

Correlation between Dose of Ethacrynic Acid and Weight of Cat in the Cat Deafening Procedure

Jeong Hun Jang¹, Ho-Sun Lee¹, Hye Young Kim¹, Jun Ho Lee^{1,2},
Sun O Chang^{1,2}, Seung Ha Oh^{1,2} and Min-Hyun Park³

¹Department of Otorhinolaryngology; ²Research Center for Sensory Organs, Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul; and ³Department of Otorhinolaryngology, Seoul Metropolitan Government-Seoul National University Boramae Medical Center, Seoul, Korea

고양이 전농화 실험을 통한 Ethacrynic Acid와 체중 간의 상관성 고찰

장정훈¹ · 이호선¹ · 김혜영¹ · 이준호^{1,2} · 장선오^{1,2} · 오승하^{1,2} · 박민현³

서울대학교 의과대학 이비인후과학교실, ¹ 서울대학교 의과대학 임상연구센터 감각기관연구소, ² 서울대학교 보라매병원 이비인후과학교실³

Background and Objectives Co-administration of kanamycin (KM) with the loop diuretic ethacrynic acid (EA) has been known to produce a rapid and profound hearing loss in adult animals. The objective of this study was to see if monitoring the hearing status during intravenous infusion of EA could minimize individual variability and to evaluate the correlation between the dose of EA and the body weight (wt).

Materials and Method Twenty cats with the mean age of 24 weeks \pm 3.7 (range, 20.6–28.3 weeks) and the mean weight of 3.27 kg \pm 0.75 (range 2.4–4.75 kg) received a subcutaneous injection of KM (300 mg/kg) followed by an intravenous infusion of EA (1 mg/min). Click evoked auditory brainstem responses (ABRs) were recorded to monitor the hearing during the infusion. When the ABR thresholds rose to levels in excess of 90 dB SPL, the infusion of EA was stopped. The histopathologies for sections of apex, middle, base of cochlea were examined after 6 months.

Results There was a significant positive correlation ($p < .001$, $r^2 = .583$) between the EA dose and body weight. Cochlear histopathology showed an absence of organ of Corti and decrease of spiral ganglion cells in the majority of cochleas, especially in the basal turn. The extent of loss of spiral ganglion cells was dependent on their distance from the round window.

Conclusion Monitoring the animal's hearing status during the procedure ensured that the dose of EA was optimized for individual animals. Thus, the positive correlation between the EA dose and body weight should be considered should in designing the animal models of controlled high frequency hearing loss.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:749-54

Key Words Ethacrynic acid · Cochlea · Deafness · Aminoglycosides.

Received July 13, 2010
Revised September 28, 2010
Accepted September 28, 2010
Address for correspondence
Min-Hyun Park, MD
Department of Otorhinolaryngology,
Seoul Metropolitan Government-
Seoul National University
Boramae Medical Center,
Sindaeabang 2-dong, Dongjak-gu,
Seoul 156-707, Korea
Tel +82-2-870-2443
Fax +82-2-831-0714
E-mail drpark@snu.ac.kr

서론

청각에 대한 연구에서 동물을 이용한 실험은 필수적인 수단으로 사용되어 왔는데 백서(rat), 생쥐(mouse), 기니퓰(guinea pig), 모래쥐(gerbil), 금화조(zebra finch), 고양이(cat) 등이 대표적인 실험동물들이다. 이러한 동물을 이용하여 많은

질환 모델들이 발견되고, 또 만들어지고 있으며 청각생리 혹은 청각질환을 연구하는데 유용하게 사용된다. 이들 중에 전농 모델은 정상청력과 비교하여 변화를 연구하기 위해 자주 사용되는 모델 중의 하나이다.¹⁾

전농을 유발하기 위해 소음 자극, 내이의 물리적인 손상, 이독성 약물의 외림프강내 주입 그리고 이독성 약물의 장기

간 주입 등의 여러 방법이 사용되어 왔다. 소음 자극을 사용하는 경우는 비교적 간단하고 개체에 다른 손상을 초래하지 않으나 개체간의 감수성 차이로 인해서 최종 청력에 차이가 있을 수 있다.²⁾ 내이에 물리적 손상을 일으키는 것은 확실한 청력소실을 일으킬 수 있으나 수술적 방법이 필요하며 청각기관이 사라지게 되어 청각기관에 대한 실험을 하고자 할 때는 적합하지 않다.³⁾ 이독성 약물을 사용하는 방법은 장기간 투여하여 모델을 만드는데 시간이 걸리는 단점이 있다.⁴⁾

이독성 약물인 kanamycin(KM)과 이노제인 ethacrynic acid(EA)의 투여를 통해 전농을 유발하는 많은 연구들이 보고되어 왔다.^{5,6)} 특히, West 등⁵⁾은 KM을 주입하고 4시간 이내에 EA가 주입되도록 하였는데, 유모세포 손상과 EA의 용량간의 함수관계는 급격한 기울기를 보였고, 역치용량 이상에서, EA가 약간 증가되어도 광범위한 유모세포 손상을 유발하였다. 반면에 KM의 경우, 용량의 증가에 따라 난청의 정도가 단계적으로 변화하는 양상을 보였다.

이처럼 EA와 KM을 사용한 전농 모델은 단기간에 유모세포의 손상을 일으키며 청각기관을 보존하기 때문에 여러 청각 실험에 유용한 모델이라 할 수 있다. 하지만 고양이를 대상으로 EA와 KM을 사용하였던 기존 보고에서 EA의 사용용량이 개체에 따라 변화가 심하며 체중과 음의 상관관계에 있다는 결과가 있다.¹⁾ 이는 일반적인 약물동력학적인 면에서의 체중과 약물용량간의 양의 상관관계와는 다소 다른 결과이다. 본 연구는 KM와 EA를 이용하여 고양이를 전농화시키는 모델을 확립하고자 하였으며, 고양이의 몸무게와 약물용량과의 관계에 대해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구는 서울대학교병원 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University Hospital)에서 제시하는 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침을 준수하며 진행되었다.

2004년부터 2009년 11월까지 20마리(40귀)의 고양이를 대상으로 전농실험을 시행하였다. 고양이들의 나이는 평균 24주 \pm 3.7(20.6~28.3주)였고 몸무게는 평균 3.27 kg \pm 0.75 (2.4~4.75 kg)이었다. 고양이들의 신체검진상 정상적인 외이와 고막소견을 보였다.

전농실험을 위해 고양이들에게 zoletil(Vibrac Laboratories, France)(0.2 cc/kg)을 주입하여 마취를 시행하였다. 전농실험을 진행하기 전에 동물용 청성뇌간반응검사 장비(System 3, Tucker-Davis Technologies, USA)를 이용하여 청성뇌간유발반응검사를 시행하여 정상청력 여부를 확인

하였다. 자극음은 클릭음을 사용하였고 90 dB peak equivalent SPL(pe SPL)의 크기에서 10 dB pe SPL씩 크기를 감소시키면서 V 파형의 소실 여부를 확인하여 청력역치를 측정하였다. 측정 청력역치가 40 dB pe SPL 이하인 경우 정상으로 간주하였다. 고양이 전농화를 위한 약물의 투약방법 및 용량은 Xu 등¹⁾이 제시한 방법을 이용하였다. KM은 생리식염수와 혼합하여 200 mg/mL의 농도로 사용하였으며, EA의 경우 2.5 mg/mL의 농도로 사용하였다. 청성뇌간유발반응검사서 정상청력임을 확인한 후 KM(300 mg/kg)을 피하주사 한 후 30~60분이 경과한 후 EA를 1 mg/min의 속도로 지속적 혈관내 주입을 하면서 실시간으로 청성뇌간유발반응검사를 시행하였다. 90 dB의 자극에서 정상파형이 소실되는 것을 확인하면 주입을 중단하였다. 전농실험 이후 경과를 관찰하면서 신기능 이상 여부, 전반적인 신체 상태 등을 확인하여 약물부작용 여부를 확인하였고, 실험 2주 후 다시 청성뇌간유발반응검사를 시행하여 전농 여부를 확인하였다.

실험 대상 고양이 중 첫 2마리(4귀)는 전농 후의 와우의 조직학적 변화를 보기 위해 전농시킨 후 6개월째 와우를 채취하여 조직검사를 시행하였다. 채취한 와우는 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 동안 4°C에서 고정시켰다. 고정된 후 와우 주변의 골조직을 드릴을 이용하여 청색선(blue line)을 확인하면서 제거한 후 2 M EDTA(ethylenediaminetetraacetate) 용액으로 탈회화(decalcification)시킨 후 탈수화과정(dehydration)을 거쳐서 plastic resin으로 포매(embedding)한 후 1 μ m 두께로 자른 뒤 toluidine blue로 염색하여 관찰하였다. 정상 와우와 비교하기 위해 같은 연령의 고양이 2마리(4귀)의 와우를 채취하여 같은 방식으로 관찰하였다.

20마리의 고양이에 대해 몸무게 및 주입된 EA의 용량간의 상관관계 분석을 위해 SPSS 17.0(Chicago, IL, USA)을 이용하여 선형회귀분석법(linear regression analysis)을 적용하였다.

결 과

마취 후 KM을 피하주사 후 EA를 지속적으로 주입하면서 실시간으로 청성뇌간유발반응을 확인하였을 때 20마리 모두에서 시간적 차이는 있었으나 V 파형이 소실되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 실험 후 회복과정에서 1일째 보행장애 또는 실조증이 의심되는 경우가 있었으나 모두 시간이 지나면서 1주일 이내 호전되는 양상을 보였고, 신기능 부전과 관련된 피뇨나 체중 감소와 같은 증상도 관찰되지 않았다. 2주 뒤 시행한 청성뇌간유발반응검사서 20마리 모

두 전농상태가 지속되는 것을 확인할 수 있었다.

전농실험에 사용된 고양이의 몸무게 및 KM과 EA의 용량을 Table 1에 나타내었다. 고양이의 몸무게와 전농을 일으키는 EA의 용량간에는 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 보였다($p<.001$, $r^2=.583$)(Fig. 2). 즉, 고양이를 전농시키는 데 있어서 필요한 EA의 용량은 체중에 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

조직검사 결과 와우의 기저부의 경우 코티 기관은 완전히 소실되었고 지지세포도 소실되었음을 확인할 수 있었다. 또한 나선신경절의 신경세포수도 정상에 비해 20% 정도만 잔존한 것을 확인하였다(Fig. 3A, B and C). 와우의 중간과 침부의 경우, 코티 기관의 형태는 유지되고 있으나, 외유모 세포 부위가 공포화(vacuolization) 되면서 소실되는 것을 관찰할 수 있었다. 나선신경절은 정상에 비해 세포체의 소실이 관찰되었으며 약 30% 정도가 남아있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3D-G).

고 찰

전농화 된 동물을 만들기 위해서는 여러 가지 고려할 점이

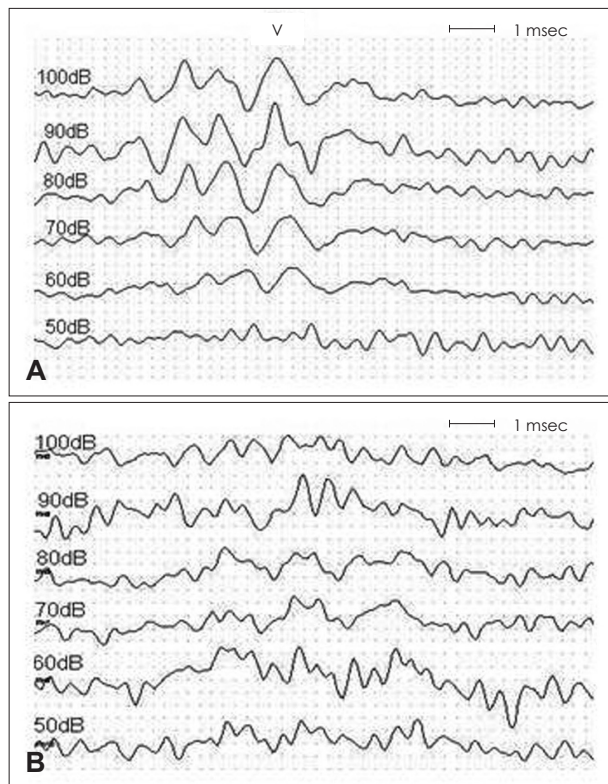


Fig. 1. Auditory brainstem response (ABR) to acoustic click evoked from cat No.1. The loss of wave V is shown at the stimulus with 50 dB SPL during continuous infusion of ethacrynic acid (EA)(A). When the ABR thresholds rose to levels in excess of 90 dB SPL, the infusion of EA was stopped (B).

있다. 전농을 유발하는 병태생리과정이 중 내에서 최소한의 변이를 나타내어야 하고, 개체간의 비교를 위해서는 전농은 양측성으로 유발되어야 하며, 조직병리관찰을 위해서는 와우에 최소한의 손상이 가해져야 한다. 또한, 전농 이외의 생체내 변화를 최대한 억제하여야 하고 개체에 부작용을 최소한도로 일으켜야 한다.

이러한 점에서 본 연구에 사용된 KM과 EA의 동시 투약방법은 전농을 효과적으로 유발하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. Body weight (Bwt) of cats and dose of kanamycin (KM) and ethacrynic acid (EA) used for deafening (n=20)

No	Bwt (kg)	KM (g)	EA (mg)
1	3.75	0.85	125
2	2.8	1	82
3	3.65	1.1	90
4	4.75	1.5	95
5	4.25	1.25	75
6	4.2	1.2	70
7	3.8	1	70
8	2.4	0.7	40
9	2.5	0.7	35
10	2.5	0.75	50
11	2.5	0.75	50
12	2.8	0.9	43
13	2.6	0.9	33
14	2.8	0.9	40
15	2.65	0.8	35
16	3.4	1	57.5
17	2.5	0.75	50
18	4.05	1.2	87.5
19	3.3	1	70
20	4.1	1.2	100

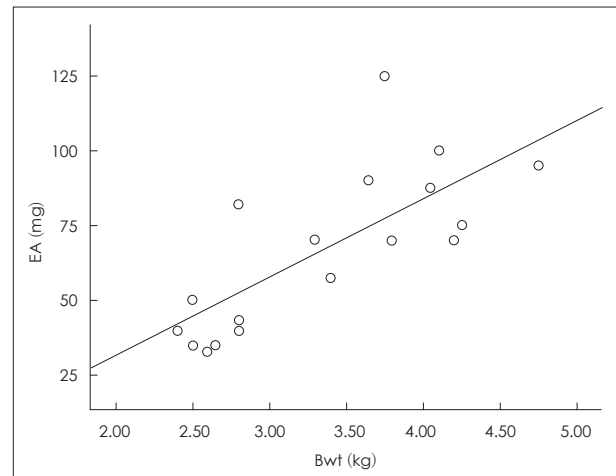


Fig. 2. Correlation between body weight and ethacrynic acid dose was analyzed. There was a significant positive correlation ($p<.001$, $r^2=.583$) between the ethacrynic acid dose and weight. EA: ethacrynic acid, Bwt: body weight.

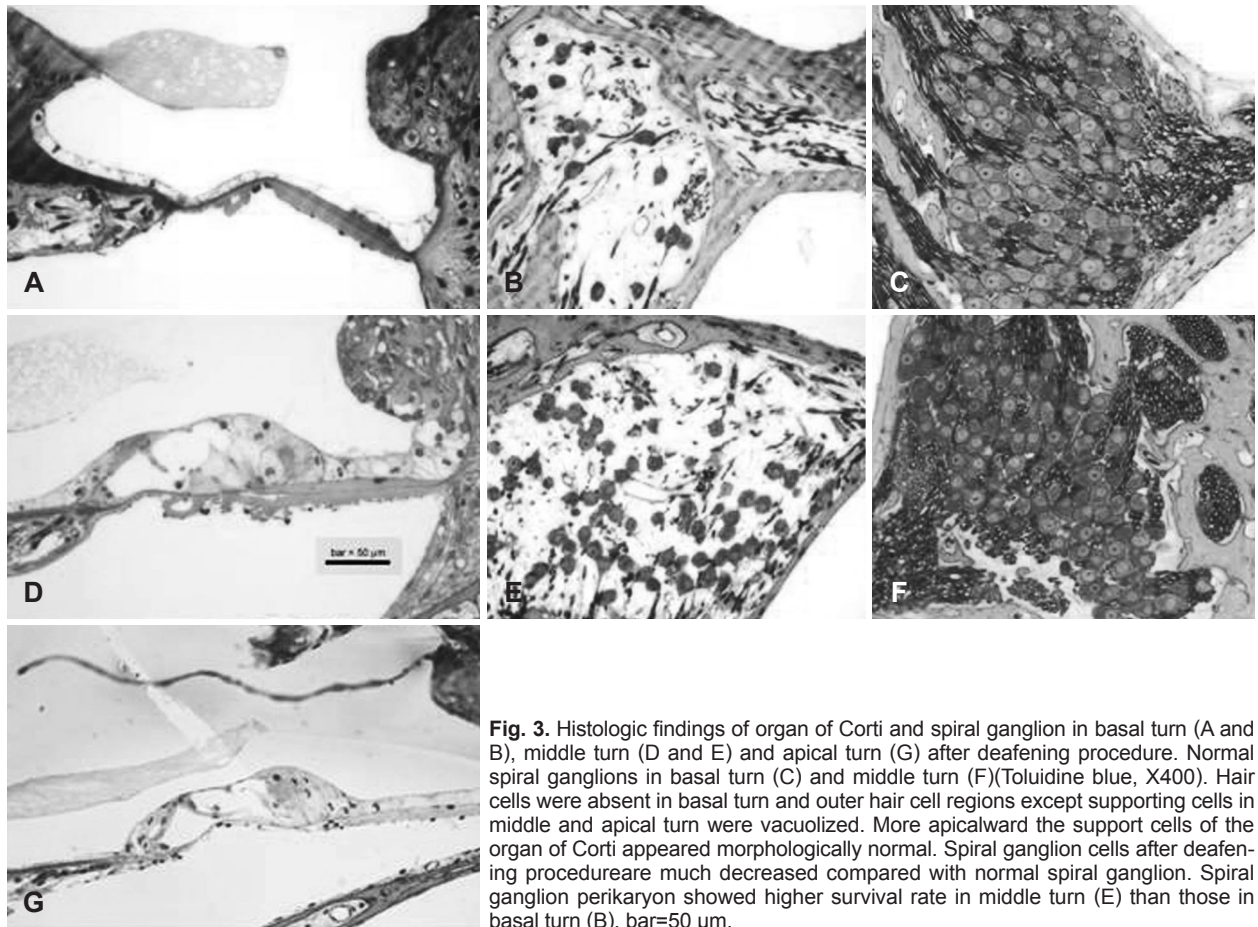


Fig. 3. Histologic findings of organ of Corti and spiral ganglion in basal turn (A and B), middle turn (D and E) and apical turn (G) after deafening procedure. Normal spiral ganglions in basal turn (C) and middle turn (F)(Toluidine blue, X400). Hair cells were absent in basal turn and outer hair cell regions except supporting cells in middle and apical turn were vacuolized. More apicalward the support cells of the organ of Corti appeared morphologically normal. Spiral ganglion cells after deafening procedure are much decreased compared with normal spiral ganglion. Spiral ganglion perikaryon showed higher survival rate in middle turn (E) than those in basal turn (B). bar=50 μ m.

또한 조직검사결과 보여주는 유모세포의 소실을 통해 두 약물이 유모세포에 작용하여 세포사를 유발함을 알 수 있었다.

KM은 aminoglycoside(AG) 계열의 항생제로서 이독성을 이용하여 난청연구에 많이 사용되어 왔다. Tran Ba Huy 등은 EA가 AG의 내림프내 농도를 외림프와 무관하게 증가시킨다고 보고하였다.⁷⁾ 이로 인해 유모세포의 침부면으로 노출되는 AG의 농도가 증가하게 되는데 이전 보고에 의하면 유모세포 내로 AG가 침투하는 경로가 바로 침부면이라고 알려져 있다.⁸⁾

이러한 AG의 이독성은 크게 미토콘드리아 내 단백질 합성의 교란, NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체의 과활성화, 그리고 free radical의 형성을 통해 발현되는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ AG는 세균감염시 세균내 리보솜을 파괴하여 항균작용을 나타내는데, 유모세포내 미토콘드리아의 리보솜이 세균내 리보솜과 유사성을 가지는데 리보솜 RNA의 1555번째 유전자에 AG가 결합하게 되어 유모세포내의 미토콘드리아내 단백질 합성과정을 붕괴시키게 된다.¹⁰⁾ 또한, AG는 NMDA 수용체의 spermine 결합 부위에 대신 결합함으로써 NMDA 수용체를 과활성화시키게 되어 난청을

유발하게 되고 이러한 수용체 과활성 정도와 난청의 정도는 거의 비례하는 것으로 보고된 바가 있다.¹¹⁾ 최근에 제시된 가설로 free radical에 의한 이독성이 제시되었다. AG가 철과 결합하여 산화성 혼합물을 형성하여 결과적으로 free radical을 생성하게 되는데, 이러한 free radical이 단백질, 지질 그리고 핵산을 산화시키면서 다양한 세포손상을 유발하게 된다.¹²⁾

EA는 일시적으로 endocochlear potential과 potassium 농도를 감소시키면서 가역적인 난청을 일으킨다. 이 두 가지 약제가 병용 투여될 경우, EA의 용량에 따라 유모세포는 급격하게 감소하며, 특히 EA가 KM 주입 후 4시간 이내에 투여될 경우 이러한 상호작용이 가장 활발하게 나타난다고 하였다.⁵⁾ 이와 같은 병용 투여에 의한 전농화에 대한 기전을 밝히기 위해 많은 연구가 진행되어 왔다. Orsula-kova와 Schacht¹³⁾은 *in vivo*에서 aminoglycoside 항생제가 미로내 투과성 장벽으로 파괴하여 EA의 침투를 촉진하여 약 3~5배정도 농도를 증가시킨다고 보고하였다. 최근의 연구에서는 EA가 AG와 같이 병합하여 투여하였을 때 HC 손상을 일으키는 기전은 mitochondria에 손상을 일으켜서

apoptosis를 유도하는 것으로 보고되고 있다. Ding 등¹⁴⁾은 chinchilla를 이용한 실험에서 GM/EA투여 4시간 후부터 succinate dehydrogenase의 활동도가 감소하고 mitochondria의 막전위도가 감소하며 cytochrome C가 세포질 내에서 관찰되고 caspase-9이 증가하고 caspase-8은 증가하지 않는 것으로 보아 mitochondria mediated apoptosis가 일어나는 것으로 생각하였다.

EA의 미토콘드리아에 대한 역할은 잘 알려지지 않았다. 하지만 Bowes와 Gupta¹⁵⁾는 EA가 mitochondria의 fission을 막아서 fusion을 유도하는 것으로 보고하였으며 이는 EA의 투여 후 30분 후부터 관찰되었다. EA는 또한 세포내 Glutathione(GSH) depletion을 유도하고 cysteine residue를 alkylation시키는 것도 알려져 있다.¹⁶⁾ GSH는 항산화제 펩타이드로 AG의 세포독성 작용을 방어하는 것으로 알려져 있는데, GSH의 결핍은 AG와 고리형 이노제의 독성 효과를 강화한다는 보고가 있다.¹⁷⁾ 이러한 GSH의 감소는 미토콘드리아내 reactive oxygen species(ROS)의 증가가 일어날 수 있음을 의미한다. 두 가지 약제에 의한 전농화의 복잡한 기전에 대해서는 앞으로도 지속적인 연구가 필요한 상태이지만 실험동물을 전농화하는 효과적인 방법 중의 하나라는 점은 이번 연구결과도 뒷받침하고 있다.

Xu 등¹⁾은 KM과 EA의 병용투여로 고양이를 전농화시키는 연구를 통해 EA의 용량과 고양이의 체중 간에는 음의 상관관계가 있다고 보고하였다. 하지만 이번 연구에서는 Xu 등의 보고와는 달리 체중에 따라 EA 용량이 증가하는 양의 상관관계를 보였다. Xu 등의 연구에서 사용된 고양이는 생후 1개월~7개월된 고양이들로 주령이 다양하고 체중의 범위로 0.5~2.9 kg으로 다양하였으며 실험에 사용된 샘플수가 7마리로 통계적인 중요성은 크지 않다고 볼 수 있다. 하지만 이번 연구는 비슷한 연령이면서 체중의 범위로 2.4~4.75 kg으로 Xu 등의 연구에 비해 상대적으로 큰 개체를 대상으로 한 결과라는 점에서 좀 더 의미를 가질 수 있을 것으로 생각된다.

고양이는 생후 2주경까지 청력이 발달하는 것으로 알려져 있는데,¹⁸⁾ Shepherd와 Martin¹⁹⁾은 청력발달에 따른 이독성과의 상관관계를 보고한 바가 있다. 생후 2일에서 16일까지 총 30마리의 고양이에게 KM과 EA의 단일주입으로 난청을 유발하였고 생후 26일째 tone-pip을 이용한 청성 뇌간유발반응검사를 시행한 결과, 생후 9일 이상 경과한 고양이의 경우 전농이 유발된 반면, 생후 2일에서 8일째 경과한 고양이의 경우 중증도의 고주파수 난청이 유발되었다. 또한 난청의 정도는 연령 및 체중과 양의 상관관계를 보였는데, 연령 및 체중이 증가할수록 난청이 저주파수대로 진행하

는 것을 알 수 있었다. 이번 연구의 경우, 청성뇌간유발반응검사의 경우 클릭음만 사용하였으나 Shepherd와 Martin¹⁹⁾의 연구 결과에서 알 수 있듯이 난청이 고주파대부터 시작되고 클릭음이 저주파수대도 반영하므로 클릭음을 이용하여 전농이 되었음을 확인할 수 있다.

Xu 등¹⁾은 조직학적 변화에 대해 대부분의 와우내 유모세포는 소실되고 기저부의 지지세포는 소실되나 침부의 지지세포는 항상 보존된다고 보고하였다. 우리 연구결과도 이와 비슷한 결과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 코티기관의 지지세포의 상태는 나선신경절 세포의 생존 정도와 상호연관성을 보인다고 알려져 있는데,²⁰⁾ 대체로 침부방향으로 갈수록 신경세포의 생존율이 증가하는 것이 보편적인 경향이다.

REFERENCES

- 1) Xu SA, Shepherd RK, Chen Y, Clark GM. Profound hearing loss in the cat following the single co-administration of kanamycin and ethacrynic acid. *Hear Res* 1993;70(2):205-15.
- 2) Cody AR, Robertson D. Variability of noise-induced damage in the guinea pig cochlea: electrophysiological and morphological correlates after strictly controlled exposures. *Hear Res* 1983;9(1):55-70.
- 3) Leake-Jones PA, O'Reilly BF, Vivion MC. Neomycin ototoxicity: ultrastructural surface pathology of the organ of Corti. *Scan Electron Microsc* 1980;(3):427-34.
- 4) Duckert LG. Morphological changes in the normal and neomycin-perfused guinea pig cochlea following chronic prosthetic implantation. *Laryngoscope* 1983;93(7):841-55.
- 5) West BA, Brummett RE, Himes DL. Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. Severe cochlear damage in guinea pigs. *Arch Otolaryngol* 1973;98(1):32-7.
- 6) Brummett RE, Bendrick T, Himes D. Comparative ototoxicity of bumetanide and furosemide when used in combination with kanamycin. *J Clin Pharmacol* 1981;21(11-12 Pt 2):628-36.
- 7) Tran Ba Huy P, Manuel C, Meulemans A, Sterkers O, Wassef M, Amiel C. Ethacrynic acid facilitates gentamicin entry into endolymph of the rat. *Hear Res* 1983;11(2):191-202.
- 8) Hiel H, Schamel A, Erre JP, Hayashida T, Dulon D, Aran JM. Cellular and subcellular localization of tritiated gentamicin in the guinea pig cochlea following combined treatment with ethacrynic acid. *Hear Res* 1992;57(2):157-65.
- 9) Strupp M, Arbusow V. Acute vestibulopathy. *Curr Opin Neurol* 2001;14(1):11-20.
- 10) Hutchin T, Cortopassi G. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(11):2517-20.
- 11) Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides--50 years on. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39(6):597-603.
- 12) Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118(5):674-7.
- 13) Orsulakova A, Schacht J. A biochemical mechanism of the ototoxic interaction between neomycin and ethacrynic acid. *Acta Otolaryngol* 1982;93(1-2):43-8.
- 14) Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid. *Hear Res* 2010;259(1-2):16-23.
- 15) Bowes T, Gupta RS. Novel mitochondrial extensions provide evidence for a link between microtubule-directed movement and mito-

- chondrial fission. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376(1):40-5.
- 16) Tew KD, O'Brien M, Laing NM, Shen H. Coordinate changes in expression of protective genes in drug-resistant cells. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:199-211.
- 17) Nishida I, Takumida M. Attenuation of aminoglycoside ototoxicity by glutathione. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1996;58(2):68-73.
- 18) Brugge JF, Javel E, Kitzes LM. Signs of functional maturation of peripheral auditory system in discharge patterns of neurons in antero-ventral cochlear nucleus of kitten. *J Neurophysiol* 1978;41(6):1557-9.
- 19) Shepherd RK, Martin RL. Onset of ototoxicity in the cat is related to onset of auditory function. *Hear Res* 1995;92(1-2):131-42.
- 20) Schuknecht HF, Watanuki K, Takahashi T, Belal AA Jr, Kimura RS, Jones DD, et al. Atrophy of the stria vascularis, a common cause for hearing loss. *Laryngoscope* 1974;84(10):1777-821.