

실험적으로 유도된 이독성 난청에서의 Ginkgo Extract 의 효과

경북대학교 의과대학 이비인후과학교실

이상훈 · 조영채 · 도현우 · 강현욱 · 조태환

=Abstract=

The Effects of Ginkgo Extract on the Experimentally Induced Ototoxicity in Guinea Pigs

Sang Heun Lee, M.D., Young Chae Cho, M.D., Hyun Woo Do, M.D.,
Hyun Wook Kang, M.D., Tae Hwan Cho, M.D.

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kyung Pook National University

This study was designed to investigate the effect of Ginkgo biloba extract on the kanamycin induced ototoxicity in inner ears of 22 guinea pigs. The animals were divide into 4 groups.

In ototoxic group, kanamycin was injected 400mg/kg per day for 7 to 10 days. In preventive treated group, kanamycin with same dose and Ginkgo biloba extract(50mg/kg) were simultaneously injected daily for same duration. In post treated toup, Ginkgo extract was treated for 15 days in kanamycin injected group. The Preyer's reflex and DP-OAE (distortion product otoacoustic emissions) were used for the monitoring of hearing changes. In the ototoxic group, the amplitude of DP-OAE was marked decreased or disappeared in all test frequencies or 4KHz only. The Preyer's reflex was disappeared in all ototoxic group. In the preventive treated group with Ginkgo extract, normal DP-OAE or slightly decreased DP-OAE in 4KHz was noticed. This finding was seemed to be similar to the post-treated group. From the above results, Ginkgo extract is suggested to have beneficial effects for the management of ototoxicity and sensorineural hearing loss.

KEY WORDS : *Ototoxicity, Ginkgo extract*

서 론

감각신경성 난청은 약 70%에서 와우내의 병변으로 발생된다고 알려져 있는데 그 원인은 복잡하여 소음, 약물중독, 두경부 손상, 감염 및 유전적 요인들에 의해 기인되나 아직도 원인불명이 대부분을 차지하고 있다¹⁾²⁾. 지금까지 감각신경성 난청에 관하여 기초적,

역학적 및 임상적 측면에서 꾸준히 연구되어 왔는데³⁾

난청의 본태는 다차원적 공간에서 여러 요인의 상호 연관성에 의하여 발생되며 특히 현대사회의 직업성 스트레스와 소음등에 의해 점점 빈도가 증가되는 바이나 아직도 그 치료방법에 있어서는 한계에 부딪혀 있는 실정이다.

최근 은행나무에서 추출된 생약제제인 Ginkgo

biloba extract⁸¹⁹⁾가 특별한 부작용이 없이 전신의 혈액순환 개선제로 알려져 임상에서 이용되고 있다¹⁰⁾¹¹⁾. 그 약리 작용은 명확히 밝혀지지 않았으나 지금까지 제시된 기전으로는 말초 혈액순환을 개선하여 신진대사를 원활히 하며 혈관 벽을 안정시키며 여러 노폐물과 유리기 산소(free radical oxygen)를 제거하여 혈액의 점성은 묽게 하며 혈관을 깨끗하게 하는 것들이다¹²⁾. 그러나 감각신경성 난청에서의 Ginkgo extract의 효과에 관한 연구는 아직도 미미하다¹³⁾¹⁴⁾.

동물에서의 감각신경성 난청을 유도하기 위해서는 여러 가지 방법이 있으나 주로 아미노글리코사이드계 항생제에 의하여 내이의 이독성을 유도하는 것이 가장 일반적으로 이용되고 그 결과는 형태학적, 청각학적, 전기생리학적 등 여러 방법으로 판정한다³⁾⁷⁾.

이음향방사 (OAE, otoacoustic emissions)는 와우의 청각기능을 타각적이고 비침습적으로 평가하는데 있어서 새로운 시도로서 이는 와우내의 미세기계 진동이 중이, 외이로 에너지가 투영되는 것으로 와우내의 외유모세포기능과 밀접한 관계가 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 이 중에서 특히 DP-OAE (Distortion product otoacoustic emissions)는 가장 주파수 특이적인 정보를 제공하여 향후 임상적 적용이 유망시 된다¹⁹⁾²⁰⁾.

본 연구에서는 종래의 감각신경성 난청 치료의 대체 요법으로서 Ginkgo extract의 사용 가능성을 동물 모델을 통하여 관찰하여 보고자 시도 되었는데 기니피크를 대상으로 카나마이신을 주사하여 실험적으로 이독성 난청을 유도한 후 Ginkgo extract 투여 전후의 결과를 DP-OAE를 이용하여 검색하였다.

재료 및 방법

체중 250-350gm 의 이개반사가 정상이고 건강이 양호하다고 인정되는 알비노 기니피크 22마리를 성의 구별 없이 사용하였다.

동물은 4군으로 나누어 제1군(4마리)은 생리 식염수를 주사한 대조군, 제2군(8마리)은 카나마이신을 7-10일간 매일 400mg/kg를 근육 주사한 난청군, 제3군(5마리)은 카나마이신 400mg/kg를 근육주사와 함께 Ginkgo biloba extract(Tebonin[®])50mg/kg를 복강내 동시 투여한 예방 치료군, 제4군(5마리)은

제2군과 같은 조건 후 매일 Ginkgo biloba extract를 50mg/kg 씩 15일간 복강내 투여 치료한 난청 치료군으로 나누었다(그림1)

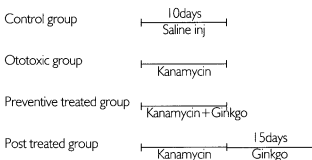


Fig 1. Schedule for experiment to evaluate the effect of Ginkgo extract

동물은 매일 이개반사를 검사하여 난청 여부를 예비 관찰하였으며 DP-OAE 검사는 Sodium Pentobarbital (Nembutal[®]) kg 당 40mg을 복강내 주입하여 마취를 시행한 후 방음실 내에서 Celesta 503 이음향분석기를 이용하여 DP-OAE와 Input Output function test를 측정 하였다(그림 2). 자극음의 두 주파수 (f1, f2)의 비율은 1.22로 고정하고 자극음의 크기는 60dB와 70dB SPL로 하였으며 주파수 범위는 500-8000Hz, 1/2 octave 간격으로 f1, f2의 산술평균을 변화시켰다.

검사는 카나마이신 투여 전후에 시행하여 각각을 서로 비교 검토 하였으며, Mann-Whitney법을 이용하여 검증하였다.

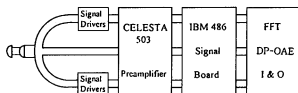


Fig 2. Block diagram of the DP-OAE measurement

성 적

1. 대조군에서의 소견

정상 대조군에서는 이개반사가 전부 양성이었으며 DP-gram도 그림3에서와 같이 정상 소견을 나타내어 전 주파수에서 noise level 이상으로 현저하게 DP-OAE가 출현 하였으며 그 크기는 15-20dB 이상이었다.

입출력 곡선에 DP-OAE의 출현 크기는 45-50dB SPL이었으며 이 소견은 모든 대조군에서 유사하였다.

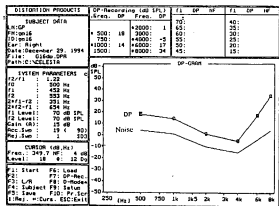


Fig 3. Typical DP-gram on control group. DP was prominent above the noise level in all frequencies.

2. 난청군에서의 소견

카나마이신 주사 후 4내지 5일 경에 이개반사의 변화와 함께 7-10일간 주사후에는 거의 이개반사의 소실과 함께 DP-OAE가 대조군에 비하여 전 주파수에서 소실 내지 큰 감소를 나타낸 것이 3마리(6귀), 4KHz에서만 선택적으로 DP-OAE가 큰 감소를 나타낸 것이 5마리(10귀)에서 관찰되었다(표1). DP-OAE는 전반적으로 대조군에 비해 의미있게 감소하였다(표2). 각각의 전형적인 예는 그림 4, 5와 같다.

3. 예방 치료군에서의 소견

Ginkgo extract로 예방 치료한 군에서는 전반적으로 난청군에 비해서 DP-OAE가 현저하게 출현하였는데 특히 4KHz, 6KHz와 8KHz에서 두드러졌다(표2). 이개반사가 양성이며 정상 DP-OAE를 나타낸 것이 2마리(4귀), 이개반사가 소실되고 4KHz에서 DP-OAE가 감소된 것이 4마리(6귀)에서 관찰되

었다(그림6).

4. 난청 치료군에서의 소견

카나마이신으로 난청을 유도 후 Ginkgo extract로 치료한 군에 있어서도 난청군에 비하여 전체적으로 DP-OAE가 높게 출현하였는데(표2), 이개반사 양성이며 정상 DP-OAE를 나타낸 것이 1마리(2귀), 이개반사가 소실되고 4KHz에서 DP-OAE의 감소를 나타낸 것이 4마리(7귀)로 이중 한쪽 귀는 중이 골포의 중이염 발생으로 제외시켰다(그림7).

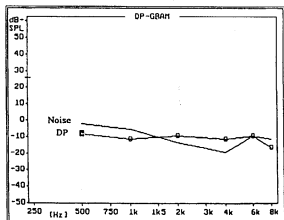


Fig 4. Typical DP-gram on ototoxic group.

DP was markedly decreased or disappeared in all frequencies.

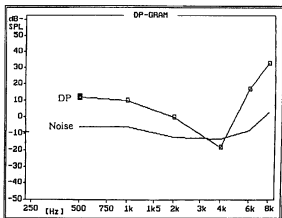


Fig 7. Typical DP-gram on post-treated group.

DP was slightly decreased in 4KHz

Table 1. The findings of Preyer's reflex and DP-OAE in each group.

Group	Type	Numbers(Ears)
Control	PR(+) ^{normal} DP-OAE	4(8)
Ototoxic*	PR(-)DP-OAE ↓↓	3(6)
	PR(-)DP-OAE ↓↓ 4(KHz)	5(10)
Preventive**	PR(+) ^{normal} DP-OAE ↓↓	2(4)
	PR(-)DP-OAE ↓↓ 4(KHz)	3(6)
Post treated***	PR(+) ^{normal} DP-OAE	1(2)
	PR(-)DP-OAE ↓ 4(KHz)	4(7)

* : kanamycin injection group

** : simultaneous injection group with kanamycin and Ginkgo

*** : Ginkgo treated group in kanamycin injection group

PR(+): Preyer's reflex positive

PR(-): Preyer's reflex negative

↓↓ : markedly decreased

↓ : slightly decreased

Table 2. The level of DP-OAE above noise in each frequency of each group

Group	DP-OAE(dB SPL)					
	0.5KHz	1KHz	2KHz	4KHz	6KHz	8KHz
Control	18.8±3.5	20±4.6	17.5±2.7	18.1±3.7	19.4±5	30.6±6.8
Ototoxic ^c	5.3±11.8	6.3±11	5.9±6.9	-5.9±10.4	5.9±4.6	10.9±8
Preventive treated ^d	13.5±3.4	13.5±4.7	8.5±4.7	5.6±4.9	13±2.6	19.5±6.4
Post treated ^d	19.4±3	16.7±3.5	13.9±3.3	1.7±7.9	13.9±7.4	26.1±7

1*2 P < 0.01 in all frequency

2*3 P < 0.01 in 4, 6 & 8KHz

2*4 P < 0.01 in 4, 6 & 8KHz

고 찰

은행나무 (Ginkgo biloba)는 현존하는 가장 오래

된 식물로서 그 은행잎은 전통 중국약전과 동의보감 등에서도 백과라는 이름으로 심장, 폐에 매우 유효한 것으로 알려져 있고¹²⁾ 최근 현대 약리학적 측면에서도 그 효능이 활발히 규명되어 그간 유럽과 국내에서 각종 뇌 및 혈관질환의 치료에 이용되고 있다.¹⁰⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾ Ginkgo extract는 수많은 화합물로 구성되어 있는데 주 성분은 flavonoid, diterpines(ginkgolides), sesquiterpenes(bilobalides)와 유기산등인데 이중 flavonoid가 약 50%를 차지하고 있고 주로 glycoside 형태로 존재 한다.⁸⁾⁹⁾ Ginkgo extract가 혈액순환계에 미치는 영향을 보면 말초 혈액순환을 개선시키며, 혈관 벽을 안정시키며, 여러 노폐물과 유리기 산소를 제거하며 혈액 점성을 묽게 하여 혈관을 깨끗하게 하는 것등이다.¹²⁾

이비인후과 영역에서 내이의 혈액순환체계의 이상과 관계가 있다고 알려진 돌발성 난청, 메니에르병, 노인성 난청, 소음성 난청등의 난치성 내이 질환에 Ginkgo extract의 사용 가능성을 연구한 몇몇 시도가 있었는데¹⁰⁾¹¹⁾ 그 결과를 보면 비교적 긍정적이 효과를 보이고 있고 최근에는 flavonoid 성분에 laser beam을 조사하여 더욱 활성화된 작용을 나타낸다는 보고도 있다.¹³⁾¹⁴⁾ 그러나 아직도 Ginkgo extract가 약리학적으로 충분히 규명되지 않아 임상에서 제한적이고 경험적으로 밖에 이용되지 않고 있으며 미세한 내이 구조에 대하여 작용기전에 관한 실험적 연구도 미미한 단계이다. 본 연구에 있어서 기니피크를 이용하여 카나마이신에 의한 이독성 난청을 유도한 후 이 난청군과 Ginkgo extract로 예방 치료군 및 난청 후 Ginkgo extract로 예방 치료군 및 난청 후 Ginkgo extract로 치료군과의 성적을 비교하여 보면 난청군에 비하여 음향성 이개반사와 DP-OAE가 현저하게 출현 하였으며 일부에서는 정상 소견을 나타낸것도 있었다. 이는 다른 연구자들의 임상 연구 결과¹⁰⁾¹¹⁾를 뒷받침해 준다고 할 수 있는데 소수 예이지만 그 중에서도 Ginkgo extract로 예방 치료한 군이 난청 치료한 군 보다 좀 더 양호한 결과를 나타내는 것으로 보아 Ginkgo extract는 진행된 신경성 난청에서 보다는 난청의 초기나 가역적 시기에서 더 현저한 효과를 보일 것으로 생각된다. 또한 난청과 연관성이 있는 이명에 대해서도 장기간 지속된 경우

가 아닌 경우나 이독성에 의한 초기 이명에서의 사용 가능성을 더욱 시사해준다고 하겠다. 이독성 난청은 소음이나 이독성 약물 사용 증가등으로 꾸준히 증가 추세에 있는데 이로 인한 고음성 난청과 이명등이 임상에서 문제가 되는데 특히 아미노글리코사이드계 항생제는 내이의 외유모세포와의 친화력이 높아서 내이 독성이 많이 관찰된다고 한다³¹⁾. 감각신경성 난청의 연구를 위해 동물에서 이독성 난청 모델이 많이 이용되는데 본 연구에서도 카나마이신을 7-10일간 근육 주사하여 이개반사 소실과 함께 4KHz에서의 선택적인 난청과 전주파수에서의 난청들이 출현되는 것을 이음향방사를 통하여 쉽게 확인 될 수 있었다. 동물에서 내이 독성에 의한 난청 여부를 모니터링하기 위한 청각학적 방법으로는 몇가지 방법이 있으나 최근에는 이음향방사가 새로운 시도로서 응용되고 있다³⁰⁾³⁹⁾. 이음향방사는 1978년 Kemp¹⁵⁾에 의해 처음으로 보고된 이후 와우의 청각기능을 타각적이고 비침습적으로 평가하는 것인데 이는 와우내의 미세 기계 진동이 중이, 외이로 에너지가 투영되는 것으로 와우내의 외유모세포 기능과 밀접한 관계가 있다. 이음향방사는 자발적 혹은 자극음에 의하여 생길수 있는데⁶⁰⁾ 이중 특히 DP-OAE는 유발이음향방사의 하나로서 두 주파수의 자극음 (primary) f1, f2를 동시에 주었을 때 DP(distortion product)를 생성하여 와우의 비선형적 특성을 나타낸다. 그중에서도 2f1-f2의 주파수에서 가장 뚜렷한 DP를 보이는데 주파수 특이성과 순음청력 역치와의 연관성이 높아 앞으로의 임상적인 적용이 기대되어 진다. 본 연구에 있어서도 DP-OAE를 이용하여 측정 하였는데 정상 대조군 모두에서 500-8000Hz 전 주파수를 통하여 소음치 이상으로 현저하게 DP-OAE가 출현 하였고 그 음압크기도 15내지 20dB 이상으로 안정되었다. 난청군과 치료군에서도 DP-OAE에 의해 청각 변화를 비교적 양호하게 구별 할 수 있었다. Kumagai 등⁷⁾은 와우 장해 동물에서 DP-OAE 변화를 와우의 조직상과 비교 검토한 바 지극히 높은 연관성을 보인다고 하였는데 본 연구에서도 이로 미루어 간접적으로 와우의 손상정도를 예측 할 수 있는 지표로 삼을 수 있겠다. 상기한 바와 같이 Ginkgo extract가 항후 이독성 난청과 감각신경성 난청에서의 예방 및 치료 가능성을 제시

해 주지만 아직도 Ginkgo biloba에 대한 약리학적, 생리학적 규명이 완전히 되지 않았고 Ginkgo extract를 이용하여 다양한 동물에서 여러 조건하의 변화를 형태학적, 면역조직학적 방법으로 추가 관찰한다면 더욱더 명확히 밝혀질 것으로 사료되는 바이다.

요 약

이독성 난청에서의 Ginkgo extract의 효과를 비교자 기니피 22마리를 대상으로 이음향방사를 측정하여 난청군과 치료군을 비교 검토한 바 성적을 요약하면 다음과 같다.

난청군에서의 DP-OAE는 대조군에 비해 전 주파수에서 감소 내지 소실을 보였으며 4KHz에서만 선택적으로 큰 감소를 나타내기도 있었다. Ginkgo extract로 예방 치료한 군에서는 난청군에 비해 DP-OAE가 현저하게 출현 하였으며 정상 DP-OAE 소견을 나타낸 것도 있었다. 난청 치료군에서도 난청군에 비해 전체적으로 DP-OAE가 높게 출현되고 있었다. 이상의 소견으로 보아 Ginkgo extract가 이독성 난청과 감각신경성 난청에서의 예방 및 치료 효과의 가능성을 제시해 준다고 생각되는 바이다.

References

- 1) Engstrom H, Kohonen A : Cochlear damage from ototoxic antibiotics. Acta Otolaryngol (Stockh). 1965 ; 59 : 173
- 2) Huizing EH, De Groot JCMJ : Human cochlear pathology in aminoglycoside ototoxicity-A review. Acta Otolaryngol Suppl(Stockh). 1987 ; 436 : 117-125
- 3) Lim DJ : Effects of noise and ototoxic drugs at the cellular level in the cochlea : A review. Am J Otolaryngol. 1986 ; 7 : 73-99
- 4) Lim DJ : Ultrastructural cochlear changes following acoustic hyperstimulation and ototoxicity. Ann Otol. 1976 ; 85 : 740

- 5) Ward PH, Fernandez C : The ototoxicity of kanamycin in guinea pigs. *Ann Otol.* 1961 ; 70 : 132-135
- 6) Tucci DL, Rubel EW : Physiologic Status of regenerated hair cells in the avian inner ear following aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990 ; 103 : 443-450
- 7) Kumagai S, Ohyama K, Inamura N, Takasaka T : Distortion product otoacoustic emissions in the guinea pigs treated with kanamycin sulfate. *Audiology Japan* 1993 ; 36 : 746-750
- 8) Sam Sik Kang, Ju Sun Kim, Wie-Jong Kwak, Ki Hyup Kim : 은행잎의 Flavonoid 성분에 관한 연구. *Kor J Pharmacogn.* 1990 ; 21(2) : 11-120
- 9) Sam Sik Kang, Ju Sun Kim, Wie-Jong Kwak, Ki Hyup Kim : Structures of two acylated flavonol glucorramnosides from Ginkgo biloba leaves. *Arch Pharm Res.* 1990 ; 13(2) : 207-210
- 10) Haguenaer JP, Cantenot F, Koskas H, Pierart H : Treatment of disturbed equilibrium with ginkgo biloba extract. Multicenter double-blind study versus placebo. *Presse Med.* 1986 ; 15 : 1569 - 1572
- 11) Meyer B : Tinnitus : a multicenter epidemiological and therapeutic study. *Ann Oto-Laryng (Paris).* 1986 ; 103 : 185-188
- 12) Kleijnen J, Knipschild : Ginkgo biloba. *Lancet.* 1992 ; 340 : 1136-1139
- 13) Witt U : Low-power laser and ginkgo extract-photodynamic therapy against disorders of inner ear. Abstract on the proceedings of the 3rd world congress-international society for low power laser applications in medicine. Bologna, Italy. 1992
- 14) Partheniadis-Stumpf M, Maurer J, Mann W : Soft laser therapy in combination with Tebonin IV in tinnitus. *Laryngorhinootology.* 1993 ; 72(1) : 28-31
- 15) Kemp DT : Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am.* 1978 ; 64 : 1386-1391
- 16) Kemp DT, Bray P, Alexander L, Brown AM : Acoustic emission cochleography-practical aspects. *Scand Audiol.* 1986 ; 25 : 71-95
- 17) Kim DO : Cochlear mechanics implications of electrophysiological and acoustical observations. *Hear Res.* 1980 ; 2 : 297-317
- 18) Hotz MA, Harris FP, Probst R : Otoacoustic emission : An approach for monitoring aminoglycoside-induced ototoxicity. *Laryngo.* 1994 ; 104 : 1130-1134
- 19) Brown AM, McDowell B, Forge A : Acoustic distortion products can be used to monitor the effects of chronic gentamycin treatment. *Hear Res.* 1989 ; 42 : 143-156
- 20) Wilson JP : Evidence for cochlear origin for acoustic re-emission, threshold fine-structure and total tinnitus. *Hear Res.* 1989 ; 42 : 143-156
- 21) Martin GK, Ohlms LA, Franklin DJ, Harris FF, Lousbury-Martin BL : Distortion-Product emissions in humans, III-influence of hearing pathology. *AMM Otol Rhinol Larygol Suppl.* 1990 ; 99 : 30-42
- 22) Smurzynski, Leonard G, Kim DO, et al : Distortion product otoacoustic emissions in normal and impaired adult ears. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990 ; 116 : 1309-1316
- 23) Leonard G, Smurzynski J, Jung, et al : Evaluation of distortion product emission as a basis for the objective clinical assessment of cochlear function. *Adv Audiol.* 1990 ; 7 : 139-148
- 24) Ohlms LA, Loonsbury-Martin BL, Martin GK : Acoustic Distortion Products : Separation of sensory from neural dysfunction in sensorineural hearing loss in human beings and rabbits. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991 ; 104 : 159-174