

와우핵에서 Patch-Clamp Technique를 이용한 전기생리학적 연구

가톨릭대학교 의과대학 이비인후과교실

전 범 조

Electrical Cellular Physiology in Cochlear Nucleus Using Patch-Clamp Techniques

Beom-Cho Jun, MD

Department of Otolaryngology-HNS, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

현재 전기생리학적 연구에 널리 사용되는 patch-clamp technique의 기원은 동물 생리연구에 전기적 현상을 응용하기 시작한 19세기로 거슬러 올라가 전기적 자극에 대한 개구리의 근육 반응 연구에서 찾을 수 있다. 그 후 1952년 Hodgkin과 Huxley¹⁾가 유리전극을 이용한 오징어의 축색돌기 세포막 전위에 대한 연구로 이온채널에 대한 기본적인 지식을 넓힐 수 있게 되었으며 이 공로로 1963년 노벨상을 받게 된다. Graham과 Gerald²⁾ 등은 좀 더 세밀한 2~5 μm 직경의 유리전극을 만들어 세포막을 뚫고 세포 내막의 전위를 측정하는데 성공했다. 측정 기법의 계속된 발달로 전압을 일정하게 고정시키고 전류의 변화를 측정하는 Voltage clamp 방법도 다양화 되면서 Neher와 Sakmann³⁾은 매우 세포막과 유리전극 사이의 빈틈없는 밀폐를 통해 신호잡음 비를 줄이고 single ion channel의 연구의 기초를 마련하여 patch clamp를 이용한 전기생리학적 연구에서 두 번째 노벨상이 나오는 계기가 된다. 현재 많은 연구자들에 의해 개발된 다양한 patch clamp 기법과 연관된 분자생물학적 연구로 이온채널 외에도 다양한 세포대사의 기전을 밝히는데 이용되고 있다.

기본 원리 및 용어

전압(Voltage), 전류(Current) 및 저항(Resistance)

전기 생리학적 활동성은 전하를 띤 입자들의 분리와 이동에 의하며 여기에 관련된 주된 양이온은 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 등이다. 전하를 띤 입자들은 지질로 구성된 세포막에 의해

세포 내외로 구분되어있고 농도 차와 전기적 특성에 따라 각각의 이온 채널을 통해 이동하게 된다.

이와 같은 전하를 띤 입자의 흐름을 전류(current, I)라고 하며 단위는 amperes(A)이다. 이 전류를 유도하는 힘을 전압(voltage, V)이라고 하고 단위는 volts이다. 대부분의 전하는 이온채널을 통해 이동하는데, 쉽고 어려운 정도를 저항(Resistance, R)이라고 하며 단위는 ohms(Ω)이다. 잘 알려진 Ohm의 법칙에 따라 다음과 같이 표시된다.

$$V=IR, I=V/R$$

이 식에 따르면 voltage clamp에서는 전압을 일정하게 하였을 때 해당 전압에 대한 전류를 구할 수 있으며, 저항(이온 채널의 개폐, 세포막의 저항)에 따라 달라질 수 있다. 반대로 current clamp에서도 전류에 따른 전압의 양을 측정할 수 있다.

세포 외향성 전류(outward current)는 양전하(positive charge)가 세포막 외로 이동하는 것을 말하며 세포 내향성 전류(inward current)는 양전하가 세포 내로 이동하는 것을 이야기 한다.

저항값과 관련되어 patch clamp technique에서 세포 외핵에 위치하였던 유리전극이(Fig. 1A) 세포막에 접근하면 유리전극과 기준전극(reference electrode) 사이에 전류가 감소하여 저항이 증가하고(Fig. 1B), 유리전극에 음압을 주어 세포와 밀폐되면 gigaohm sealing 상태가 된다(Fig. 1C).

이와 같은 고저항의 밀폐는 이온 전류의 기록에 매우 중요하며 작은 전류량으로도 세포막전압의 변화를 측정할 수

있고 신호 잡음의 비율을 적절하게 조절할 수 있다. 이 상태가 유리전극이 세포막에 부착된(patch) 상태로 single ion channel 측정이 가능하며 여기에 좀 더 음압을 주어 유리전극이 세포막 내로 접근하면 세포막 전체의 전압을 유리전극이 반영할 수 있는 whole cell patch clamping 상태가 된다.

전도(Conductance, G)

$$G=1/R, G=I/V$$

저항의 역수로 단위는 siemens(G)이고 이온 채널의 생리학적 특성을 잘 반영한다. (I/V) curve의 기울기에 해당하며 전압변화에 따른 전류 흐름에 따라 값이 달라진다.

정전용량(Capacitance, C)

세포막에 의해 내외로 분리된 전하량을 나타내는 것으로 farads(F)가 단위이다. 세포 내막에는 주로 음전하, 세포 외막에는 양전하가 결집되며 세포막을 따라 일정하게 배열되면 세포 크기에 따라 값이 커지므로 세포의 크기를 간접적으로 알 수 있다.⁴⁾

$$Q=EmC$$

Q : charge stored

Em : potential difference across the membrane

C : membrane capacitance

저항기(Resistor)와 축전기(Capacitor)

세포막은 전기회로에서의 축전지의 역할을 하며 전압이 RC 회로에 주어지면 지수 곡선으로 증가한다(Fig. 2).

$$E(t)=E(1-e^{-t/\tau})$$

$$\tau=RC$$

τ (Tau)는 시간상수로 저항과 축전량에 따라 증가하게 된다. 최대 축전값의 63%에 도달하는데 걸리는 시간에 해당한다.

유리전극을 이용한 세포 전기생리 기록

패치 클램프의 전기 회로도를 단순화하면 다음과 같다(Fig. 3).

세포 내 기록을 위해 사용되는 유리전극은 세포 내액과 접하고 기준 전극은 수조에 있어 세포막의 전압을 간접적으로 측정할 수 있다. 유리전극도 저항기와 축전기의 성질을 가지며 다음과 같은 사항을 고려하여야 한다.

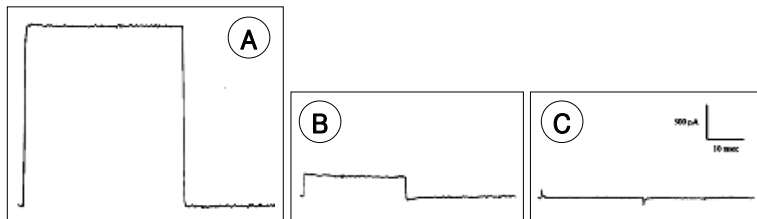


Fig. 1. Voltage clamp recording showing in current/resistance during the formation of a gigaseal on an isolated cell. When the pipette tip is lowered into the external recording solution (A). Contact with the cell partially occludes the pipette tip, with a resultant decrease in current (B) application of negative pressure to the pipette tip results in the formation of gigaseal (C) (from Journal of Veterinary Cardiology 2007;9:25-37).

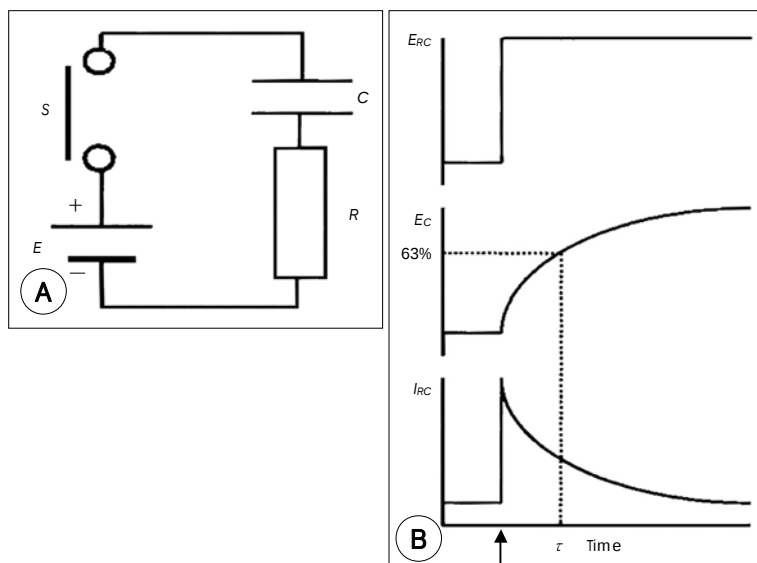


Fig. 2. Circuit to demonstrate the behavior of RC couples, such as a plasma membrane and a patch pipette (A) and The effect of a voltage change on an RC circuit (B) (from Molleman A. Patch Clamping, an Introductory guide to patch clamp electrophysiology. John Wiley & Son;2002. p.21-2).

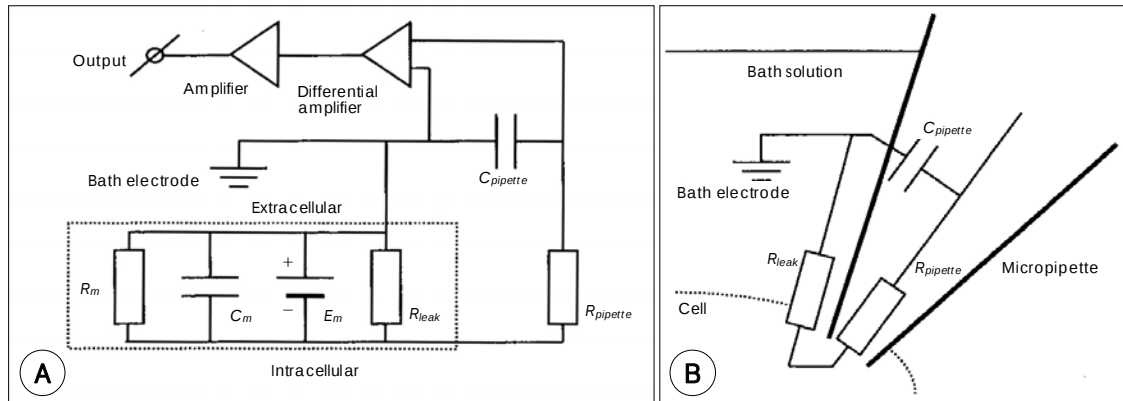


Fig. 3. Equivalent circuit for an intracellular recording configuration (A) and cell-pipette system (B) (from Molleman A. Patch Clamping, an Introductory guide to patch clamp electrophysiology. John Wiley & Son;2002. p.23-6).

유리전극의 저항(Pipette resistance)

세포막의 손상을 줄이기 위해서는 예리한 유리전극이 필요하며 이를 통해 유리전극의 저항(pipette resistance)을 증가시킬 수 있다. 예리한 침부는 세포막이 아닌 유리전극으로 인한 전기전도를 억제하고 세포 내액이 불필요하게 유리전극 내로 이동하는 것을 막을 수 있다(15~150 MΩ),

유리전극의 정전용량(Pipette capacitance)

유리전극도 절연체로서 세포막과 같이 축전기 역할을 하게 되며 실제로 활동전압과 같은 빠른 세포막전압의 변화에 영향을 미칠 수 있으므로 적절한 보상조절이 필요하다.

누출 저항(Leak resistance)

유리전극을 이용하여 세포막에 접근시 세포막의 틈이 벌어지면 세포 내액과 기준 전극 사이에 작은 전기회로가 생기게 되고 세포막전압을 음의 상태로 유지하기 어려워 세포는 곧 사멸하게 된다. 따라서 전극에 의한 세포막의 손상을 최소화하여 누출저항을 최대도 유지하는 것이 중요하다.

전류주입(Current injection)

전류 주입을 통해 세포막의 저항값과 축전값을 알 수 있다.

$$R_m = E/I - R_{pipette}$$

$$C = \tau/R$$

막전압고정법(Voltage clamp)과 막전류고정법(Current clamp)

이온 채널의 활동성은 세포막을 통과하는 이온의 흐름에 기인한 세포막전압의 변화로 알 수 있다. 이와 같이 이온 채널의 변화를 연구하는 데 있어 기본적인 원리로는 이온의 흐름은 유도전압(driving force)의 변화에 따라 달라지고 많은 이온들이 세포막전압의 변화에 따른 출입기전(gating

mechanism)에 따라 반응하며 이온채널을 통과하며 세포질 내 이온의 종류에 따라 이온채널이 차단될 수 있다.

따라서 세포막전압을 일정하게 조정하며 세포 내외로의 이온 흐름을 측정하는 기법이 개발되었고 이것을 막전압고정법(voltage clamp)이라고 하며, 실험자가 설정한 고정전압(holding potential)을 유지하기 위해 실제 전기회로상 측정된 전압과 고정 전압 사이에 전류조절을 통한 지속적인 피드백이 이루어진다.

이와 달리 막전류고정법(current clamp)은 일정한 전류를 이용하여 전압의 변화를 측정하는 것으로 피드백이 필요하지 않고 다음과 같은 경우에 사용한다. Whole cell configuration시 전류를 주지 않은 ($I=0$) 상태에서 세포막 전압을 측정할 수 있다. 또한 세포의 활동전압의 형태 파악을 통해 세포 종류를 구분하는데 도움이 된다.

다양한 형태의 Patch clamp 기법

세포에 유리전극이 부착된 상태에서 다양한 방식으로 접근하여 세포와 연결된 상태 혹은 분리된 상태에서 세포막 일부의 전기적 특성을 연구할 수 있다(Fig. 4).

Cell attached patch mode

Whole cell mode

Out side-out and inside-out patch configuration

Perforated patch clamp

패치 클램프 실험에 필요한 장비(Fig. 5)

- 1) Vibration-free air table and Faraday cage.
- 2) Mechanics and optics
- 3) Bath and superfusion system
- 4) Micromanipulators
- 5) Pipette puller
- 6) Microtome

- 7) Patch clamp amplifier
- 8) Video monitor system
- 9) Recording and analysis software

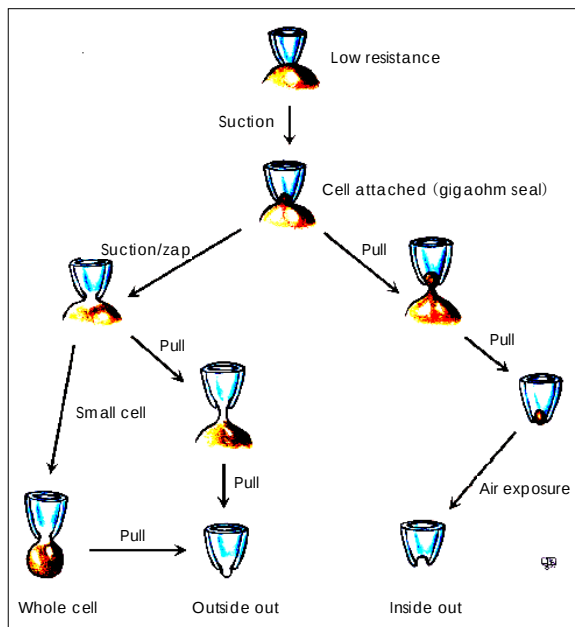


Fig. 4. Diagram showing various configurations of the patch clamp technique and how they are obtained (from Journal of Pflügers Arch 1981; 391:85-100).

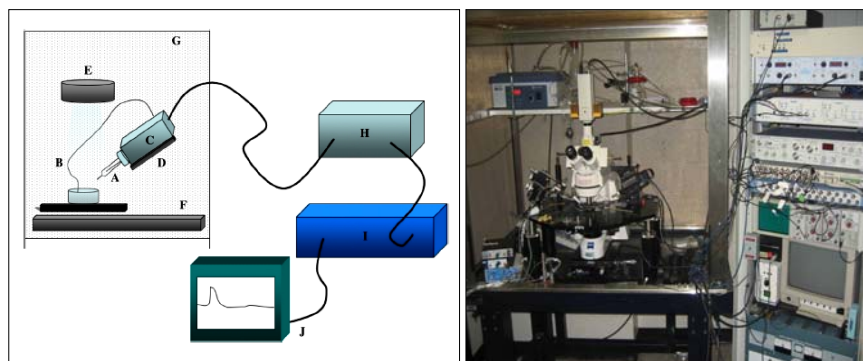
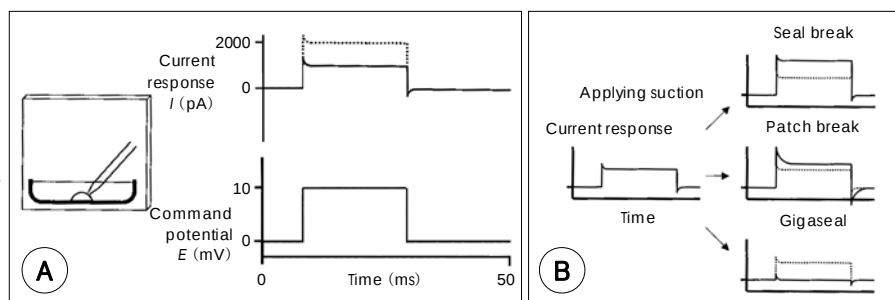


Fig. 5. Schematic representation of the vital components of a patch clamp experimental set up. The patch pipette with internal recording electrode (A) and reference electrode (B) are connected to the headstage, which is mounted on a micromanipulator (D). Isolated cells are visualized with an inverted light microscope (E). The microscope, micromanipulators, and headstage are placed on a air table (F) to isolate these components from vibrations that may interfere with gigaseal formation, and placed within a Faraday cage (G) to shield the setup from ambient electrical noise. The acquired analog signal from the headstage is passed to an analog to digital converter (H), where the signal is digitized and sent to a computer (I) for data analysis. An oscilloscope (J) is used for monitoring experiments and for data display (from Journal of Veterinary Cardiology 2007;9:25-37).

Fig. 6. Current response to a block pulse with the patch pipette nearing touching the cell (A) and possible outcomes of an attempt at gigaseal formation (B) (from Mollema A. Patch Clamping, an Introductory guide to patch clamp electrophysiology. John Wiley & Son; 2002. p.102-3).



패치 클램프의 기본 과정

각종 용액의 준비

Intracellular solution-유리전극의 내부를 채우는 용액으로 세포 내 접근을 하는 whole cell configuration 세포 내 이온구성과 같도록 하기 위해 일반적으로 K^+ 농도가 높으며, 실험 목적에 따라 voltage-sensitive K^+ channel을 통한 outward current를 효과적으로 block하기 위해 K^+ 을 Cs^+ 으로 대체해서 사용하기도 한다.

Extracellular solution-세포 외액의 조성 and 같게 하여 순환하는 수조용액으로 사용된다.

이와 같은 용액의 조성은 실험자 및 실험 방법에 따라 조금씩 다르며 이온 조성 외에도 용액의 산도(Ph)와 삼투압 농도(osmolality), 산소농도 및 용액의 온도가 실험결과에 영향을 미칠 수 있다.

조직 절편의 준비

가능한 빠른 시간에 적절한 온도와 산소가 충분히 포화된 세포 외액에서 해부하고 절편기를 이용하여 조직을 획득하여 산소가 포화된 용액에 저장해둔다.

현미경과 전기장치를 준비하고 산소가 함유되어 있으며

일정 온도가 유지된 인공 세포 외액을 순환시키고 절편조직을 현미경하로 이동시킨다. 조직을 고정시키고 현미경하에서 실험할 부위를 찾는다.

세포 내액을 유리전극에 넣고 유리전극을 미세작동기(micromanipulator)에 고정시킨 후 모니터를 보면서 실험할 세포로 접근한다.

증폭기(amplifier)를 통해 5~10 mV, 30 ms의 전압을 주고 이에 대한 전류의 반응을 통해 세포로의 접근과 밀폐의 과정을 알 수 있다.

세포에 접근할 수록 실험 전압에 대한 전류의 반응이 적어지다가 완전밀폐 상태가 되면 그래프가 편평하게 되고 저항이 최대가 되는 giga ohm sealing 상태에 도달한다(Fig. 6).

이 상태에서 유리전극의 전압을 세포 내 전압값에 유지시키고 유리전극에 약간의 부드러운 음압을 주어 세포막 내로 전극을 위치시킨다. 전류파형을 통해 전극의 잘 위치했는지 알 수 있다.

기록을 위한 질 향상을 위해 다음 사항을 검토하는 것이 중요하다.

- 1) 유리전극의 세포와의 밀폐시 저항은 1 gigaohm 이상이 되어야 한다.
- 2) 세포 내로 접근(whole-cell configuration)하면 패치에 의한 저항(R_{patch})은 R_{access} 로 바뀌게 되고 $R_{pipette}$ 과 R_{access} 의 합인 series resistance(R_{series})는 20 M Ω 보다 적은 상태로 유지되어야 한다. 만일 증가시 유리전극의 재밀폐 가능성을 고려하여야 한다.
- 3) 높은 조성의 K^+ 을 지닌 정상 세포 내액을 유리 전극에 사용시 세포막 전압은 -50 mV보다 음의 상태를 유지해야 한다.
- 4) 세포의 정전용량과 저항은 안정적으로 유지되어야 한다.

이온 채널에 대한 연구법

모든 세포에는 다양한 이온채널이 존재하므로 동일한 이온 채널만을 실험하는데 어려움이 있으며 이온채널을 구분하기 위해 다음과 같은 방법이 주로 사용된다.

- 1) Shape of the current response - 고정전압에 반응하는 두 가지 이상의 다른 전류를 그래프 파형분석을 통해 가감하여 분석한다.
- 2) Drug - 기존에 알려진 이온채널을 차단하는 약물을 이용하여 측정한다.
- 3) Manipulation of ion concentration - 실험에 사용하는 세포 내외액의 이온농도를 달리하여 이온 특이적 채널이 존재하는지 확인한다.

와우핵의 구조 및 기능

청각신경은 공간, 시간, 주파수 별 소리의 특징을 암호화하고 해독할 수 있으므로 잡음환경에서도 생체학적으로 의미 있는 신호를 추출할 수 있다. 이를 위해 하나의 신경핵은 인접한 신경핵 혹은 떨어진 핵의 수천 가지 신경원과 연결되어 있으며 신경전달물질을 통해 주변 신경원과 시냅스를 이루게 된다.⁵⁾

청각핵은 1) 와우에서의 주파수 특이적 배열이 와우핵에서도 지속되고, 2) 광범위한 청각신경의 분산이 하나의 핵으로부터 이루어지며,⁶⁾ 3) 구조적, 기능적 다양성이 시냅스 후 신경에 존재하며,⁷⁾ 4) 다양한 형태의 억제작용을 통해 일차로 흥분된 신경을 제한, 조정, 정제하는 기능이 있고,⁸⁾ 5) 하향성 신경을 통해 상위 구조로부터 피드백을 받는다.⁹⁾

와우핵으로 들어온 청각신경은 다시 상행부와 하행부로 나뉘게 되고 주파수 특이적으로 같은 반응을 보이는 영역을 지도화할 수 있다.¹⁰⁾

하행부의 신경원은 배측 와우핵의 수상돌기와 신경세포에 시냅스하게 되며 다양한 청각정보는 와우핵에서 여러 연수의 청각센터로 분산된 후 다시 하구(inferior colliculus)로 모아지게 된다. 와우핵을 구성하는 세포는 기능학적으로 시간적 반응양상, 주파수 특이적, 반응의 규칙성에 따라 나눌 수 있으며, 형태학적으로는 fusiform cell(pyramidal cell)이 주된 세포로¹¹⁾ 독립적으로 흥분 혹은 억제의 자극을 받으며 흥분성 자극은 8번 뇌신경과의 시냅스와 granule cell의 pararell fiber를 통해 받으며¹²⁾ 억제성 자극은 stellate, vertical, Golgi, cartwheel cell로부터 받는다.¹³⁾

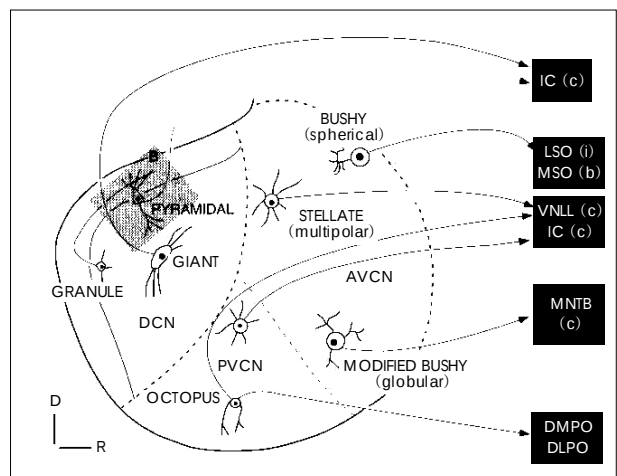


Fig. 7. Some projections of cochlear nucleus neurons that may contribute to parallel processing in the superior olivary complex, lateral lemniscal nuclei, and inferior colliculus (from Winer JA, Schreiner CE. The Inferior Colliculus Springer:2004. p.14).

이들 세포와의 연결을 통해 시간적, 주파수 특이적으로 복잡한 청각신호의 입력을 정제하여 상위 중추 청각핵으로 전달하는 기능을 한다(Fig. 7).

전복측 와우핵(AVCN)에는 배측 청각핵(DCN)과 다른 형태의 신경세포인 bushy cell이 있으며 상행 청각신경 말단이 이 세포체에 연결하게 되는데 컵 모양의 특이적 시냅스 말단은 endbulb of Held라고 부른다.¹⁴⁾ 이 신경세포는 자극의 초기에 발생과 관련하여(onset-related) 반응하며 배측 와우핵(DCN)과 달리 주파수 특이적 배열은 흔하지 않다. 또한 와우핵 내의 국소적 회로를 통해 신호전달을 보다 정제할 수 있어 원치 않는 불필요한 신호를 제거하여 신호잡음비를 향상할 수 있다.¹³⁾

와우핵 신경세포의 Intrinsic firing pattern

Simple regular spiking pattern (Fig. 8A)

많은 신경원의 흔한 형태로 막전류조정법에서 전류의 양을 증가시킬수록 활동전압간의 발생빈도가 늘어나 간격이 좁아지나 간격의 거리가 일정하게 유지되므로 다른 신경원에서 보여지는 활동전압의 적응이나 완서화 현상을 볼 수 없고 탈분극 전의 세포막전압에도 영향을 받지 않는다. 다른 신경원에서는 +40 mV에서 활동전압의 빈도수가 최고가 되지만 이 신경세포는 +10 mV에서 이미 최대치에 도달한다. 주로 복측 와우핵의 multipolar cell인 Stellate cell에서 관찰되며,¹⁵⁾ 청신경으로부터 작고 많은 버튼 형태의 시냅스를 받는다. 이 같은 형태의 세포는 언어지각이나 국지화하는 세밀한 시간적 정보를 전달하기보다는 주로 소리의 강도에 영향을 받는다.¹⁶⁾

One or two action potential (Fig. 8B)

탈분극 초기 바로 나타나는 하나 혹은 둘의 활동 전압을 보이며 초기의 활동전압 발생 후 즉시 세포막전압은 안정기 전압으로 복귀하며¹⁷⁾ 세포막의 전도성(conductance)이 높다. 주로 low voltage-activated potassium conductance에 기인한다. 활동전압은 앞서 설명한 Stellate cell보다 폭이 넓으며 때로 아주 짧을 수도 있다. 주로 소리자극 시작에만 관련하여 반응하며 입력된 자극의 강도에 의존하기도 한다. 이와 같은 신경세포는 주로 자극의 정밀한 시간적 분석을 가능하게 한다.¹⁸⁾

Regular spiking pattern with variation (Fig. 8C)

Fusiform cell(pyramidal cell)에서 나타나며 탈분극 전의 세포막전압에 영향을 받는 형태로 탈분극 전의 전압이

안정기전압보다 좀 더 과분극된 상태일 경우 첫 번째 혹은 두 번째 활동전압이 영향을 받아 첫 번째 활동전압이 일어나는 잠복기가 매우 길어지거나 매우 짧게 되기도 한다.¹⁹⁾

Complex spike pattern (Fig. 8D)

배측 와우핵의 cartwheel cell에 해당하며 활동전압의 간격은 전류의 양이 증가할수록 좁아지나 하나의 활동전압은 두 가지 이상의 첨단이 보이는 폭발형(burst) 형태를 보이며 비교적 활동전압 사이의 간격은 길게 유지된다. 복합형태의 원인은 칼슘 채널과 관련 있다고 알려져 있다.²⁰⁾

이와 같이 다양한 형태는 이온 채널의 다른 구성 정도, 밀도, 분포의 특성을 보여주며 세포 내 막전압과 이에 따른 이온의 전도와도 밀접한 관계가 있다.

중추성 이명과 배측 와우핵의 관계

청신경 회로와 관련한 이명의 다양한 발생기전이 연구되어 왔고 주로 와우의 손상, 소음에 의한 난청, cisplatin 혹은 salicylate 처치 등이 청각과 관련하여 일시적 이명을 가져오는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ 대부분의 와우의 기능 부전이 이명의 시작과 관련 있다고 알려져 있으나 지속적으로 이명이 유지되는 기전은 잘 알려져 있지 않다. 신경 전달물질의 길항제인 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist를 salicylate나 소음폭로 전에 주입하여 흥분독성을 억제하면 이명발생을 막을 수 있다는 점과 증가된 신경학적 활동성과 이명이 관련되어 있다고 알려져 있는데 소음자극과 salicylate 주입 후에 청신경의 자발활

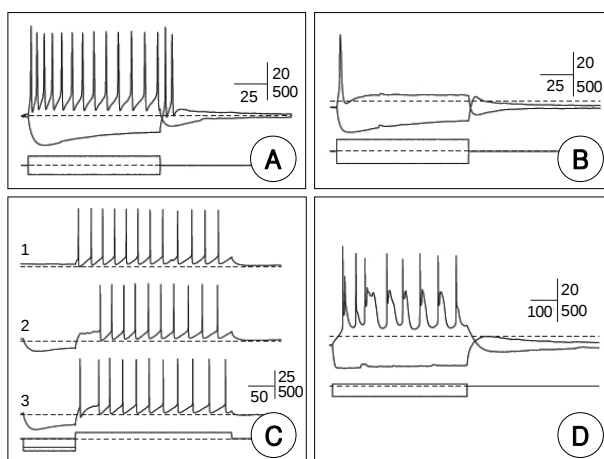


Fig. 8. Example recording from cells in the cochlear nucleus with different intrinsic firing patterns. A : Regular firing pattern found in Stellate-multipolar cells of the ventral cochlear nucleus. B : Phasic firing pattern found in bushy cells. C : Three different voltage-dependent discharge patterns of dorsal cochlear nucleus (DCN) pyramidal cell. D : Complex spiking pattern seen in cartwheel cells of the DCN (from Manis PB. Biophysical specializations of neurons that encode timing. The Senses, Academic Press 2008:3:568).

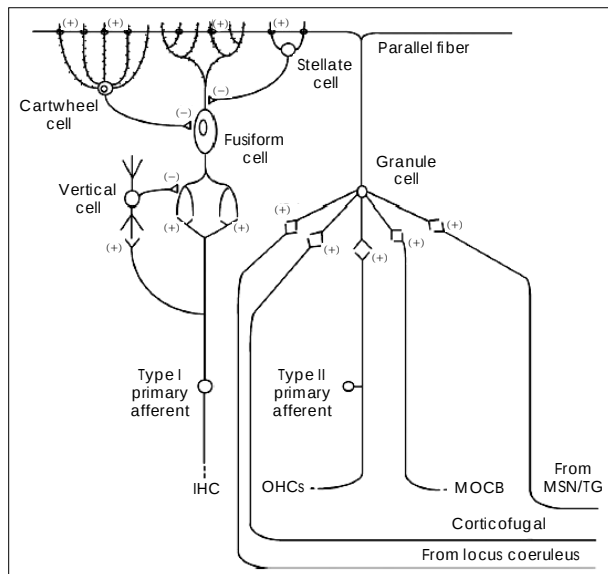


Fig. 9. Circuit diagram showing connections among the major cell types of the DCN that could underlie the development of hyperactivity in the DCN following damage to cochlear OHCs (from Kaltenbach JA. *Hearing Research* 2005;206:200-26).

동(spontaneous activity)은 오히려 감소되었다는 점, 와우제거와 청신경절단도 이명을 완화시킬 수 없다는 사실은 이명의 발생과 유지와 관련하여 중추신경계의 역할을 주목하게 만들었다.^{22,23)}

배측 와우핵은 청신경과 체신경 및 감정적 정보가 모두 입력되므로,²⁴⁾ 이명의 중요한 역할을 하리라 가정되었다(Fig. 9).²⁵⁾ 실제로 강한 소리자극이나 salicylate 주입 후 배측 와우핵에서 자발활동이 증가된 것으로 보고되었고, 이 자발활동의 증가가 이명을 유도하는 것으로 생각되었다.^{26,27)} 또한 이명 발현의 특징상 음의 크기와 고저가 시간적 가소성을 가지고 변하는 것도 tonotopicity를 지닌 배측 와우핵의 특징과 관련 지어 생각해 볼 수 있다.²⁸⁾ 중추성 이명의 발생과 관련된 구체적인 신경세포의 기전은 아직 밝혀지지 않았으나 현재 지속적인 연구가 이루어지고 있다.

REFERENCES

- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952;117 (4):500-44.
- Graham J, Gerald RW. Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibers. *J Cell Comp Physiol* 1946;28:99-117.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976;260 (5554):799-802.
- Kornreich BG. The patch-clamp technique: Principle and technical considerations. *J Vet Cardiol* 2007;9 (1):25-37.
- Winer JA, Schreiner CE. The Central auditory system. In: Winer JA, Schreiner CE, editors. *The inferior colliculus*. 1st ed. New York: Springer;2004. p.1-14.

- Osen KK. Course and termination of the primary afferents in the cochlear nuclei of the cat. An experimental anatomical study. *Arch Ital Biol* 1970;108 (1):21-51.
- Osen KK. Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 1972;144:355-72.
- Adams JC, Mugnaini E. Patterns of glutamate decarboxylase immunostaining in the feline cochlear nucleus complex studied with silver enhancement and electron microscopy. *J Comp Neurol* 1987;262 (3):375-401.
- Kane ES, Conlee JW. Descending inputs to the caudal cochlear nucleus of the cat: Degeneration and autoradiographic studies. *J Comp Neurol* 1979;187 (4):759-83.
- Ryugo DK. The Auditory nerve: Peripheral innervation. Cell body morphology and central projections. In: Webster DB, Popper AN, Fay RP, editors. *Springer handbook of auditory research*. 1st ed. New York: Springer-Verlag;1992. p.23-65.
- Cant NB. The Cochlear nucleus: Neuronal type and their synaptic organization. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. *Springer handbook of auditory research*. 1st ed. New York: Springer-Verlag; 1992. p.66-116.
- Oliver DL, Potashner SJ, Jones DR, Morest DK. Selective labeling of spiral ganglion and granule cells with D-aspartate in the auditory system of cat and guinea pig. *J Neurosci* 1983;3 (3):455-72.
- Berrebi AS, Mugnaini E. Distribution and targets of the cartwheel cell axon in the dorsal cochlear nucleus of the guinea pig. *Anat Embryol* 1991;183 (5):427-54.
- Cant NB, Morest DK. The bushy cells in the anteroventral nucleus of the cat: A study with the electron microscope. *Neuroscience* 1982;4 (12):1925-45.
- Manis PB. Biophysical specialization of neurons that encode timing. In: Basbaum AI, Kaneko A, Shepherd GM, Westheimer G, editors. *The senses: A comprehensive reference*. 1st ed. Sandiego: Academic press; 2008. p.565-86.
- Sullivan WE, Konishi M. Segregation of stimulus phase and intensity coding in the cochlear nucleus of the barn owl. *J Neurosci* 1984; 4 (7):1787-99.
- Oertel D. Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 1983;3 (10):2043-53.
- Louage DH, Vander Heijden M, Joris PX. Enhanced temporal response properties of anteroventral cochlear nucleus to broadband noise. *J Neurosci* 2005;25 (6):1560-70.
- Manis PB. Membrane properties and discharge characteristics of guinea pig dorsal cochlear nucleus neuron studied in vitro. *J Neurosci* 1990;10 (7):2338-51.
- Zhang S, Oertel D. Cartwheel and superficial stellate cells of the dorsal cochlear nucleus of mice: Intracellular recordings in slices. *J Neurophysiol* 1993;69 (5):1384-97.
- Chen GD, Jastreboff PJ. Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats. *Hearing Res* 1995;82 (2):158-78.
- Lieberman MC, Kiang NY. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl* 1978;358:1-63.
- Müller M, Klinke R, Arnold W, Oestreicher E. Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited. *Hear Res* 2003;133 (1-2):37-43.
- Levine RA, Abel M, Cheng H. CNS somatosensory-auditory interactions elicit or modulate tinnitus. *Exp Brain Res* 2003;153 (4):643-8.
- Kaltenbach JA, Zhang J, Finlayson P. Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 2005;206 (1-2):200-26.
- Brozoski TJ, Bauer CA, Caspary DM. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical

- evidence of tinnitus. *J Neurosci* 2002;22 (6):2383-90.
- 27) Kaltenbach JA, Afman CE. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: A physiological model for tinnitus. *Hear Res* 2000;140 (1-2):165-72.
- 28) Kaltenbach JA, Zhang J, Afman CE. Plasticity of spontaneous neuronal activity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure. *Hear Res* 2000;147 (1-2):282-92.