



ARTIGO ORIGINAL

Efeito protetor da creatina na ototoxicidade induzida por amicacina[☆]

Emre Apaydın ^{a,*}, Elif Dağlı ^{a,b}, Sevinç Bayrak ^a, Ekrem Said Kankılıç ^a, Hasan Şahin ^b e Aydın Acar ^a

^a Kecioren Training and Research Hospital, Department of Otolaryngology, Ankara, Turquia

^b Guven Private Hospital, Department of Audiology, Ankara, Turquia

Recebido em 16 de junho de 2020; aceito em 8 de setembro de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Amicacina;
Ototoxicidade;
Antioxidantes;
Creatina
mono-hidratada

Resumo

Introdução: Os aminoglicosídeos são amplamente conhecidos por seus efeitos colaterais ototóxicos. No entanto, eles são antibióticos potentes usados no tratamento de doenças potencialmente fatais devido à atual preocupação com a resistência aos antimicrobianos. Nossa hipótese é que os suplementos de creatina, aos quais atribui-se um efeito benéfico sobre o sistema de defesa antioxidante mitocondrial e manutenção da homeostase energética ideal, possam melhorar os efeitos colaterais ototóxicos.

Objetivo: Investigar os efeitos protetores da creatina mono-hidratada contra a ototoxicidade induzida pela amicacina em ratos em um modelo experimental animal com o uso das emissões otoacústicas por produto de distorção e o potencial evocado auditivo de tronco encefálico.

Método: Vinte ratos saudáveis foram divididos em quatro grupos (5 ratos em cada): o grupo controle, o grupo creatina mono-hidratada, o grupo amicacina e o grupo amicacina + creatina mono-hidratada. O grupo creatina mono-hidratada recebeu creatina na dose de 2 g / kg uma vez ao dia por gavagem gástrica por 21 dias. O grupo amicacina recebeu amicacina na dose de 600 mg/kg por injeção intramuscular uma vez ao dia por 21 dias. O grupo amicacina + creatina mono-hidratada recebeu injeções intramusculares de amicacina (600 mg/kg) uma vez ao dia por 21 dias e creatina mono-hidratada (2 g/kg) uma vez ao dia por gavagem gástrica por 21 dias. O grupo controle nada recebeu. As medidas de emissões otoacústicas por produto de distorção e potencial evocado auditivo de tronco encefálico foram feitas em todos os ratos nos dias 0, 7, e 21.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.09.002>

[☆] Como citar este artigo: Apaydın E, Dağlı E, Bayrak S, Kankılıç ES, Şahin H, Acar A. Protective effect of creatine on amikacin-induced ototoxicity. Braz J Otorhinolaryngol. 2022;88:651–6.

* Autor para correspondência.

E-mail: dr.emreapaydin@hotmail.com (E. Apaydın).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

Resultados: Em relação aos valores do potencial evocado auditivo de tronco encefálico, foi observado aumento significante dos limiars auditivos no grupo amicacina no 21° dia ($p < 0,001$). O grupo amicacina + creatina mono-hidratada apresentou nıveis significativamente mais baixos de limiars auditivos de potencial evocado auditivo de tronco encefálico no dia 21 em comparação com o grupo amicacina ($p < 0,001$). Alım disso, o grupo controle e o grupo amicacina + creatina mono-hidratada nıo diferiram significativamente em relação aos limiars de potencial evocado auditivo de tronco encefálico no 21° dia de tratamento ($p > 0,05$). Quando comparamos os valores de emissões otoacústicas por produto de distorção, nıo houve diferença significante entre os grupos amicacina e amicacina + creatina mono-hidratada no 7° dia ($p > 0,05$). No entanto, valores significativamente mais altos de emissões otoacústicas por produto de distorção foram observados no grupo amicacina + creatina mono-hidratada no 21° dia em comparação com o grupo amicacina $p < 0,001$).

Conclusão: O tratamento com creatina mono-hidratada protege contra a ototoxicidade da amicacina quando administrado em dose suficiente e por um período de tempo adequado.

© 2020 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O efeito tóxico de alguns medicamentos terapêuticos nas funções auditiva e vestibular é definido como ototoxicidade induzida por medicamentos.¹ Os aminoglicosıdeos sıo antibióticos de amplo espectro que há muito sıo amplamente usados para o tratamento de infecções bacterianas gram-negativas, principalmente a tuberculose.^{2,3}

A amicacina, o primeiro derivado semissintético de AG, é produzida a partir da droga natural canamicina, por acetilação.⁴

Entre os AGs, a amicacina, a canamicina e a neomicina causam principalmente danos cocleares, enquanto a estreptomomicina e a gentamicina estıo principalmente associadas a danos vestibulares.⁵ A toxicidade coclear induzida pela amicacina ocorre por apoptose como resultado da geração de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres de oxigênio pela amicacina. Como consequência, ocorrem a ototoxicidade e a surdez.⁶

A creatina (Cr) é uma substıncia natural e uma importante fonte de energia celular que pode ser sintetizada endogenamente em humanos e roedores⁷, mas também pode ser ingerida de forma exógena na dieta. Estudos recentes demonstraram a atividade antioxidante da creatina.⁸

O papel da Cr no metabolismo energético e sua ação neuroprotetora em doenças neurodegenerativas devido às suas propriedades antioxidantes foram relatados na literatura recente.⁹⁻¹¹ Alım disso, foi sugerido que a Cr pode ser eficaz no tratamento da perda auditiva na doença de Huntington, que é uma doença neurodegenerativa¹², e os efeitos favoráveis do tratamento com Cr na perda auditiva induzida por ruıdo foram demonstrados em um modelo animal.¹³

No presente estudo, objetivamos investigar os efeitos protetores da Cr contra a ototoxicidade causada pelos radicais livres de oxigênio gerados pela amicacina com o uso das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e o potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE).

Método

Animais

Para este estudo, 20 ratas Wistar albinas adultas (peso corporal, 200–240 g cada) foram mantidas em gaiolas plásticas sob condições padronizadas de alojamento de 12/12 horas de ciclo claro-escuro a uma temperatura de 21°C, com livre acesso a alimentos e água. Os animais foram usados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório.¹⁴ Todos os ratos do estudo foram submetidos ao exame otomicroscópico do ouvido (Zeiss, OPMI 9, Göttingen, Alemanha) antes dos testes audiológicos e aqueles com doença de orelha externa ou média foram excluídos. Os registros das emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD) e do potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) foram feitos em uma sala silenciosa. O desenho experimental foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa de animais do Ankara Research and Training Hospital (número de aprovação 0046). O estudo foi feito entre agosto de 2018 e setembro de 2018, no laboratório de experimentação animal do Ankara Research and Training Hospital.

Anestesia

Foram usados para anestesia Cetamina (100 mg/mL; 0,1 mL/100 g) (Ketalar® 50 mg/mL 10 mL, Pfizer, Istambul, Turquia) e xilazina (20 mg/mL; 0,025 mL/100 g) (Kepro Xylazine® 20 Inj. 20 mg/mL 25 mL, BioPharm, Istambul, Turquia). Os agentes anestésicos foram administrados por meio de injeções intraperitoneais antes dos registros.

Desenho do estudo

Este foi um estudo experimental cego e randomizado, de modo que apenas os cuidadores sabiam qual animal de teste pertencia a cada grupo e os pesquisadores foram cegados para a alocação do tratamento durante o exame audiológico.

Os ratos foram divididos em 4 grupos, cada um com 5 indivíduos: o grupo controle, o grupo creatina mono-hidratada (CrM), o grupo amicacina e o grupo amicacina + CrM. O grupo CrM recebeu creatina mono-hidratada (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) na dose de 2 g/kg uma vez ao dia via gavagem gástrica por 21 dias. O grupo amicacina recebeu amicacina (Amikozit® 500 mg, Sanofi Sağlık Ürünleri, İstanbul, Turquia) na dose de 600 mg/kg por injeções intramusculares uma vez ao dia por 21 dias. O grupo amicacina + CrM recebeu injeções intramusculares de amicacina (600 mg/kg) uma vez ao dia por 21 dias e CrM (2 g/kg) uma vez ao dia por gavagem gástrica por 21 dias. O grupo controle não recebeu tratamento. As medidas de EOAPD e PEATE foram feitas em todos os ratos nos dias 0, 7, 21. Os resultados obtidos antes e depois do tratamento foram comparados para cada grupo e entre os grupos.

Avaliação audiológica

Emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD)

Um dispositivo Eclipse 25 ABR System (Interacoustics, Middelfart, Dinamarca) foi usado para medidas de EOAPD. A menor sonda timpanométrica elástica disponível foi usada para os ratos. As emissões otoacústicas foram medidas através de estímulos de intensidade constante e variações de frequência. As frequências (f1 e f2) foram ajustadas para a relação f2: f1 de 1,22 e níveis de intensidade de estímulo de L1 = 65 dB, L2 = 55 dB. As medidas do DP-grama foram feitas nas frequências de 1000, 2000, 4000, 6000 Hz. Uma relação sinal/ruído acima (nível S/N) de 7 dB foi o limite para interromper a gravação. As medidas foram registradas em ambas as orelhas e foram feitas por um minuto.

Potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE)

Um dispositivo Eclipse 25 ABR System (Interacoustics, Middelfart, Dinamarca) foi usado para as medidas do PEATE. Eletrodos de agulha subdérmicas (Technomed Europe, Limburg, Holanda) e fones de inserção ER 3A foram usados para fornecer estímulos do tipo *click* em polaridades alternadas. O filtro foi ajustado em 100, 3000 Hz, taxa de repetição em 49,1 segundos e a janela de tempo em 15 milissegundos. Os estímulos foram apresentados na intensidade do nível de audição normal de 70 dB e o nível de intensidade foi reduzido em etapas de 10 dB até valores próximos ao limiar. Em seguida, o nível de intensidade foi reduzido em etapas de 5 dB até o valor do limiar ser atingido. Pelo menos 2 registros foram gerados para cada medida para testar a reprodutibilidade do comportamento e o limite foi verificado de forma cruzada. A colocação dos eletrodos ocorreu da seguinte forma: o eletrodo terra foi posicionado nas costas, o eletrodo positivo no vértice e um dos eletrodos negativos no ápice da mastoide esquerda e o outro no ápice da mastoide direita.

Análise estatística

Um cálculo *a priori* mostrou que um tamanho de amostra de 5 ratos em cada grupo seria necessário para o estudo

detectar uma diferença entre os grupos com um poder de 90% e um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS versão 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Todas as variáveis quantitativas foram estimadas com medidas de localização central (ou seja, média e mediana) e medidas de dispersão (ou seja, desvio-padrão). A normalidade dos dados foi verificada com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Testes paramétricos foram usados devido à distribuição normal dos valores. A Análise de Variância (Anova) de um fator foi usada para comparações intergrupos dos valores de EOAPD e PEATE e a significância estatística foi estabelecida em $p < 0,001$. O teste *post hoc* de Tukey da diferença honestamente significante (HSD, *Honestly Significant Difference*) foi usado para determinar se havia diferenças entre os grupos; a significância estatística foi estabelecida em $p < 0,001$ para testes *post hoc*. As diferenças pré-tratamento-pós-tratamento (Dia 0 vs. Dia 21) nas amplitudes de EOAPD e valores do PEATE nos 4 grupos foram analisadas com testes *t* de amostras pareadas, com significância definida em $p < 0,001$.

Resultados

Os ratos toleraram a anestesia e administração de amicacina e creatina mono-hidratada. Não foram observadas diferenças no consumo de água ou comida entre os grupos. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes nas amplitudes das EOAPD nas análises intragrupo e intergrupo no início do estudo ($p > 0,05$). Além disso, as médias dos grupos e os valores das orelhas direita e esquerda foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) (fig. 1). Não houve diferenças significantes nos níveis de EOAPD entre os grupos controle e CrM durante o tratamento (dias 7 e 21) ($p > 0,05$) (tabela 1). No entanto, os níveis de amplitude de EOAPD estavam significativamente reduzidos nos grupos amicacina e amicacina + CrM nos dias 7 e 21 ($p < 0,001$) (fig. 1). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significante nos níveis de EOAPD entre o grupo amicacina e o grupo amicacina + CrM no dia 7, indicou que a administração de creatina por 7 dias não conferiu qualquer proteção contra a ototoxicidade induzida por amicacina ($p > 0,05$). Entretanto, uma administração mais longa de creatina por 21 dias proporcionou um efeito protetor significativo contra a ototoxicidade induzida pela amicacina, conforme mostrado pelos resultados dos testes do grupo amicacina + CrM ($p < 0,001$) (tabela 1, fig. 1). Não houve diferenças significantes entre os limiares iniciais do PEATE na análise intragrupo e intergrupo ($p > 0,05$) (fig. 2). Não foram observadas diferenças significantes nos limiares do PEATE de qualquer grupo de acordo com a análise intergrupo no 7º dia ($p > 0,05$) (tabela 2). Houve um aumento significativo nos limiares do 21º dia no grupo que recebeu apenas amicacina ($p < 0,001$) (fig. 2). O aumento no limiar do PEATE melhorou significativamente no grupo amicacina + CrM em comparação com o grupo amicacina isolada no 21º dia ($p < 0,001$) (tabela 2). Além disso, os limiares do PEATE do grupo controle e do grupo amicacina + CrM não foram significativamente diferentes no 21º dia ($p > 0,05$).

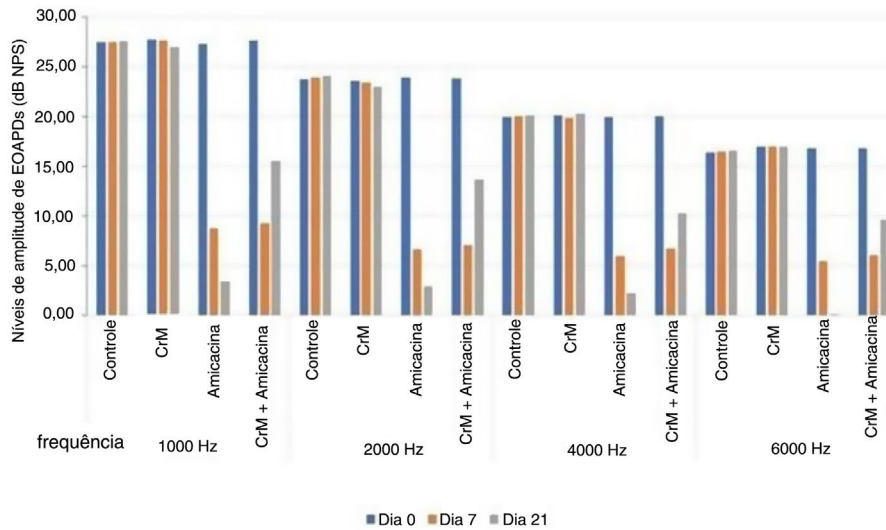


Figura 1 Níveis de amplitude de EOAPD dos grupos em diferentes frequências. EOAPD, Níveis de amplitude de grupos em diferentes frequências.

Tabela 1 Análise intergrupo dos níveis de amplitude das emissões otoacústicas - produto de distorção (EOAPD) durante o tratamento

Grupos	Dia 7	Dia 21
Controle/CrM	0,815	0,618
Controle/Amicacina	0,000 ^a	0,000 ^a
Controle/Amicacina + CrM	0,000 ^a	0,000 ^a
CrM/Amicacina	0,000 ^a	0,000 ^a
CrM/CrM + Amicacina	0,000 ^a	0,000 ^a
Amicacina/CrM + Amicacina	0,995	0,000 ^a

* Diferenças estatísticas nos níveis de amplitude de EOAPD em 6000 Hz entre os grupos, conforme detectado pelo teste *post hoc* de diferença significativa honesta (HSD) de Tukey.

^a $p < 0,001$ indica uma diferença significativa nos valores de EOAPD entre os grupos.

Discussão

No presente estudo, investigamos os potenciais efeitos protetores da Cr contra a ototoxicidade após a exposição à amicacina em um modelo experimental em ratos. Nossos achados confirmaram a ototoxicidade induzida pela amicacina com EOAPD e PEATE e demonstraram o efeito protetor da Cr contra a ototoxicidade da amicacina. Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo da literatura a relatar o efeito protetor da Cr contra a ototoxicidade. Os aminoglicosídeos (AG) são antibióticos potentes usados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas e tuberculose; no entanto, o uso terapêutico de AG é limitado por seus efeitos colaterais, inclusive ototoxicidade e nefrotoxicidade.⁴ Apesar de estarem associados a efeitos colaterais, os AGs ainda são indispensáveis no tratamento de condições potencialmente fatais devido à atual preocupação com a resistência aos antibióticos.

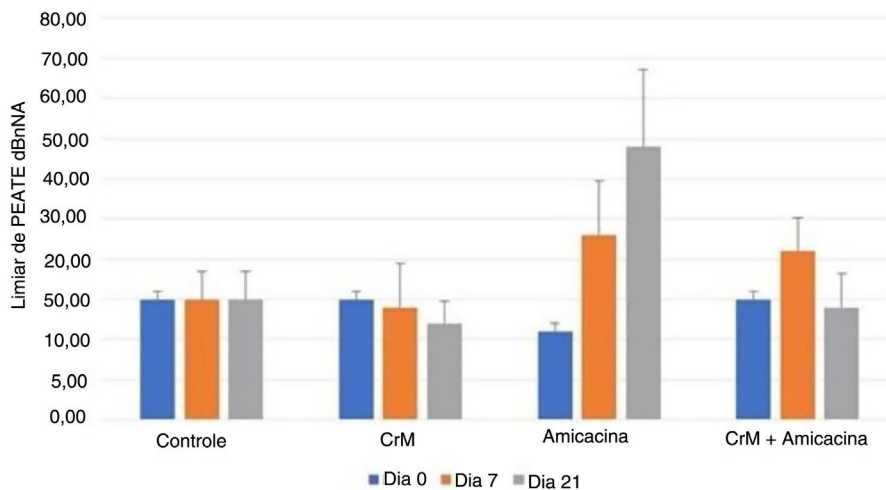


Figura 2 Limiares de PEATE dos grupos.

Tabela 2 Análise intergrupo dos limiares de PEATE durante o tratamento

Grupos	Dia 7	Dia 21
Controle/CrM	0,989	0,839
Controle/ Amicacina	0,104	0,00 ^a
Controle/ Amicacina + CrM	0,287	0,992
CrM/ Amicacina	0,059	0,000 ^a
CrM/CrM + Amicacina	0,177	0,944
Amicacina/CrM + Amicacina	0,925	0,000 ^a

* Diferenças estatísticas nos limiares de PEATE entre os grupos, conforme detectado pelo teste post hoc de diferença significativa honesta (HSD) de Tukey.

^a $p < 0,001$ indica uma diferença significativa nos valores de PEATE entre os grupos.

A amicacina é usada no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes a outros antibióticos AG.¹⁵ Ela também é usada para o tratamento de infecções graves devido à sua ação sinérgica com certos antibióticos.¹⁶ Escolhemos a amicacina para o presente estudo com base em seu uso generalizado.

A amicacina causa apoptose das células ciliadas externas da cóclea através de radicais livres de oxigênio.^{3,6} Esse tipo de dano induzido pela amicacina ocorre inicialmente na base da cóclea e progride até o ápice. A perda auditiva, bem como a redução dos escores de discriminação da fala (DF), ocorre como resultado desse processo apoptótico que envolve toda a via auditiva.¹⁷ Estudos anteriores mostraram que a amicacina pode induzir ototoxicidade em uma dose de 600 mg/kg/dia.¹⁷

No estudo de Avci et al., ratos receberam uma dose de 600 mg/kg/dia de amicacina, o que resultou em uma ototoxicidade acentuada em 21 dias de seguimento.¹⁸ No estudo atual, usamos amicacina na mesma dose. As alterações estatisticamente significativas nos resultados das EOAPD e do PEATE observadas no grupo amicacina no fim de 21 dias ($p < 0,001$) mostraram que essa dose é suficiente para induzir ototoxicidade em ratos (figs. 1 e 2).

No presente estudo, investigamos o efeito protetor da Cr com propriedades antioxidantes conhecidas⁸ contra a ototoxicidade induzida pela ação oxidante da amicacina. A creatina é um ácido orgânico nitrogenado, conhecido por aumentar a massa e o desempenho muscular, prevenir a atrofia muscular causada por doenças e ajudar a fornecer energia às células através de uma reação reversível catalisada pela enzima creatina quinase.¹²

Além de seu papel de aumentar os estoques de energia, a Cr exibe uma potente ação antioxidante ao reduzir a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumenta e restaura o potencial da membrana mitocondrial.¹⁹ Acredita-se que os suplementos de creatina melhorem o sistema de defesa antioxidante mitocondrial e mantenham a homeostase energética ideal.¹²

Em um modelo animal de perda auditiva induzida por ruído, o tratamento com Cr demonstrou reduzir significativamente as mudanças no limiar auditivo.¹³ O uso de creatina para perda auditiva induzida por esse tipo de estresse oxidativo foi considerado benéfico e necessário, devido ao seu papel na manutenção dos níveis de ATP e sua capacidade de eliminar os radicais livres de oxigênio.¹²

Foi demonstrado em ratos que a suplementação com Cr administrada na forma de CrM em uma dose de 2 g/kg por um período de 2-4 semanas é necessária para observar alguma eficácia terapêutica.²⁰ Portanto, usamos essa estratégia de tratamento no presente estudo.

Embora a audição tenha sido avaliada apenas por EOA em alguns estudos que usaram modelos animais experimentais^{18,21,22}, outros usaram apenas o PEATE.^{23,24} Em nosso estudo, usamos as medidas de PEATE e EOAPD para melhorar a confiabilidade de nossos resultados.^{25–28}

No presente estudo, os valores de EOAPD significativamente mais baixos foram observados nos dias 7 e 21 nos grupos que receberam amicacina e amicacina + CrM em comparação com a linha basal ($p < 0,001$) (fig. 1). No dia 21, o grupo amicacina + CrM apresentou valores de EOAPD significativamente maiores em comparação com o dia 7 (fig. 1). Embora não tenha havido diferença significativa nos valores de EOAPD entre os grupos amicacina e amicacina + CrM no dia 7 ($p > 0,05$), valores de EOAPD significativamente maiores foram observados no grupo amicacina + CrM no dia 21 em comparação com o grupo amicacina ($p < 0,001$) (fig. 1).

Os danos à orelha causados pela amicacina podem progredir para o oitavo nervo craniano. Em relação aos valores do PEATE, foi observado aumento significativo dos limiares auditivos apenas no grupo amicacina no 21º dia ($p < 0,001$) (fig. 2). O grupo amicacina + CrM apresentou níveis de limiares auditivos significativamente menores no 21º dia em comparação ao grupo amicacina ($p < 0,001$) (tabela 2). Além disso, o grupo controle e o grupo amicacina + CrM não diferiram significativamente em relação aos limiares do PEATE no 21º dia de tratamento ($p > 0,05$) (tabela 2). Diante desses achados, pode-se concluir que a suplementação com Cr não confere efeito protetor contra a ototoxicidade quando administrada por 7 dias e seu efeito protetor ocorre após 21 dias de tratamento. Nossos achados são consistentes com um estudo anterior que demonstrou a eficácia da administração de Cr em ratos após um período de tratamento de 2 a 4 semanas.²⁰ Considerando os valores de PEATE e EOAPD, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo CrM isolada nos dias 0, 7 e 21 ($p > 0,05$) (tabelas 1 e 2), sugeriu que a Cr não é ototóxica.

Em um estudo que usou um modelo animal experimental, Aksoy et al. relataram que os efeitos ototóxicos da amicacina podem ser limitados pelo uso concomitante de timoquinona. Além das medidas de PEATE e EOAPD, os mesmos autores avaliaram marcadores de estresse oxidativo do estado antioxidante total (EAT) e estado oxidante total (EOT)²⁷ e mostraram que a amicacina aumenta o estresse oxidativo com essas medidas. Existem estudos na literatura que relataram os efeitos protetores do resveratrol, trimetazidina, timoquinona e pentoxifilina contra a ototoxicidade induzida pela amicacina, dos quais todos demonstraram eficácia antioxidante.^{18,21,27,29}

Embora nosso estudo tenha mostrado o efeito protetor da creatina na ototoxicidade induzida por amicacina com base nos resultados do PEATE e das EOAPD, isso não é um indicador suficiente de dano funcional e histológico. Portanto, a cóclea deve ser estudada histologicamente para demonstrar definitivamente os efeitos protetores das drogas antioxidantes e neuroprotetoras usadas em estudos experimentais de ototoxicidade da amicacina.

A principal limitação do nosso estudo é a falta de exames histopatológicos. Os exames histopatológicos poderiam ter demonstrado o efeito protetor da Cr contra a ototoxicidade induzida pela amicacina e sua natureza não tóxica quando usada sozinha, em nível celular. Mais estudos que investiguem o efeito protetor da creatina contra a ototoxicidade com avaliações bioquímicas e histopatológicas são necessários.

Conclusão

O tratamento com creatina protege contra a ototoxicidade induzida pela amicacina, quando administrada em uma dose suficiente e por um período de tempo adequado.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Kasse C, Hyppolito M, Cruz O, de Oliveira J. Ototoxicity and otoprotection. *Rev Bras Med.* 2008;4:105–15.
- Matz G. Aminoglycoside cochlear ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993;26:705–12.
- Warchol ME. Cellular mechanisms of aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;18:454–8.
- Selimoglu E. Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des.* 2007;13:119–26.
- Selimoglu E, Kalkandelen S, Erdogan F. Comparative vestibulotoxicity of different aminoglycosides in the Guinea pigs. *Yonsei Med J.* 2003;44:517–22.
- Huth M, Ricci A, Cheng A. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol.* 2011;2011:937861.
- Tarnopolsky MA, Beal MF. Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. *Ann Neurol.* 2001;49:561–74.
- Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, et al. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids.* 2011;40:1385–96.
- Beal MF. Neuroprotective effects of creatine. *Amino Acids.* 2011;40:1305–13.
- Investigators NN-P. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology.* 2006;66:664–71.
- Cunha MP, Martín-de-Saavedra MD, Romero A, Egea J, Ludka FK, Tasca CI, et al. Both creatine and its product phosphocreatine reduce oxidative stress and afford neuroprotection in an in vitro Parkinson's model. *ASN Neuro.* 2014;6:1–16.
- Lin Y-S, Wang C-H, Chern Y. Besides Huntington's disease, does brain-type creatine kinase play a role in other forms of hearing impairment resulting from a common pathological cause? *Aging (Albany NY).* 2011;3:657–62.
- Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. Creatine and tempol attenuate noise-induced hearing loss. *Brain Res.* 2007;1148:83–9.
- Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. The 1996 guide for the care and use of laboratory animals. *ILAR J.* 1997;38:41–8.
- Wrześniak D, Beberok A, Otręba M, Buszman E. Modulation of melanogenesis and antioxidant defense system in melanocytes by amikacin. *Toxicol In Vitro.* 2013;27:1102–8.
- Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol.* 2000;5:3–22.
- Miman MC, Ozturan O, Iraz M, Erdem T, Olmez E. Amikacin ototoxicity enhanced by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Hear Res.* 2002;169:121–9.
- Avcı D, Erkan M, Sönmez MF, Kökoğlu K, Güneş MS, Gündoğdu R, et al. A Prospective Experimental Study on the Protective Effect of Resveratrol against Amikacin-Induced Ototoxicity in Rats. *J Int Adv Otol.* 2016;12:290–7.
- Meyer LE, Machado LB, Santiago APS, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, et al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem.* 2006;281:37361–71.
- Ipsiroglu OS, Stromberger C, Ilas J, Höger H, Mühl A, Stöckler-Ipsiroglu S. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine- monohydrate in various animal species. *Life Sci.* 2001;69:1805–15.
- Berkiten G, Salturk Z, Topaloğlu İ, Uğraş H. Protective effect of pentoxifylline on amikacin-induced ototoxicity in rats. *Am J Otolaryngol.* 2012;33:689–92.
- Bayindir T, Filiz A, Iraz M, Kaya S, Tan M, Kalcioğlu MT. Evaluation of the protective effect of Beta glucan on amikacin ototoxicity using distortion product otoacoustic emission measurements in rats. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2013;6:1–6.
- Edizer DT, Yigit O, Cinar Z, Gul M, Kara E, Yigitcan B, et al. Protective role of intratympanic Nigella sativa oil against gentamicin induced hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;97:83–8.
- Şimşek G, Tokgoz SA, Vuralkan E, Caliskan M, Besalti O, Akin I. Protective effects of resveratrol on cisplatin-dependent inner-ear damage in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270:1789–93.
- Dogan M, Polat H, Yasar M, Bayram A, Karatas D, Hira İ, et al. Protective role of misoprostol in prevention of gentamicin ototoxicity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;96:140–4.
- Somdaş MA, Korkmaz F, Gürgen SG, Sagit M, Akçadağ A. N-acetylcysteine prevents gentamicin ototoxicity in a rat model. *J Int Adv Otol.* 2015;11:12–8.
- Aksoy F, Dogan R, Ozturan O, Tugrul S, Veyseller B, Ozer OF, et al. An evaluation of the protective effects of thymoquinone on amikacin-induced ototoxicity in rats. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2015;8:312–9.
- Koçak İ, Sarac S, Aydoğan E, Şentürk E, Akakın D, Koroglu K, et al. Evaluation of the possible protective role of naringenin on gentamicin-induced ototoxicity: A preliminary study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2017;100:247–53.
- Aksoy F, Dogan R, Ozturan O, Eren SB, Veyseller B, Pektas A, et al. Protective effect of trimetazidine on amikacin-induced ototoxicity in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2014;78:663–9.