. (2022). Evaluation of the effect of Aloe vera gel on ovarian tissue structure in Nicotine-receiving Rats. Veterinary Clinical Pathology, 15(4): 319-331. [In Persian]
- Sinha-Hikim, I., Friedman, T.C., Falz, M., Chalfant, V., Hasan, M.K., Espinoza-Derout, J., et al. (2017). Nicotine plus a high-fat diet triggers cardiomyocyte apoptosis. Cell and Tissue Research, 368(1): 159-170.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, K. (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. International Journal of Environmental Research and Public Health, 6(2): 445-462.
- Wang, Y.F., Sun, X.F., Han, Z.L., Li, L., Ge, W., Zhao, Y., et al. (2018). Protective effects of melatonin against nicotine-induced disorder of mouse early folliculogenesis. Aging (Albany NY), 10(3): 463-480.
- Weydert, C.J. and Cullen, J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. Nature Protocols, 5(1): 51-66.
- Xu, Y., Nisenblat, V., Lu, C., Li, R., Qiao, J., Zhen, X. and Wang, S. (2018). Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: a randomized controlled trial. Reproductive Biology and Endocrinology, 16(1): 29.

- Zhang, T., He, Q., Xiu, H., Zhang, Z., Liu, Y., Chen, Z. and Hu, H. (2022). Efficacy and Safety of Coenzyme Q10 Supplementation in the Treatment of Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review and Meta-analysis. Reproductive Sciences, 30(4): 1033-1048.
- Zhao, S., Wu, W., Liao, J., Zhang, X., Shen, M., Li, X., Lin, Q. and Cao, C. (2022). Molecular mechanisms underlying the renal protective effects of coenzyme Q10 in acute kidney injury. Cellular & Molecular Biology Letters, 27(1): 57.