

The Effect of Memantine on Experimentally Gentamicin Induced Vestibulotoxicity in Guinea Pigs

Chan Hee Park¹, Eung Hyub Kim¹, Soo Il Kim², Ki Sang Rha^{1,3} and Yong Ho Park^{1,3}

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, ²Anatomy, ³Research Institute for Medical Sciences, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon, Korea

실험적으로 유도한 Gentamicin 전정독성 기니픽 모델에서 Memantine의 효과

박찬희¹ · 김응협¹ · 김수일² · 나기상^{1,3} · 박용호^{1,3}

충남대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 해부학교실,² 의학연구소³

Received October 9, 2009
Revised December 29, 2009
Accepted December 31, 2009

Address for correspondence
Yong Ho Park, MD
Department of Otolaryngology-
Head and Neck Surgery,
Chungnam National University
College of Medicine,
33 Munhwa-ro, Jung-gu,
Daejeon 301-721, Korea
Tel +82-42-280-7697
Fax +82-42-253-4059
E-mail parkyh@cnu.ac.kr

Background and Objectives In general, aminoglycosides are known to cause ototoxicity through the glutamate induced nitric oxide production. The N-methyl-D-aspartate (NMDA) related glutamate receptors have a pivotal role in aminoglycoside induced ototoxicity. Memantine is known as a safe NMDA antagonist and is also used in some neurologic insults, such as the Alzheimer disease. In this study, we observed the effect of memantine on gentamicin induced vestibulotoxicity in an animal model.

Materials and Method Vestibulotoxicity was induced with intratympanic administration of gentamicin and memantine was injected intraperitoneally to a study group. Histomorphological studies for vestibule were performed via light and electron microscopy. Immunohistochemical studies were performed for iNOS, nitrotyrosine and apoptosis via TUNEL staining.

Results The numbers of hair cells were decreased significantly in the gentamicin group than in the gentamicin-memantine group. Increased immunoreactivities for iNOS and nitrotyrosine were observed in the gentamicin group than in the memantine-pretreated gentamicin group. TUNEL positive cells were more frequently observed in the gentamicin group than in the memantine-pretreated gentamicin group.

Conclusion This result shows that memantine has a protection effect on gentamicin-induced vestibulotoxicity in an animal model. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:77-83

Key Words Gentamicin · Memantine · Vestibulotoxicity.

서 론

아미노글라이코사이드계 항생제는 높은 효과와 낮은 비용 때문에 그람 음성 세균감염의 치료에 많이 사용되고 있으나 심각한 이독성과 신독성을 일으킬 수 있는 것으로 잘 알려져 있다. Gentamicin은 내이에서 유모세포의 파괴를 일으키는 것으로 알려진 대표적인 아미노글라이코사이드계 항생제로 지금까지 이러한 이독성 기전에 대하여는 많은 연구가 진행되었는데 glutamate 연관 수용체의 과활성과 유리기(free radical)의 생성으로 인하여 발생하는 것으로 생

각되고 있다.

다른 중추신경계와 유사하게 와우와 전정에서도 유모세포와 원심성 섬유 접합 부위에서 대표적인 흥분성 신경전달물질로 작용하는 glutamate는 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 관련 수용체, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 관련 수용체, kainate 관련 수용체를 통하여 작용한다.^{1,2)} 이 중 NMDA 관련 수용체는 glutamate 이외에도 내인성 polyamine에 의해서 활성화될 수 있는데 아미노글라이코사이드계 항생제는 이런 polyamine과 유사한 특성을 가져 NMDA 관련 수용

체를 활성화하여 이독성을 유발한다.³⁾

기존의 연구에서 NMDA 관련 수용체의 길항제인 dizocilpine이 아미노글루타코사이드계 항생제의 이독성을 감소시킨다는 연구들이 있었으나^{4,5)} 이러한 NMDA 관련 수용체 길항제는 정상적인 신경계 기능에도 영향을 주어 심각한 부작용의 가능성 때문에 사용이 제한되고 있다.⁶⁾ 최근 NMDA 관련 수용체의 또 다른 길항제인 memantine은 약리학적으로 부작용이 적은 것으로 알려져 있으며 과도한 NMDA 관련 수용체의 기능으로 인한 신경계의 비정상적인 활성화를 효과적으로 억제하는 약물로 임상적으로 알츠하이머병이나 혈관성 치매 등에서 사용되고 있다.^{7,8)}

저자들은 본 연구에서 gentamicin으로 유발한 전정독성 모델에서 memantine의 예방효과에 대하여 알아보고자 하였다. Gentamicin 투여 후 대조군과 실험군에서 난형난반 유모세포의 손상 정도와 세포자멸사를 관찰하였으며 세포독성의 매개체인 산화질소(nitric oxide, NO)를 유발하는 산화질소 합성효소(inducible nitric oxidesynthase, iNOS)의 발현과 산화질소와 과산소의 반응으로 생성되어 조직의 손상을 일으키는 peroxynitrite의 표지자인 nitrotyrosine의 발현을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험군의 분류

이경검사에서 고막이 정상이고 정상적인 Preyer 반사를 보이는 250 g 내외의 Dunkin-Hartley albino 기니픽 22 마리(44귀)를 대상으로 하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 대조군(group C; 4마리)과 gentamicin만을 투여한 군(group G; 9마리), 그리고 gentamicin과 memantine을 투여한 군(group GM; 9마리)로 분류하였다. Gentamicin의 투여는 실험동물을 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg) 혼합액을 복강 내 주사하여 마취한 후 현미경하에서 고막 전부에 gentamicin 4 mg(0.1 mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 27 G 천자침을 이용하여 고실 내 주입 후 그 자세로 30분간 유지하였다. 대조군 4마리는 동량의 생리식염수를 주입하였다. Memantine의 투여는 gentamicin 투여 12시간 전과 1시간 전에 memantine 20 mg/kg (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 복강 내 주사하였다(Fig. 1).

조직학적 관찰

조직의 준비

모든 실험동물은 ketamine과 xylazine의 혼합액으로 깊이 마취한 뒤 생리식염수와 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered solution(PBS)로 심장관류하였으며 측두골을 각각 채취하였다. Gentamicin만을 투여한 group G와 memantine을 전처치한 group GM에서는 각각 처치 후 3일, 7일, 14일째 측두골을 채취하였다(Fig. 1).

Phalloidin 염색과 면역조직화학염색을 위하여 채취된 측두골은 와우의 침부 일부와 등골을 제거하고 pH 7.4의 3% paraformaldehyde in 0.1 M PBS로 12시간 동안 와우내 고정하였으며 주사전자현미경적 관찰을 위하여서는 측두골을 2.5% glutaraldehyde로 12시간 동안 와우내 고정 후 각각 해부 현미경하에서 난형낭을 분리하고 이석을 제거하여 준비하였다.

난형난반 유모세포의 손상확인

유모세포 손상 여부를 확인하기 위하여 gentamicin 투여 후 14일째 분리된 난형낭은 해부현미경하에서 이석을 제거하고 난형난반을 분리하였으며 pH 7.4 phosphated buffered solution으로 세척하고 0.3% Triton-X로 처리한 뒤 tetramethyl-rhodamine isothiocyanate(TRITC)로 표지된 phalloidin(1 : 50; Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 30분간 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하고 수용성 마운트로 포매하여 형광현미경(BX51TRF, Olympus, Tokyo, Japan)하에서 관찰하였다. 주사전자현미경적 관찰을 위하여 2.5% glutaraldehyde에 고정된 조직은 탈수와 금도금 과정을 거쳐 주사전자현미경(S2500, Hitach, Tokyo, Japan)하에서 관찰하였다. 각 그룹별 유모세포의 정량적인 분석을 위하여서는 주사전자현미경하 2,000배 시야에서 각각 3개의 조직을 striola를 제외한 5부위를 관찰하여 유모세포의 수를 계산하여 평균하였다.

면역조직화학염색

면역조직화학염색을 위하여 gentamicin 투여 후 3, 7, 14일째 분리된 측두골은 해부현미경하에서 난형낭을 분리해 내어 pH 7.4의 3% paraformaldehyde 0.1 M PBS로 24

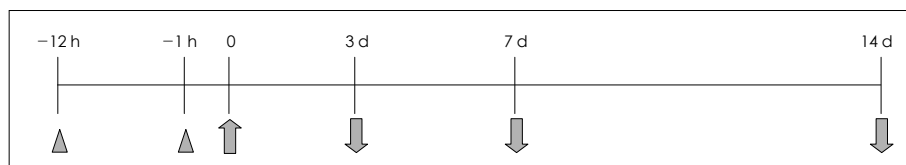


Fig. 1. Schematic diagram of experiment schedule. ▲: memantine injection, ↑: gentamicin injection, ↓: histologic examination.

시간 동안 고정 후 파라핀에 포매한 다음 4 μm 두께로 절편을 만들었다. 이 조직절편은 탈파라핀 후 조직절편을 citrate buffer(pH 6.0) 용액에 담근 다음 5분씩 2회에 걸쳐 microwave에 넣어 가열하였다. 0.1 M PBS로 세정하고 내인성 peroxidase의 활성을 저지하기 위하여 0.5% periodic acid 용액에 10분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세정하였다. 세정 후 ABC kit(Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA)에 포함되어 있는 blocking serum(normal goat serum)을 1시간 동안 반응시키고 일차 항체 anti-iNOS(1 : 30, monoclonal, Sigma, MO, USA)와 anti-nitrotyrosine(1 : 100, Sigma, MO, USA)으로 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 세 차례 세척 후 biotinylated secondary antibody(Zymed, CA, USA)로 처리 후 15분 간 반응시키고 다시 PBS로 두 차례 세척하였다. 이후 조직은 streptavidin-peroxidase(Zymed, CA, USA)를 처리 후 15분간 반응시켰다. Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)(Zymed, CA, USA)을 발색에 사용하였고 대조염색은 hematoxylin을 이용하였다. 이후 조직을 광학현미경으로 관찰하였다. 음성대조군은 일차항체 대신 PBS를 사용하여 같은 방법으로 처리하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL) 염색

세포자멸사를 확인하기 위하여 준비한 파라핀 절편에 TUNEL staining Kit(ApopTag Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kt, Serologicals, KS, USA)를 이용하였다. 조직절편은 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀을 시행하고 99%, 95%, 70%의 alcohol로 처리하였으며 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Proteinase K로 실온에서 약 15분간 반응시킨 후 내인성 peroxidase의 활성을 저지하기 위하여 3% H_2O_2 (Sigma,

St. Louis, MO, USA) in PBS로 처리하였다. Equilibration buffer로 약 10초간 처리한 뒤 working strength TdT enzyme으로 37°C Chamber에서 1시간 반응시키고 working strength stop/wash buffer로 약 10분간 처리하였다. PBS로 세정한 뒤 anti-digoxigenin conjugate로 실온에서 30분간 처리하고 PBS로 세정한 뒤 peroxidase substrate는 diaminobenzidine(DAB)로 발색하였고, 대조염색으로는 hematoxylin을 사용하여 약 10분간 시행하였으며 증류수에 세정하고 마운트하여 광학 현미경(BX50W/PH20, Olympus, Tokyo, Japan)하에 관찰하였다. TUNEL 양성 세포의 발현 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 염색된 세포의 수를 연속된 3장의 슬라이드에서 400배 시야로 유모세포의 각각 2부위를 관찰하여 평균하였다.

통계학적 검정

통계학적 검정은 SPSS(version 13.0)을 이용하였다. 대조군과 실험군에서 난형난반의 유모세포수의 차이는 ANOVA의 Tukey-Kramer Multiple Comparisons test를 이용하여 분석하였으며 group G와 group GM의 TUNEL 양성 세포의 차이는 T-test를 이용하여 각각 p 값이 0.01보다 작은 경우를 통계학적으로 유의하다고 하였다.

결 과

난형난반 유모세포 손상

Gentamicin 처리 14일 후 유모세포의 손상 정도를 관찰하기 위한 phalloidin 염색과 주사전자현미경 소견에서 gentamicin만 처리한 group G와 memantine 전처리 후 gentamicin으로 처리한 group GM에서 정상군에 비하여 모두 유모세포의 손상이 관찰되었다(Fig. 2). 유모세포의 평균수

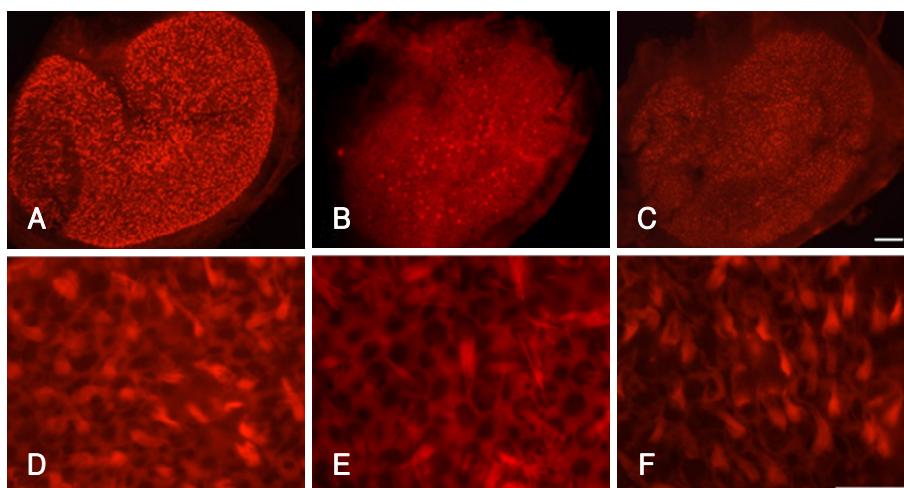


Fig. 2. Phalloidin staining of utricles at 14 days after treatment of gentamicin treatment. Loss of hair cells are more frequently observed in gentamicin group compared with control group and memantine pretreated gentamicin group. A and D: control, B and E: gentamicin group, C and F: memantine pretreated gentamicin group. Scale bars: 50 μm in A, B, C, 25 μm in D, E, F.

는 대조군에서 75 ± 7.8 이었으며 group G와 group GM에서는 각각 20 ± 7 , 53 ± 9.4 로 대조군에 비하여 group G와 group GM에서 유의하게 유모세포의 손상이 관찰되었으며, group GM에서 유모세포의 생존이 group G에 비하여 유의하게 많음을 관찰할 수 있었다($p < 0.001$) (Fig. 3).

면역조직화학염색

iNOS의 발현

대조군에서는 iNOS의 발현을 관찰할 수 없었으며 gentamicin만 처리한 group G와 memantine 전처리 후 gentamicin으로 처리한 group GM의 유모세포에서 각각 iNOS의 발현을 관찰할 수 있었는데, group GM에서 group G에 비하여 그 발현의 정도가 감소되어 있었다(Fig. 4). 또한 gentamicin 처리 7일 후에는 group G와 group GM에서 모두 iNOS의 발현을 관찰할 수 없었다.

Nitrotyrosine의 발현

대조군에서는 nitrotyrosine 발현을 관찰할 수 없었으며 gentamicin 투여 3일과 7일 후 group G와 group GM에서 nitrotyrosine의 발현을 관찰할 수 있었다. 시간의 경과에 따른 발현양상의 차이는 관찰하기 어려웠으나 gentamicin 투여 3일 후 group GM에서 group G에 비하여 그 발현의 정도가 감소되어 있었다(Fig. 5).

TUNEL 염색

세포의 자멸사를 관찰하기 위하여 gentamicin 투여 7일 후에 시행한 TUNEL 염색에서 group G와 group GM에서 모두 TUNEL 양성 세포가 관찰되었는데 group G에서는 TUNEL 양성 세포가 약 43 ± 9.2 그리고 group GM에서는 27 ± 6.2 로 group GM에서 group G보다 세포의 자멸사가 감소되어 있었다($p < 0.01$) (Fig. 6).

Fig. 3. Scanning electron microscopic findings and hair cell survivals of utricles at 14 days after gentamicin treatment. A: control, B: gentamicin group, C: memantine pretreated gentamicin group. Hair cell survival were more frequent in group GM compared with group G (* $p < 0.001$) ($\times 2000$).

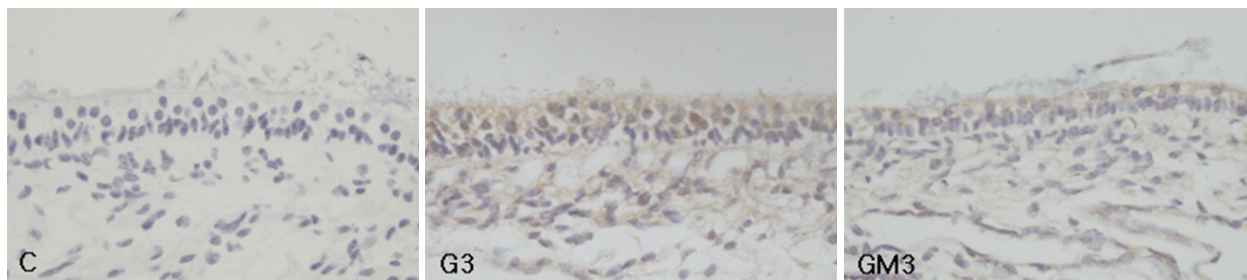
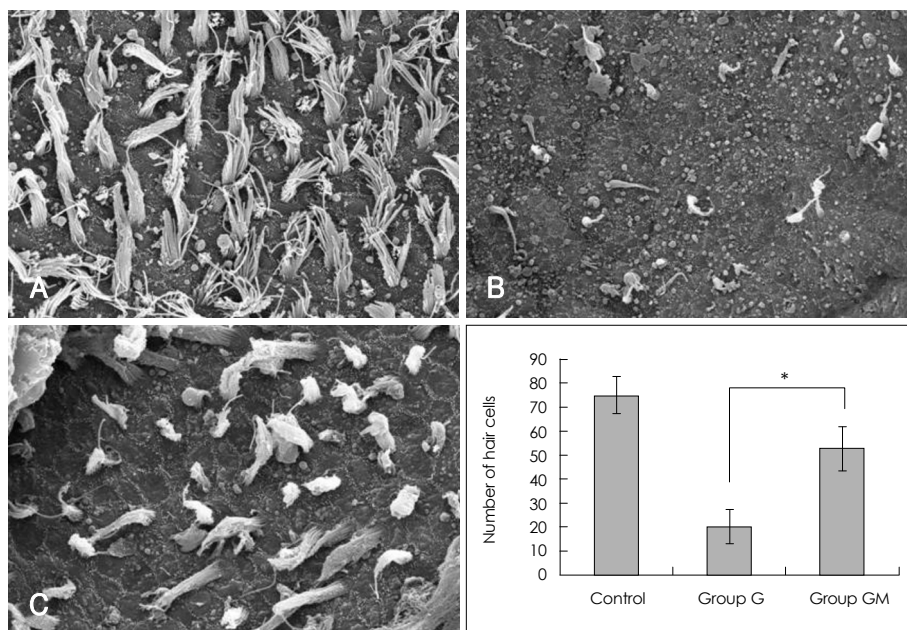


Fig. 4. Expressions of iNOS in utricles after gentamicin treatment. C: control, G3: 3 days after gentamicin group, GM3: 3 days after memantine pretreated gentamicin group. Increased immunoreactivities were observed in G3 compared with GM3. However there was no significant staining with iNOS in control group ($\times 400$).

고찰

Glutamate는 중추신경계에서 대표적인 흥분성 신경전달

물질로 와우와 전정에서 유모세포와 원심성 섬유 접합 부
위에서 주요 신경전달물질로 작용하는데 이러한 작용을 매
개하는 수용체는 AMPA 관련 수용체, NMDA 관련 수용체,

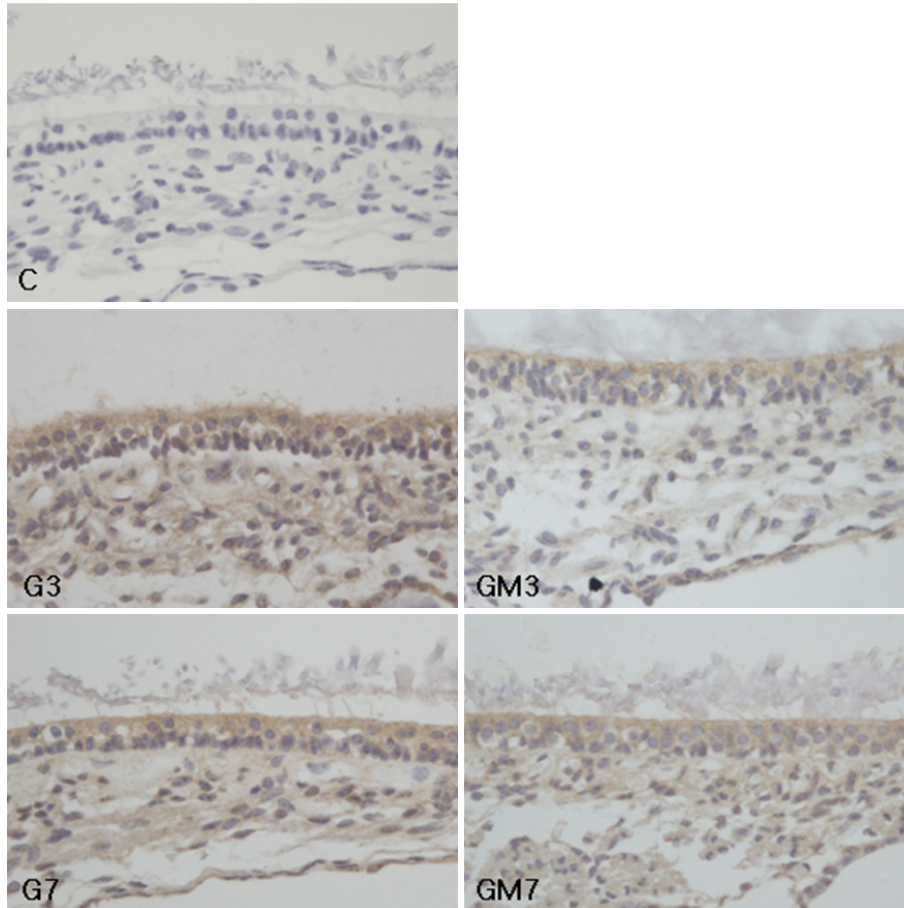


Fig. 5. Expressions of nitrotyrosine in utricles after gentamicin treatment. C: control, G3: 3 days after gentamicin group, GM3: 3days after memantine preteated gentamicin group. G7: 7 days after gentamicin group, GM7: 7 days after memantine preteated gentamicin group. Decreased immunoreactivities were observed in GM3 compared with G3 ($\times 400$).

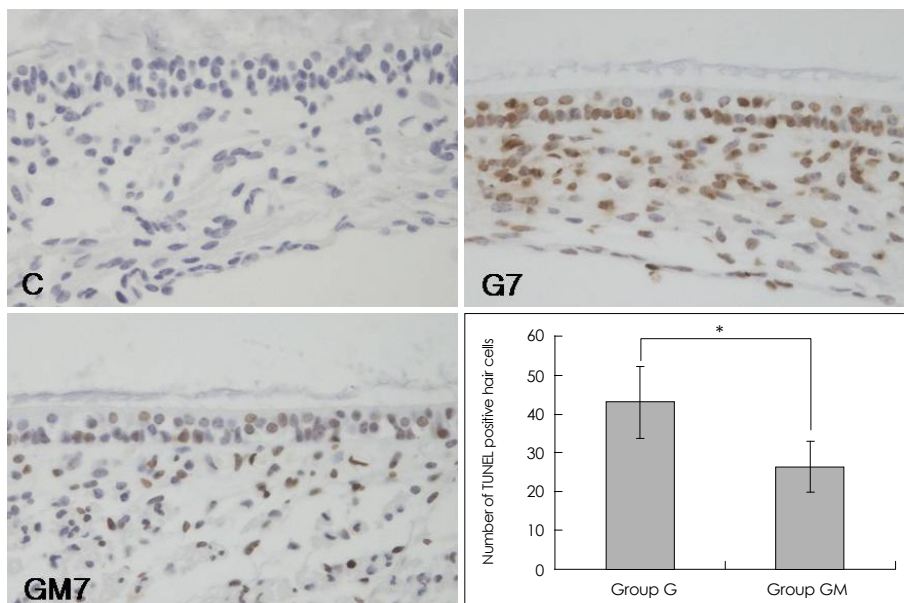


Fig. 6. TUNEL expressions in utricles at 7 days after gentamicin treatment. C: control, G7: 7 days after gentamicin group, GM7: 7 days after memantine preteated gentamicin group. Decreased TUNEL positive cells were observed in group GM compared with group G ($*p<0.01$) ($\times 400$).

kinate 관련 수용체 세 가지 아형이 존재한다.^{1,2)} 대표적인 AMPA 관련 수용체의 하부구조로는 GluR2, GluR3, GluR4, GluR5가 존재하고 NMDA 관련 수용체의 하부구조로는 NR1이 존재하는 데, mouse에서 태생 초기부터 와우와 전정에 발현되기 시작한다.⁹⁾ 이러한 glutamate 수용체의 아형들은 약동학적으로 다른 특징을 보이는데 AMPA 관련 수용체와 kainate 관련 수용체는 빠른 이온 흐름을 보이는 반면 NMDA 수용체는 전압에 의존하며 상대적으로 느린 흐름을 증가하지만 glutamate 관련 독성 반응에서 중요한 역할을 담당한다.²⁾

과도한 glutamate는 중추신경계의 신경원이나 내이의 유모세포에서의 신경독성과 관련되어 있고 이러한 흥분성 독성은 중추신경계나 전정 유모세포에서의 고농도 nitric oxide(NO) 생성과 관련이 있다.^{10,11)} 과도한 glutamate나 polyamine과 유사한 아미노글라이코사이드에 의해 NMDA receptor가 지속적으로 자극받게 되면 세포 내 칼슘 농도가 증가하게 되고 이것이 nitric oxide synthase(NOS)의 co-factor인 calmodulin에 결합하여 NOS의 활성도를 증가시키게 된다.¹²⁾

Nitric oxide synthase(NOS)는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS)의 세 가지 아형으로 존재한다. nNOS와 eNOS는 정상적인 내이 유모세포와 신경 섬유에 존재한다. 이 중 iNOS는 정상 내이에서는 존재하지 않고 어떠한 손상을 일으킬 수 있는 기전에서 발현되는 것으로 알려져 있는데, 최근 gentamicin으로 인하여 전정기관에서 iNOS의 발현이 세포독성을 유발하는 기전 중 하나로 보고된 바가 있다.¹³⁾ 저자들의 경우에도 gentamicin에 의한 전정독성 기전의 지표로 세포독성의 매개체인 NO를 유발하는 iNOS를 이용하여 관찰한 결과 대조군이나 memantine 전처치 후 gentamicin 투여군에서는 iNOS 발현을 관찰할 수 없었으나 gentamicin 투여군에서는 3일째 난형난반에서 발현되어 기존의 보고와 일치하는 결과로 iNOS가 gentamicin에 의한 전정독성에서 그 기전에 관여하는 것으로 생각하였다.

또한 NO는 직접 세포독성을 일으킬 수도 있으나 superoxide anion과 반응하여 세포독성 및 조직손상을 유발하는 peroxynitrite를 생성하는데, peroxynitrite는 유리 tyrosine과 단백질내 tyrosine 부위를 질소화시켜 nitrotyrosine을 생성하므로 peroxynitrite 이의 존재 및 활성도를 간접적으로 알 수 있다.¹⁴⁾

본 실험에서도 nitrotyrosine의 발현 양상은 3일 후에 gentamicin 투여군에서 memantine 전처치 후 gentamicin 투여군보다 더 강한 발현양상을 보여 이는 gentamicin 투여

군에서 더 많은 NO가 생성되어 세포독성을 유발하였음을 시사하는 간접지표로 생각된다. 하지만 7일 후에 그 발현양상이 유사하여 주로 조직손상의 초기에 관여하지 않을까 생각된다.

이렇게 내이 손상에 glutamate 수용체가 관여함이 알려지면서 AMPA 수용체나 NMDA 수용체 길항제의 역할에 대한 연구들이 진행되어 왔는데 Duan 등¹⁵⁾은 NMDA 수용체 길항제인 MK801과 neurotrophin 3이 guinea pig에서 소음과 아미노글라이코사이드계 항생제에 의한 와우 손상을 줄일 수 있었다고 보고하였으며, Hakuba 등¹⁶⁾에 의하면 AMPA/kainate 수용체의 길항제인 6-7-dinitroquinoxaline-2,3-dione(DNQX)이 gerbil에서 일시적인 와우허혈에 의한 유모세포의 손상을 감소시킬 수 있다고 보고 하였다. 또한 AMPA와 NMDA 수용체의 비특이적 길항제인 caroverine이 guinea pig와 rat에서 소음에 의한 와우 손상을 줄일 수 있었다는 보고도 있었다.^{17,18)} 그러나 이러한 길항제들은 우수한 효과에도 불구하고 정상적인 신경연접도 장애를 줄 수 있다는 한계가 있어 신경계 부작용 가능성 때문에 임상적으로 사용이 제한되고 있다.

Memantine은 항인플루엔자제인 adamantane 유도체로 memantine의 아민기(-NH₂)가 생리적인 상태에서 양전위를 형성해 NMDA 수용체 관련 채널에 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 NMDA 수용체 길항제로서의 역할이 우연히 발견된 후 주로 신경과 영역에서 알츠하이머 치매나 파킨슨씨 병에서 주로 사용되어 오고 있다. Memantine은 약리학적으로 비경쟁적인(uncompetitive) NMDA 길항제로 정상 생리적 상태에서는 길항작용을 나타내지 않지만 병적으로 NMDA 농도가 증가하였을 때에는 강력한 길항작용을 나타내며 기존 glutamate 수용체 길항제와는 다른 이러한 약리학적 특성으로 인해 정상 신경연접장애를 유발하지 않아 미국과 유럽에서 알츠하이머 치매나 파킨슨씨 병 치료제로 공인 받아 사용되고 있다.^{7,8,19)}

이에 저자들은 gentamicin으로 유발된 전정독성의 기전에서 NMDA 수용체의 길항제로 알려진 memantine의 효과에 대하여 알아보려고 하였다. 그 결과로 memantine이 기니픽에서 gentamicin에 의한 전정독성의 기전에서 iNOS와 nitrotyrosine의 발현을 감소시켰으며 난형난반 유모세포의 피사와 손상을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 전정독성을 관찰함에 있어서 기능적으로는 평가하지 못하였으며 전정기관의 일부인 난형난반만을 조직학적으로 관찰하여 추후 와우손상과 구형난반 및 팽대부 등 다른 전정기관에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Ryan AF, Brumm D, Kraft M. Occurrence and distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the cochlea. *Neuroreport* 1991; 2(11):643-6.
- 2) Niedzielski AS, Wenthold RJ. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 1995;15(3 Pt 2):2338-53.
- 3) Harvey SC, Skolnick P. Polyamine-like actions of aminoglycosides at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291(1):285-91.
- 4) Basile AS, Huang JM, Xie C, Webster D, Berlin C, Skolnick P. N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotic-induced hearing loss. *Nat Med* 1996;2(12):1338-43.
- 5) Basile AS, Brichta AM, Harris BD, Morse D, Coling D, Skolnick P. Dizocilpine attenuates streptomycin-induced vestibulotoxicity in rats. *Neurosci Lett* 1999;265(2):71-4.
- 6) Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* 2004; 1(1):101-10.
- 7) Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2003;348(14):1333-41.
- 8) Orgogozo JM, Rigaud AS, Stöffler A, Möbius HJ, Forette F. Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke* 2002;33(7):1834-9.
- 9) Puyal J, Sage C, Demêmes D, Dechesne CJ. Distribution of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoazolepropionic acid and N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the vestibular and spiral ganglia of the mouse during early development. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;139(1):51-7.
- 10) Takumida M, Anniko M. Glutamate-induced production of nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells. *Acta Otolaryngol* 2000;120(4):466-72.
- 11) Takumida M, Anniko M. Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following gentamicin exposure in vitro. *Acta Otolaryngol* 2001; 121(3):346-50.
- 12) Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266(5):68-71.
- 13) Hong SH, Park SK, Cho YS, Lee HS, Kim KR, Kim MG, et al. Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hear Res* 2006;211(1-2):46-53.
- 14) Kuhn DM, Sakowski SA, Sadidi M, Geddes TJ. Nitrotyrosine as a marker for peroxynitrite-induced neurotoxicity: the beginning or the end of the end of dopamine neurons? *J Neurochem* 2004;89(3):529-36.
- 15) Duan M, Agerman K, Ernfors P, Canlon B. Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(13):7597-602.
- 16) Hakuba N, Matsubara A, Hyodo J, Taniguchi M, Maetani T, Shimizu Y, et al. AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia. *Brain Res* 2003;979(1-2):194-202.
- 17) Chen Z, Ulfendahl M, Ruan R, Tan L, Duan M. Acute treatment of noise trauma with local caroverine application in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 2003;123(8):905-9.
- 18) Duan M, Chen Z, Qiu J, Ulfendahl M, Laurell G, Borg E, et al. Low-dose, long-term caroverine administration attenuates impulse noise-induced hearing loss in the rat. *Acta Otolaryngol* 2006;126(11):1140-7.
- 19) Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 1992;12(11):4427-36.