

İnsan temporal kemik laboratuvarı prosedürleri: Genel bir bakış

A general review on the procedures in a human temporal bone laboratory

Dr. Mehmet Faruk OKTAY,^{1,2} Dr. Sebahattin CÜREOĞLU,^{2,3}
Dr. Patricia A. Schachern,^{2,3} Dr. Micheal M. PAPARELLA⁴

İnsan kulağındaki yapılar genellikle yaşam boyunca “erişilemez” özellikte olup, altta yatan hastalıklara ait patolojik değişikliklerin incelenebilmesi postmortem çalışmalarla mümkün olabilmektedir. İnsan temporal kemik (İTK) laboratuvarları bu açıdan eşsiz bir materyal kaynağı sunarlar. Bu laboratuvarlar, temporal kemik kesitlerindeki histolojik bulgularla hastanın ölmeden önceki kulak patolojisinin karşılaştırılmasına, hastalıklı olguları diğer olgularla karşılaştırmaya ve elde edilen bilgilerin diğer laboratuvarlarla paylaşılmasına olanak verir. Bu makalede insan temporal kemik laboratuvarlarının işlevinin tanıtılması amaçlandı ve yapılan histopatolojik işlemlerin ayrıntılı analiziyle birlikte bu laboratuvarlar hakkında genel bir bakış açısı sunuldu.

Anahtar Sözcükler: Diseksiyon; laboratuvar; temporal kemik/anatomi ve histoloji/patoloji.

Structures of the human ear are usually inaccessible during life for examination of pathologic changes of the underlying disease, which is only possible with post-mortem studies of the human temporal bone. Hence, human temporal bone laboratories serve as a unique source of material for research in this respect. They enable comparison between histologic findings of temporal bone sections and the ear pathologies documented prior to death, as well as comparison of diseased ears with any selected temporal bone specimens, both of which provide invaluable knowledge to be shared among researchers and other laboratories. This article aims to provide insight into the functions of temporal bone laboratories and to familiarize the reader with histopathologic studies conducted therein.

Key Words: Dissection; laboratories; temporal bone/anatomy and histology/pathology.

İşitme kaybı insanda görülen en yaygın fonksiyon bozukluklarından biridir. Çevresel ve genetik faktörler neredeyse eşit olarak işitme kaybından sorumlu tutulur. Çevresel faktörler akustik travma, ototoksik ilaçlar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar olarak sayılabilir. Genetik işitme kayıplarının yaklaşık %70'i non-sendromik, %30'u sendro-

mik özelliktedir. İnsan kulağındaki yapılar genellikle hayat boyunca “erişilemez” özelliktedir bu nedenle altta yatan hastalıklara ait patolojik değişikliklerin incelenebilmesi mümkün değildir. İnsan temporal kemiğine (İTK) ait postmortem çalışmalar bu açıdan halen tek seçenek olma özelliğini devam ettirmektedir.

♦ ¹Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı (¹Department of Otolaryngology, Medicine Faculty of Dicle University), Diyarbakır, Turkey; ²Uluslararası İşitme Vakfı (²International Hearing Foundation), Minneapolis; ³Minnesota Üniversitesi KBB Bölümü (³Department of Otolaryngology, University of Minnesota), Minneapolis, Minnesota; ⁴Minnesota Kulak ve Baş-Boyun Kliniği (⁴Minnesota Ear, Head and Neck Clinic), Minneapolis, Minnesota,

♦ Dergiye geliş tarihi - 15 Temmuz 2005 (Received - July 15, 2005). Yayın için kabul tarihi - 9 Ağustos 2005 (Accepted for publication - August 9, 2005).

♦ İletişim adresi (Correspondence): Dr. Mehmet Faruk Oktay, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, 21280 Diyarbakır, Turkey. Tel: +90 412 - 248 80 01 / 4543 Faks (Fax): +90 412 - 248 85 23 e-posta (e-mail): farukoktay@hotmail.com

İnsan temporal kemiği laboratuvarları odituar ve vestibüler patofizyoloji alanındaki araştırmalar açısından eşsiz bir materyal kaynağı sunar. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki (ABD) temporal kemik laboratuvarlarının çoğu ulusal temporal kemik kurumunu (National Temporal Bone Registry) oluşturmak üzere birleşmiştir. Böylece tüm laboratuvarlardaki veriler araştırmacıların kolaylıkla kullanabileceği şekilde merkezi bir bilgisayarlı veri bankasına bağlanmıştır. Temporal kemik bankası ve laboratuvarlarındaki bu arşivleme ve klinik kayıtlara ulaşılma imkanı araştırmacılara temporal kemik kesitlerindeki histolojik bulgularla hastanın ölmeden önceki kulak patolojisinin karşılaştırılmasına, hastalıklı olguları diğer olgularla karşılaştırmaya ve elde edilen bilgilerin ulusal temporal kemik kurumu ile paylaşılmasına olanak verir.

Temporal kemiğin ışık mikroskobu ile incelenmesi, formalin ile fiksasyon, EDTA ile dekalsifikasyon, selloidine gömme, yaklaşık 20 µm kalınlığında seri kesitler alınması ve her onuncu kesitin hematoxilen-eozin ile boyanması şeklindeki standart aşamaları içerir. Standart metodoloji özellikle genetik işitme kayıpları ile ilgili çalışmalarda önemlidir, çünkü bu tür hastalıklarda kulağın en çok etkilenen yapılarının saptanması mümkündür. İnsan temporal kemiği çalışmaları ile işitme kaybının olası mekanizmaları hakkında hipotezler de oluşturulabilmekte ve bu hipotezler uygun hayvan modelleriyle test edilebilmektedir. Otolojik hastalıklara ait altta yatan pek çok genetik mutasyon saptanmış fakat işitme bozukluğuna yol açan yaklaşık 500 hastalığın sadece 20-30'u için "mouse" modeli geliştirilebilmiştir. Hayvan modelinin uygulanabilir olmadığı pek çok sendromda ise temporal kemik çalışmaları önem kazanmaktadır. Ayrıca hayvan modeli çalışmaları iç kulak hastalıklarının moleküler temeline ait değerli bilgiler sağlasa da bu verilerin insan temporal kemiğinde saptanan otopatolojik bulgularla karşılaştırılmaları büyük önem taşımakta, böylece bu veriler doğruluk ve geçerlilik açısından onaylanabilmektedir. İnsan örneklerinin incelenebilmesi, işitme kayıplarının mekanizmaları ile ilgili teoriler ortaya atılabilmesine olanak sağlar. İnsandaki kulak hastalıklarının anlaşılabilmesine yardımcı olabilecek bu teoriler uygun hayvan modellerinde test edilirler. Standart metodoloji kulaktaki bazı spesifik lokalizasyonlardaki patolojik değişikliklerin elektron mikroskopu, immün boyama, PCR ve diğer tekniklerle incelenebilmesine de yardımcı olur.

Bilgilerin kaydedilmesi

Otopatoloji laboratuvarındaki veriler çeşitli konular içerir. Özellikle kimlik bilgilerini içeren bazı bölümlere sadece izin verilen araştırmacılar ve laboratuvar personeli ulaşabilir. Laboratuvarlar arasındaki bilgi alışverişlerinde öncelikle biyografik kayıtlar çıkarılır ve hastalar sadece numaraları ile tanımlanır.

Histopatolojik işlem kayıtları: Bu dosya, verilen örneğin işlem basamaklarına ait bilgileri verir. Hastanın hayatını kaybetme nedenini, tarihi ve saatini, otopsi tarihi ve saatini ve histopatolojik bulguların özetini içerir. Bu dosyada tarihleri ile birlikte tüm işlemler -fiksasyondan gömülü blokların son temizleme aşamasına kadar- not edilir.

Medikal kayıtlar. Örnek laboratuvara geldiği zaman, beraberinde hastaya ait tıbbi kayıtlar da ilgili klinikten kopya şeklinde alınır. Her dosya numara sırasına göre etiketlenir. Tıbbi geçmiş ek olarak, her dosyada kesin otopsi raporu, otopsi izin belgesi gibi yasal dökümanlar yer alır.

Laboratuvar işlemleri

Fiksasyon: Fiksasyon hücre ve ekstraselüler matris yapılarının korunması amacıyla yapılır. Örnek alındıktan sonra hiç zaman kaybetmeksizin yapılmalıdır. Temporal kemik, içinde 300 ml %10'luk tamponlanmış nötral formalin olan bir cam kavanoza konur. Temporal kemik beyinle birlikteyse %15'lik formalin kullanılır. Fiksatif madde ile örnek arasındaki hacimsel oran temporal kemik için en az 3:1 beyin için ise 5:1 olmalıdır. Temporal kemikler için fiksasyon süresi en az iki hafta tüm beyin için dört haftadır. Formalin solüsyonu haftada bir defa değiştirilir ve temporal kemikler ilk hafta 4°C, ikinci hafta ise oda sıcaklığında muhafaza edilir. Yine de tamponlanmış nötral formalin DNA ve RNA'nın komşu proteinlerle çapraz bağlantı yapmalarına neden olabilir bu da mRNA ve DNA'nın ekstraksiyonunu zorlaştırabilir.^[1] Bu amaçla, %4 paraformaldehid, %2 glutaraldehid, ya da etanol/asetik asid (95:5) önerilmektedir.^[2]

Dekalsifikasyon: Temporal kemik vücuttaki en sert kemik olup kabul edilebilir ince doku kesitleri elde edebilmek için dekalsifikasyonun şelasyon yapıcı ya da asit solüsyonlarla yapılması gereklidir.^[3] Triklorasetik asidin %5'lik solüsyonu önceleri bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktaydı fakat iç kulakta kompresyon artefaktlarına yol açtığı için son za-

manlarda çoğu otopatoloji laboratuvarında etilen-diamin-tetra-asetat (EDTA) tercih edilmeye başlandı. Bu solüsyonun pH'si 7.4'te tutulmaya çalışılır. Dekalsifikasyondan önce fiksatif madde artıklarını temizlemek için kemikler tamponlanmış fosfat solüsyonuyla yıkanır. Bu işlem erişkin temporal kemiği için 24 hafta, çocuklar için 8-12 hafta ve küçük hayvanlar için 2-3 hafta sürer ve haftada bir tamponlanmış fosfat solüsyonu değiştirilir. Son aşamada kemiklerin X-ray filmi çekilerek residüel kalsiyum varlığı olup olmadığına bakılır. Etilen-diamin-tetra-asetat ile dekalsifikasyon süresi insan temporal kemiği için 6-9 ay sürer. Son zamanlarda mikrodalga fırınlar da dekalsifikasyon için yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ilk olarak immünohistokimyasal çalışmalarda kullanılmıştır. İnsan temporal kemiğinin dekalsifikasyonunda da etkin ve güvenilir bir yöntem olduğu ve dekalsifikasyon süresini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir.^[4,5]

Dehidrasyon ve selloidine gömme: Örnek artan konsantrasyonlarda etanol (%70-100) ve son olarak eşit miktarda etanol ve eter içeren solüsyonlarda dehidrate edilir. Daha sonra ilk iki hafta %1.5'lik selloidine, sonraki üç hafta %3'lük selloidine, sonraki üç hafta %6'lık selloidine en son olarak sertleşinceye kadar %12'lik selloidine gömülür. Daha sonra bir geceliğine likid kloroforma daldırılır ve kesit alma işlemi yapıncaya kadar %80'lik alkol içerisinde muhafaza edilir.

Kesit alma: Kesit alma işlemi için sliding mikrotom kullanılır. Blok orta fossa kısmı üst tarafa gelecek şekilde yerleştirilir. Kesitler 20 µm kalınlığında yapılır. Birbiri ardına numaralanmış kağıtlar arasına yerleştirilir ve aynı örneğin diğer kesitleri ile birlikte %80 alkol içerisinde saklanır. Her onuncu kesit hematoksilen ve eozinle boyanır. Her bir kesit için temporal kemik numarası, hangi taraf olduğu (sağ, sol) ve kesit numarası belirtilir.

Elektron mikroskopik çalışmalar için celloidin kesitleri hazırlanması (reembedding): Bu işlem Massachusetts Eye and Ear Infirmary tarafından tarif edilmiştir.^[6] Temporal kemiğin %80 alkol içerisinde bulunan ve sigara kağıdına yapışık seri selloidin kesitleri alınıp %10'luk formalin içerisinde her iki yüzeyine emici bir kağıt yerleştirildikten sonra üzerine tahta blok ve ağırlık yerleştirilir ve bu ağırlık bir saat tutulur. Kesit kurduktan sonra %5'lik alkol içerisinde beş dakika tutularak yapışmış sigara kağıdı çıkarılır ve lam üzerine konur. Bu kesitler sırasıyla %95 ve

%100'lük etanol içerisinde üçer dakika bekletilir. Kesitlerdeki selloidini çıkarmak amacıyla karanfil yağında bir gece bekletilir. Karanfil yağını elimine etmek için ise kesitler her biri için üçer dakika olarak %100, %95, %70 ve %50'lik etanol solüsyonları içine alınır. Daha sonra "cacodylate" ile yıkanır, dehidrate edilir ve epoksi reçinesine gömülür.

İmmünohistokimya: Çeşitli antikolar kullanılarak deney hayvanlarında pek çok immünohistokimyasal çalışma yapılmıştır. İnsan temporal kemiğinin standart işleme tekniği ile immünohistokimyasal olarak iyi sonuçlar alınabilmesine karşın şu ana kadar yapılan immünohistokimya çalışmaları sınırlıdır. Bu yöntemle 14 çeşitli antikör ve 6 lektin kullanılarak 40 yıla kadar örnekler muhafaza edilebilmektedir. Başarılı bir immün boyama için bazı fiksasyon ve doku hazırlama işlemleri geliştirilmiştir.^[7,8] Tian ve ark.^[9] bazı antikörlerle immün boyamanın uzun zaman korunabilmesine karşın, postmortem değişikliklerin fazlalığı ve örneklerin bekleme süresinin uzun olması nedeniyle boyanma yoğunluğunun azaldığını bildirmişlerdir. Temporal kemiğin immünohistokimyasal çalışmaları, kısa postmortem süre gerektirmesi, fiksasyonun güvenilir şekilde yapılması ve dekalsifikasyon süresinin uzunluğu (4-7 ay) göz önüne alındığında zorluklar içermektedir. Bu zorluğun üstesinden gelebilmek için "antigen retrieval" (AR) teknikleri geliştirilmiştir.^[10,11] Buna göre formalin fiksasyonunun neden olduğu proteinlerdeki çapraz bağlar geridönüşümlü olabilmekte ve bu çapraz bağlar yüksek ısı (heating AR technique) veya güçlü alkali (non-heating AR technique) etkisiyle bozulabilmektedir. Bu gözlemler AR tekniklerinin geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur. "Antigen retrieval" tekniğinde immün boyamadan önce insan temporal kemik kesitleri ya ısıtılmakta (mikrodalga fırınlarda kullanılabilir) ya da NaOH-metanol solüsyonu ile yıkanmaktadır.^[12,13] Bu yöntemi standardize edebilmek için çalışmalar devam etmektedir. Bunlardan biri de yukarıdaki iki yöntemin kombine edilmesi şeklindedir.^[14,15] Non-heating AR tekniği selloidine gömülü beyin dokusu kesitlerinde de başarıyla uygulanmıştır.^[16] Her iki AR yöntemini etkileyebilen faktörler (sıcaklık, ısıtma süresi, AR solüsyonunun kimyasal kompozisyonu, AR solüsyonunun tipi ve konsantrasyonu ve optimal inkübasyon zamanı) detaylı olarak araştırılmıştır.^[10]

Moleküler biyoloji teknikleri: Selloidine gömülü insan temporal kemik kesitlerinden DNA izolasyonu ve sonrasında PCR ile DNA amplifikasyonu ilk ola-

rak Wackym ve ark.^[17] tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemle Ramsay Hunt sendromlu temporal kemiklerde Herpes varicella-zoster virüsü identifiye edilmiş,^[18-20] vestibüler nörit, Bell palsy ve Meniere hastalığında herpes simpleks virus tip 1,^[21-24] bazı labirentit örneklerinde sitomegalovirüs,^[25] otosklerotik kemiklerde kızamık virüsü^[26,27] ve karsinomlarda papilloma virüsü saptanmıştır.^[28] Yine de son zamanlarda yapılan çalışmalarda otosklerotik stapes kemiği örneklerinin %60'ında kızamık virüs DNA'sının olduğu gösterilmiştir.^[29] DNA analizi genomik mutasyonların saptanabilmesine de olanak sağlar.^[30-33] DNA ekstraksiyonu bir ya da daha fazla boyanmamış kesitin önce PCR ile amplifikasyonu ve sonra diğer işlem basamaklarının takip edilmesi ile yapılır. Bu teknik son derece değerli olup çoğu odituar ve vestibüler hastalıklar hakkındaki bilgilerimizin gelişmesine katkıda bulunmuştur. Yine de standart insan temporal kemik tekniği ile nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve amplifikasyonunun bazı kısıtlayıcı yönleri vardır. Bunlar; (i) tek bir kesitten ekstrakte edilebilen DNA miktarı düşüktür (20 mikron kalınlığındaki bir temporal kemik kesitinden yaklaşık olarak 525 nanogram DNA elde edilebilir); (ii) DNA fragmanlarının uzunluğu 300-400 baz çiftinden kısadır; ekstrakte edilen DNA labildir ve hızlıca bozulabilir; (iii) formalin fiksasyonu bazı değişikliklere yol açabilir ve bu da yanlışlıkla mutasyon olarak yorumlanabilir ve temporal kemiğin işlemleri sırasında dışarıdan gelen DNA doku kesitlerini kontamine edebilir, bu yabancı DNA da PCR ile amplifiye edilerek yorum hatalarına neden olabilir. McKenna ve ark.^[34] kontaminasyon kaynağının büyük olasılıkla temporal kemiğin hazırlanması sırasında meydana gelebileceğini bildirmişlerdir. Diğer potansiyel kontaminasyon nedenleri olarak örneklerin aynı kompartmanlarda muhafaza edilmeleri ve selloidinin birden çok temporal kemikte kullanılması sayılabilir. Yukarıda sayılan sorunların üstesinden gelebilmek için, McKenna ve Kristiansen^[35] temporal kemik donörlerinden güvenilir bir DNA kaynağı olarak kan örnekleri ve yanak sürüntülerinin de alınmasını önermişlerdir. Temporal kemiğin işlem basamakları ve muhafaza edilmesi süresince steril çalışılmaya özen gösterilerek kontaminasyon riski kolaylıkla elimine edilse de çapraz bağlantılar ve DNA'nın degradasyonu daha büyük bir sorun olarak karşımızda durmaktadır.

RNA analizi hücre ya da dokuların biyolojik aktivitelerinin anlaşılabilmesi için gereklidir. Selloidin-

li insan temporal kemik kesitlerindeki küçük RNA fragmanlarının amplifikasyonu α -tubulin çalışmasında uygulanmışsa da,^[36] insan temporal kemiğinden RNA elde edilmesinin, RNA moleküllerinin degradasyonu nedeniyle son derece zor olduğu kanıtlanmıştır. Otopside elde edilen temporal kemiklerdeki RNA degradasyonuna yol açan en önemli nedenler otopsi öncesi geçen zaman ve temporal kemik çıkarıldıktan sonraki işlemlerle ilgili teknik sorunlardır. McKenna ve ark.^[26] temporal kemiklerde kızamık nükleokapsid RNA'sı için nükleotid problu in-situ hibridizasyon yöntemi kullanmış, bazı kesitlerde anlamlı bulgular elde etmişlerse de tutarsız sonuçlardan dolayı kesin bir yorumda bulunmanın mümkün olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. In-situ hibridizasyon tekniği ile herhangi bir doku kesitinde sadece 2-10 hedef mRNA molekülünü içerecek kadar dar bir spektrumda bile RNA molekülleri saptanabilirse de insan temporal kemik kesitlerinde bu tekniğin kullanılması kompleks işlemler ve özellikle eski ve gereğinden çok fikse edilmiş temporal kemiklerde yaygın olarak bulunan çapraz bağlar nedeniyle son derece sınırlıdır.^[8] Diğer bir önemli sorun da RNA moleküllerinin postmortem altıncı saatte degradasyona uğrayabilmesidir ki otopsi öncesi geçen zaman genellikle bundan fazladır.^[37] Kesitlerin hazırlama ve muhafaza zamanının uzun olması da aynı şekilde kulak yapılarının iyi korunmaması, DNA/RNA degradasyonu ve proteinlerin antijenitesinde azalma ile sonuçlanır.

Işık mikroskobu çalışmalarının bugüne kadar otojik hastalıklarda çok önemli rolü olmasına ve bilgilerimize temel oluşturmasına karşın bu hastalıkların anlaşılabilmesinde halen pek çok bilinmeyen vardır. İmmünohistokimya, immün elektron mikroskobu, PCR, RT-PCR, proteomiks ve in-situ hibridizasyon yöntemlerinin insan temporal kemiğine uygulanması kulağın normal fonksiyonlarını ve patolojik durumlarını araştırabilmek için çok büyük olanaklar sağlamaktadır. Bu yöntemlerin son zamanlarda işitme kaybının genetik temelini çözmeye yönelik gelişmelerle birlikte, işitme ve denge bozukluklarının anlaşılmasında önemli bir rolü vardır.

KAYNAKLAR

1. Frost AR, Sparks D, Grizzle WE. Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2000;8:236-43.
2. Grizzle WE, Manne U, Jhala NC, Weiss HL. Molecular characterization of colorectal neoplasia in translational

- research. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:91-8.
3. Schuknecht HF. Methods of removal, preparation and study. In: Schuknecht HF, editor. *Pathology of the ear*. 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993. p. 1-27.
 4. Keithley EM, Truong T, Chandronait B, Billings PB. Immunohistochemistry and microwave decalcification of human temporal bones. *Hear Res* 2000;148:192-6.
 5. Cunningham CD 3rd, Schulte BA, Bianchi LM, Weber PC, Schmiedt BN. Microwave decalcification of human temporal bones. *Laryngoscope* 2001;111:278-82.
 6. Schuknecht HF. Light and electron microscopy on the same temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1989;143:40.
 7. Ishiyama A, Lopez I, Wackym PA. Choline acetyltransferase immunoreactivity in the human vestibular end-organs. *Cell Biol Int* 1994;18:979-84.
 8. Wackym PA. Molecular temporal bone pathology: I. Historical foundation. *Laryngoscope* 1997;107:1156-64.
 9. Tian Q, Linthicum FH Jr, Keithley EM. Application of labeling techniques to archival temporal bone sections. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:47-53.
 10. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry used for routinely processed celloidin-embedded human temporal bone sections: standardization and development. *Auris Nasus Larynx* 1998; 25:425-43.
 11. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 2001;49:931-7.
 12. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
 13. Shi SR, Cote C, Kalra KL, Taylor CR, Tandon AK. A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992;40:787-92.
 14. Shi SR, Tian Q. Development of an antigen retrieval technique for immunohistochemistry on archival celloidin-embedded sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1121.
 15. Ganbo T, Sando I, Balaban CD, Suzuki C, Sudo M. Immunohistochemistry of lymphocytes and macrophages in human celloidin-embedded temporal bone sections with acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:662-8.
 16. Moore JK, Guan YL, Shi SR. Axogenesis in the human fetal auditory system, demonstrated by neurofilament immunohistochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 195:15-30.
 17. Wackym PA, Simpson TA, Gantz BJ, Smith RJ. Polymerase chain reaction amplification of DNA from archival celloidin-embedded human temporal bone sections. *Laryngoscope* 1993;103:583-8.
 18. Wackym PA, Popper P, Kerner MM, Grody WW. Varicella-zoster DNA in temporal bones of patients with Ramsay Hunt syndrome. *Lancet* 1993;342:1555.
 19. Kerner MM, Wackym PA, Popper P, Tabor DE, Grody WW. Cloning and sequencing of genomic DNA extracted from archival human temporal bone sections. *Laryngoscope* 1994;104:127-34.
 20. Wackym PA. Molecular temporal bone pathology: II. Ramsay Hunt syndrome (herpes zoster oticus). *Laryngoscope* 1997;107:1165-75.
 21. Burgess RC, Michaels L, Bale JF Jr, Smith RJ. Polymerase chain reaction amplification of herpes simplex viral DNA from the geniculate ganglion of a patient with Bell's palsy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994;103:775-9.
 22. Arbusow V, Theil D, Strupp M, Mascolo A, Brandt T. HSV-1 not only in human vestibular ganglia but also in the vestibular labyrinth. *Audiol Neurootol* 2001;6: 259-62.
 23. Carreno M, Ona M, Melon S, Llorente JL, Diaz JJ, Suarez C. Amplification of herpes simplex virus type 1 DNA in human geniculate ganglia from formalin-fixed, nonembedded temporal bones. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;123:508-11.
 24. Linthicum F. Herpes simplex virus DNA in endolymphatic sacs in patients with Meniere's disease. *Nat Temp Bone Registry* 2002;9:4.
 25. Bachor E, Sudhoff H, Litschel R, Karmody CS. The pathology of the temporal bones of a child with acquired cytomegalovirus infection: studies by light microscopy, immunohistochemistry and polymerase-chain reaction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000; 55:215-24.
 26. McKenna MJ, Kristiansen AG, Haines J. Polymerase chain reaction amplification of a measles virus sequence from human temporal bone sections with active otosclerosis. *Am J Otol* 1996;17:827-30.
 27. Niedermeyer HP, Arnold W, Neubert WJ, Sedlmeier R. Persistent measles virus infection as a possible cause of otosclerosis: state of the art. *Ear Nose Throat J* 2000;79:552-4, 556, 558 passim.
 28. Marioni G, Altavilla G, Busatto G, Blandamura S, De Filippis C, Staffieri A. Detection of human papillomavirus in temporal bone inverted papilloma by polymerase chain reaction. *Acta Otolaryngol* 2003;123:367-71.
 29. Karosi T, Konya J, Szabo LZ, Sziklai I. Measles virus prevalence in otosclerotic stapes footplate samples. *Otol Neurotol* 2004;25:451-6.
 30. Wackym PA, Kerner MM, Grody WW. Molecular temporal bone pathology: III. Genotyping of the deltaF508 deletion in the DNA of patients with cystic fibrosis. *Laryngoscope* 1998;108(8 Pt 2 Suppl 88):1-3.
 31. Seidman MD, Bai U, Khan MJ, Murphy MJ, Quirk WS, Castora FL, et al. Association of mitochondrial DNA deletions and cochlear pathology: a molecular biological tool. *Laryngoscope* 1996;106:777-83.
 32. Bai U, Seidman MD, Hinojosa R, Quirk WS. Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *Am J Otol* 1997;18:449-53.
 33. Dai P, Yang W, Jiang S, Gu R, Yuan H, Han D, et al. Correlation of cochlear blood supply with mitochondrial DNA common deletion in presbycusis. *Acta Otolaryngol* 2004;124:130-6.
 34. McKenna MJ, Kristiansen AG, Tropitzsch AS, Tranebjaerg L, Merchant SN. Deoxyribonucleic acid contamination in archival human temporal bones: a

- potentially significant problem. *Otol Neurotol* 2002; 23:789-92.
35. McKenna M, Kristiansen AG. *Nat Temp Bone Registry* 2002;10:6.
36. Ohtani F, Furuta Y, Iino Y, Inuyama Y, Fukuda S. Amplification of RNA from archival human temporal bone sections. *Laryngoscope* 1999;109:617-20.
37. Lin J, Kawano H, Paparella MM, Ho SB. Improved RNA analysis for immediate autopsy of temporal bone soft tissues. *Acta Otolaryngol* 1999;119:787-95.