

Usage of Autologous Serum Eye Drops

Baradaran-Rafii A, MD; Nourizadeh F, MD; Javadi MA, MD; Movahedan H, MD; Shojaei A, MD; Khooei H, MD

Tears have antimicrobial, nourishing, mechanical, and optical properties and contain components such as growth factors, fibronectin and vitamins to support proliferation, migration and differentiation of corneal and conjunctival epithelial cells. Lack of these epitheliotropic factors, as in dry eye, can result in severe ocular surface disorders such as persistent epithelial defects. Recently, the use of autologous serum in the form of eye drops has been reported as a new treatment for severe ocular surface disorders. Serum eye drops may be produced as an unpreserved blood preparation. They are by nature non-allergenic and their biomechanical and biochemical properties are similar to normal tears. In vitro cell culture experiments showed that corneal epithelial cell morphology and function are better maintained by serum than by pharmaceutical tear substitutes. Clinical cohort studies have reported its successful use for severe dry eyes and persistent epithelial defects. However, the protocols to prepare and use autologous serum eye drops varied considerably between the studies. In addition to different biochemical properties, protocol variations may also influence the epitheliotropic effect of the product. Before establishing the definitive role of serum eye drops in the management of severe ocular surface diseases in a large randomized controlled trial, this has to be evaluated in more detail. Based upon the literature reviewed here, two preliminary standard operating procedures for the preparation of serum eye drops are proposed.

- Bina J Ophthalmol 2007; 12 (2): 234-244.

کاربرد قطره‌های چشمی مشتق از سرم اتولوگ انسانی

دکتر علیرضا برادران رفیعی^۱، دکتر فرساد نوری‌زاده^۲، دکتر محمدعلی جوادی^۳، دکتر حسین موحدان^۴، دکتر احمد شجاعی^۵ و دکتر هاشم خوبی^۶

اشک دارای ویژگی‌های ضد میکروبی، تغذیه‌ای، مکانیکی و اپتیکی است؛ هم‌چنین دارای ترکیباتی مانند عوامل رشدی، فیبرونکتین و ویتامین‌های مختلف برای حمایت از تکثیر، مهاجرت و تمایز اپی‌تلیوم قرنیه و ملتحمه می‌باشد. فقدان این عوامل اپی‌تلیوتروفیک برای مثال در چشم خشک می‌تواند منجر به اختلالات شدید سطح چشم مانند نقص‌های اپی‌تلیومی پایدار شود. به تازگی، کاربرد سرم اتولوگ به شکل قطره‌های چشمی به عنوان درمان جدیدی در اختلالات شدید سطح چشم مورد توجه قرار گرفته است. قطره‌های چشمی مشتق از سرم را می‌توان به صورت یک فرآورده خونی بدون ماده نگه‌دارنده تهیه کرد. این فرآورده‌ها، به طور طبیعی آلوزنیک نیستند و ویژگی‌های بیومکانیکی و بیوشیمیایی آن‌ها مشابه اشک طبیعی است. آزمایش‌های کشت یاخته‌ای نشان داده‌اند که مورفولوژی یاخته‌های اپی‌تلیومی قرنیه و کاربرد آن‌ها در صورت استفاده از قطره سرم نسبت به جایگزین‌های ساختگی اشک، بهتر حفظ می‌شود. مطالعات هم‌گروهی بالینی، کاربرد موفقیت‌آمیز آن را در خشکی‌های شدید چشم و نقص‌های اپی‌تلیومی پایدار نشان داده‌اند. روش‌های تولید و کاربرد قطره‌های چشمی مشتق از سرم اتولوگ به میزان قابل ملاحظه‌ای در مطالعات مختلف متفاوتند. با توجه به این که این تفاوت‌ها می‌توانند ویژگی‌های بیوشیمیایی متفاوتی ایجاد کنند؛ در نهایت می‌توانند بر تاثیرات اپی‌تلیوتروفیک این محصول نیز تاثیر بگذارند. قبل از این که نقش قطعی قطرات چشمی سرم

در درمان بیماری‌های شدید سطح چشم به طور کامل به اثبات برسد؛ ارزیابی ویژگی‌های آن در یک مطالعه گسترده تصادفی شده شاهددار لازم است. هم‌چنین با توجه به مطالعات مختلف، دو روش خاص برای تهیه قطره سرم پیشنهاد می‌گردد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۵؛ دوره ۱۲، شماره ۲: ۲۴۴-۲۳۴.

• پاسخ‌گو: دکتر علیرضا برادران رفیعی (e-mail: alirbr@gmail.com)

۱- استادیار - چشم‌پزشک - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- پزشک عمومی - کلینیک چشم‌پزشکی بصیر

۳- استاد - چشم‌پزشک - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دانشیار - چشم‌پزشک - دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۵- استادیار - چشم‌پزشک - دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

تهران - پاسداران - بوستان نهم - بیمارستان لیافی‌نژاد - مرکز تحقیقات چشم، تلفن: ۲۲۵۸۷۳۱۷، نمابر: ۲۲۵۸۷۳۱۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۶ اسفند ۱۳۸۵

تاریخ تایید مقاله: ۲۴ اسفند ۱۳۸۵

مقدمه

اپی‌تلیومی به کار رفته‌اند ولی به دلیل مسایلی مانند پایداری و موفقیت بالینی محدودشان، نتوانسته‌اند جای خود را در درمان بیماری‌های سطح چشم باز کنند^{۱۱-۱۳}. سرم و سایر مایعات مشتق از بدن به عنوان جایگزین‌های طبیعی اشک، به صورت محصولات اتولوگ بدون ماده نگه‌دارنده و فاقد ویژگی‌های آنتی‌ژنتیک به کار می‌روند^{۱۴،۱۵}. سرم، بخش مایع خون است که بعد از تشکیل لخته، باقی می‌ماند و شامل گروه وسیعی از عوامل رشدی، ویتامین‌ها و ایمونوگلوبولین‌هاست. این عوامل اپی‌تلیوتروفیک، مسوول اثرات درمانی سرم در اختلال سطح چشم می‌باشند. تاثیرات بیش‌برنده رشد و مهاجرت سرم بر روی کشت‌های یاخته‌ای، به طور عام و بر یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه، به خوبی اثبات شده‌اند^{۱۶،۱۷}.

وجود یک لایه اشکی پایدار برای حفظ سلامت سطح چشم ضروری است. پایداری سطح چشم، وابسته به کنش‌ها و واکنش‌های تشریحی - عصبی برخی عوامل ترکیبی و هیدرودینامیک است^{۱۸}. یکی از اجزای مهم عوامل ترکیبی، اپی‌تلیوم سالم سطح چشم است که تمایز و تزیاید یاخته‌های آن به طور طبیعی انجام می‌شود. عوامل پروتئینی و غیر پروتئینی متعددی در اشک وجود دارند که وجود آن‌ها برای حفظ سلامت اپی‌تلیوم ضروری است. از جمله این عوامل می‌توان عامل رشدی اپیدرمی (EGF)^۱، ویتامین A، عامل رشدی تغییر شکل دهنده بتا (TGF- β)^۲، فیبرونکتین^۳ و سایر سیتوکین‌ها^۴ را نام برد. غلظت بعضی از این عوامل در سرم بیش‌تر از اشک است (جدول ۱). این عوامل، تزیاید، تمایز و بلوغ یاخته‌های اپی‌تلیوم سطحی چشم را تنظیم می‌کنند. در بیمارانی که به دلیل اختلال عملکرد غدد اشکی، دچار نقص بسیار شدید در قسمت آبکی اشک هستند؛ این عوامل به شدت کاهش یافته‌اند و احتمالاً به همین دلیل، سلامت سطح چشم در این افراد به خوبی حفظ نمی‌شود. با توجه به آن که این عوامل در سرم نیز وجود دارند^۵؛ مطالعات زیادی برای تهیه اشک مصنوعی با استفاده از سرم خود بیمار انجام شده‌اند.

کاربردهای بالینی

کراتوکونژنکتیویت سیکا (سندرم خشکی شدید چشم)

Fox و همکاران^{۱۸} برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ گزارش کردند که به طور موفقیت‌آمیزی سرم اتولوگ را که به کمک محلول نمکی استریل (و بدون ماده نگه‌دارنده)، تا ۵۰ درصد رقیق شده بود؛ در ۷ بیمار دچار کراتوکونژنکتیویت سیکا (KCS) و ۸ بیمار مبتلا به سندرم شوگرن، به عنوان درمان جایگزین به کار برده‌اند. آنان برای ارزیابی اثربخشی این درمان، از رنگ‌آمیزی رزینگال و نیز درجه‌بندی میزان شکایات بیماران استفاده کردند. میانگین دوره پی‌گیری بیماران در مطالعه آنان

به استثنای چند مورد، محصولات دارویی ساختگی، فقط به دلیل ویژگی‌های بیومکانیکی مطلوب هستند^{۱۰-۸}. فیبرونکتین، ویتامین‌ها و عوامل رشدی، برای تسهیل ترمیم زخم‌های

Poon و همکاران^{۲۲} نیز طی مطالعه‌ای از قطره سرم اتولوگ ۲۰ درصد برای درمان ۱۱ چشم مبتلا به KCS استفاده کردند که در ۶ چشم، براساس درجه‌بندی فلورسین و شکایات بیماران و در ۵ چشم براساس درجه‌بندی رزبنگال، بهبود مشاهده شد. نویسندگان این مقاله اشاره نکرده‌اند که آیا برای این بیماران بستن سوراخ‌های اشکی نیز انجام شد یا خیر. هم‌چنین مشخص نکرده‌اند که آیا معیارهای ورود به مطالعه طوری بوده است که اثر عوامل مخدوش‌کننده را خنثا کند یا خیر. با این حال، در یک کارآزمایی بالینی^{۲۳} دیده شد که استفاده از سرم ۲۰ درصد ۶ بار در روز، در مقایسه با محلول نمکی ۰/۹ درصد، در چشم‌های مبتلا به KCS، از نظر بهبود شکایت و علایم بیماران، تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. به نظر نویسندگان این مقاله، علت این یافته، کوچک بودن حجم نمونه در این مطالعه بوده است. در مجموع، اثر قطره چشمی سرم اتولوگ در کاهش علایم بین ۳۰ تا ۱۰۰ درصد، در بهبود رنگ‌آمیزی فلورسین بین ۳۹ تا ۶۱ درصد و برای رنگ‌آمیزی رزبنگال حدود ۳۳ تا ۶۸ بوده است. احتمالاً این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت در جمعیت‌های مورد مطالعه (شدت نقایص) و نیز تفاوت در روندهای تولید و استفاده از این قطره‌ها بوده است.

مناپلازی سنگ‌فرشی سطح چشم ناشی از کراتوکونژکتیویت فوقانی لیمبوس

در یک مطالعه هم‌گروهی آینده‌نگر^{۲۴}، یازده بیمار مبتلا به کراتوکونژکتیویت فوقانی لیمبوس با قطره چشمی ۲۰ درصد سرم اتولوگ به مدت ۴ هفته تحت درمان قرار گرفتند که ۸۲ درصد آن‌ها بهبود نسبی پیدا کردند. محققان در این مطالعه برای ارزیابی اثربخشی این روش، از رنگ‌آمیزی فلورسین و رزبنگال و نیز درجه‌بندی شکایات بیماران استفاده کردند. این پژوهشگران توصیه کردند که قطره چشمی سرم اتولوگ فقط به عنوان انتخاب دوم در نظر گرفته شود؛ یعنی وقتی که بستن سوراخ‌های اشکی موثر نیست. آنان هم‌چنین خاطر نشان کردند که این قطره ممکن است بخش لپیدی لایه اشک را (که یکی از اجزای مهم آن است) تامین کند. البته آنان غدد میبومین و ترشحات لپیدی را ارزیابی نکردند.

۱۰ ماه بود که در این مدت، میانگین شکایات بیماران به طور معنی‌داری بهبود یافت و رنگ‌آمیزی رزبنگال نیز مویید کاهش یافته‌های مرده بود.

در سال ۱۹۹۹، Tsubota و همکارانش^{۱۹}، تاثیر قطره سرم اتولوگ ۲۰ درصد را که با محلول نمکی رقیق شده بود؛ برای درمان خشکی چشم در ۱۲ بیمار مبتلا به سندرم شوگرن ارزیابی کردند. آنان از شاخص‌های بالینی متعددی مثل رنگ‌آمیزی رزبنگال و فلورسین، زمان گسسته شدن لایه اشکی (tear break up time) و میزان شکایت بیماران استفاده کردند. همه این شاخص‌ها، ۲ و ۴ هفته پس از مصرف قطره‌های چشمی مشتق از سرم اتولوگ، بهبود یافتند. هم‌چنین سرم باعث شد که بیان MUC-۱ (mucus protein-۱) در محیط کشت اپی‌تلیوم قرنیه افزایش یابد. بدین ترتیب، آنان فرضیه‌ای ارائه نمودند مبنی بر این که به دنبال استفاده از قطره چشمی سرم، افزایش بیان MUC-۱ ناشی از تحریک سرم، باعث می‌شود که رنگ‌آمیزی رزبنگال بهبود یابد. یافته‌های مشابهی در بیماران دچار خشکی چشم ناشی از بیماری پیوند علیه میزبان (GVHD) گزارش شده‌اند^{۲۰،۲۱}. در این بیماران، علایم بیماری طی چند روز بهبود یافت ولی بهبود در رنگ‌آمیزی اپی‌تلیوم قرنیه به چند ماه زمان نیازمند بود. در ۱۴ بیمار مبتلا به KCS ناشی از بیماری پیوند علیه میزبان، بهبود بیش از ۶ ماه طول کشید و در ۶ بیمار، بستن سوراخ‌های اشکی لازم شد.

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های اشک طبیعی و سرم

ویژگی	اشک	سرم
pH	۷/۴	۷/۴
اسمولالیت (SD)	۲۹۸ (۱۰)	۲۹۶
EGF (ng/ml)	۰/۲ - ۳/۰	۰/۵
TGF-β (ng/ml)	۲-۱۰	۶-۳۳
ویتامین A (mg/ml)	۰/۰۲	۴۶
لیزوزیم (mg/ml) (SD)	۱/۴ (۰/۲)	۶
SIgA (μg/ml)	۱۱۹۰	۲
فیبرونکتین (μg/ml)	۲۱	۲-۵

SD: standard deviation, EGF: epithelial growth factor, TGF: transforming growth factor, SIgA: serum immunoglobulin A

کراتوپاتی نوروتروفیک

در این مطالعه حس قرنیه را نیز اندازه‌گیری کردند و مشاهده نمودند که بیماران دچار کاهش حس قرنیه، کم‌تر از دیگران به درمان پاسخ می‌دهند. البته این رابطه از نظر آماری معنی‌دار نبود. توجه به این نکته مهم، است که در این مطالعه، به علت متفاوت بودن عامل نقایص اپی‌تلیومی پایدار قرنیه در بیماران مختلف، ارزیابی دقیق اثر قطره سرم اتولوگ در التیام این نقایص، امکان‌پذیر نبوده است. برای مثال، نویسندگان ذکر نکرده‌اند که آیا در همه بیماران، بستن سوراخ‌های اشکی انجام شده بود یا خیر.

Poon و همکاران^{۲۲} نیز در مطالعه‌ای برای درمان ۱۵ چشم از ۱۳ بیمار مبتلا به PED، از قطره سرم اتولوگ انسانی ۵۰ تا ۱۰۰ درصد استفاده کردند و دیدند که طی ۲۹ روز، ۶۰ درصد چشم‌ها بهبود یافته‌اند ولی بعد از قطع قطره سرم و شروع لوبریکانت‌های دارویی، نقص اپی‌تلیومی در ۶ مورد عود کرد. در این مطالعه نیز محققان ذکر نکرده‌اند که آیا طی مطالعه یا قبل از آن، بستن سوراخ‌های اشکی برای بیماران انجام شده بود یا خیر. محققان هم‌چنین اثر تروفیک سرم اتولوگ ۲۰ درصد را بر روی یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه در آزمایشگاه بررسی کردند؛ بدین صورت که یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه انسانی را در محیط کشت، در مجاورت سرم ۲۰ درصد اتولوگ انسانی و نیز هایپرملوز ۰/۳ درصد قرار دادند و میزان زنده ماندن یاخته‌ها را با آزمون زیست‌پذیری به کمک رنگ‌آمیزی فلورسنت (Calciein AM ethidium homodimer) و بررسی ادنوزین تری‌فسفات (ATP) در این دو حالت، با هم مقایسه کردند. نتیجه این آزمایش نشان داد که ریخت‌شناسی و سطح ATP یاخته اپی‌تلیوم کشت‌شده، در مجاورت با سرم ۲۰ درصد اتولوگ بهتر از گروه دیگر (هایپرملوز ۰/۳ درصد) حفظ شده است.

استفاده از سرم اتولوگ به عنوان درمان کمکی در ضایعات PED نیز ارزشمند ارزیابی شده است. در یک مطالعه آینده‌نگر^{۲۰}، ۷۰ مورد PED در ۶۳ بیمار، علاوه بر درمان دارویی معمول، تحت درمان با سرم اتولوگ رقیق‌نشده نیز قرار گرفتند. در ۴۵ مورد، این نقایص پس از پیوند قرنیه رخ داده بودند. پس از ۱۴ روز درمان، ۵۷ مورد بهبود یافتند و ۹ مورد (۱۶ درصد) دو ماه پس از قطع سرم اتولوگ، دوباره عود کردند. اندازه و عمق ضایعه با موفقیت درمان رابطه‌ای نداشت اما ضایعات عمیق‌تر پاسخ کم‌تری به درمان می‌دادند.

درمان کراتوپاتی نوروتروفیک (NK) به کمک سرم اتولوگ، نخست به صورت گزارش موردی^{۲۵،۲۶} و سپس در چند مجموعه موارد^{۲۷،۲۸} در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. این درمان همراه با سیانواکریلات، تارسورافی و تتراسیکلین خوراکی (در NK به دنبال عفونت هرپسی^{۲۵}) و یا همراه با بستن سوراخ اشکی (در NK به دنبال عمل لیزیک^{۲۶}) موثر بوده است. هم‌چنین دیده شده است که استفاده از سرم اتولوگ همراه با لنز تماسی پانسمانی، در مواردی که پیوند پرده آمیون یا کراتوپلاستی موثر نبوده است؛ به طور میانگین پس از ۲ هفته، باعث بهبود آسیب اپی‌تلیوم شده است^{۲۷}. گرچه در بعضی از این چشم‌ها، این زمان ممکن است تا ۹۰ روز نیز طول بکشد. استفاده تنها از قطره چشمی سرم اتولوگ در بیماران دچار NK، علاوه بر التیام اپی‌تلیوم (بین ۶ تا ۳۲ روز)، می‌تواند باعث بهبود حس قرنیه و بهترین دید اصلاح‌شده در بیماران نیز بشود^{۲۸}.

تسهیل التیام اپی‌تلیوم در نقایص اپی‌تلیومی پایدار

Tsubota و همکاران^{۱۷} در سال ۱۹۹۹ و Garcia-Jimenez و همکاران^{۲۹} در سال ۲۰۰۳، قطره چشمی ۲۰ درصد سرم اتولوگ را برای درمان نقایص اپی‌تلیومی پایدار قرنیه (PED) به کار بردند. بسیاری از بیماران، به طور هم‌زمان، کمبود لایه آبکی اشک یا کمبود حس قرنیه نیز داشتند. نقص‌های اپی‌تلیومی قرنیه، به‌رغم استفاده از لوبریکانت‌ها یا لنزهای تماسی پانسمانی، برای بیش‌تر از ۲ هفته ادامه داشتند. این بیماران به دنبال جراحی پیوند کراتولیمبال دچار نقص پایدار اپی‌تلیوم شده بودند. از ۱۶ بیمار مورد بررسی در مطالعه Tsubota، ۶ نفر به سندرم استیون-جانسون یا پمفیگویید سیکاتریسی، ۳ نفر به کراتیت هرپسی، ۲ نفر به GVHD، یک نفر به کراتوپاتی ناشی از پرتوتابی و ۴ نفر به کراتوپاتی ناشی از پیوند قرنیه مبتلا بودند. بر اساس این مطالعه، قطره چشمی سرم اتولوگ برای ترمیم نقایص اپی‌تلیومی پایدار موثر بود؛ به طوری که این نقایص در ۴۳/۸ درصد در مدت دو هفته و در ۶۲/۵ درصد بیماران در عرض یک ماه بهبود یافتند. ترمیم کامل زخم با مدت زمان نقص اپی‌تلیومی قبل از شروع درمان با سرم، همبستگی منفی داشت. در این مطالعه برای کشف نقایص اپی‌تلیومی قرنیه، از رنگ‌آمیزی فلورسین استفاده شد. محققان

سندرم ضایعه عودکننده (RES)

در یک مطالعه هم‌گروهی آینده‌نگر^{۳۱}، ۱۱ بیمار با RES یک‌طرفه به دنبال مصدومیت، تحت درمان با قطره اشک مصنوعی و قطره چشمی سرم اتولوگ ۲۰ درصد قرار گرفتند. این درمان سه بار در روز به مدت ۳ ماه ادامه پیدا کرد. طی دوره پی‌گیری (میانگین ۹/۴ ماه)، میزان عود از ۲/۲ به ۰/۰۲۸ در ماه کاهش پیدا کرد. البته با توجه به طبیعت خودبه‌خود بهبودیابنده RES ناشی از مصدومیت و نیز این نکته که فاصله زمانی صدمه تا درمان، مورد اشاره قرار نگرفته است؛ این داده‌ها را باید با احتیاط تفسیر کرد.

خشکی چشم ناشی از سایر بیماری‌ها

از قطره سرم اتولوگ برای درمان خشکی شدید چشم به دنبال بازسازی سطح چشم نیز استفاده شده است. در یک مطالعه^{۳۲}، ۱۴ چشم از ۱۱ بیمار (که ۷ مورد مبتلا به پمفیگوبید سیکاتریسی و ۴ نفر دچار سندرم استیون-جانسون بودند) با ترکیبی از پیوند آلوگرافت لیمبوس، پیوند پرده آمیون و تارسورافی درمان شدند و بعد از جراحی، قطره سرم اتولوگ ۲۰ درصد، هر ۱۵ دقیقه برای آن‌ها تجویز شد. بیماران به طور میانگین به مدت ۱۴۳ روز پی‌گیری شدند و به استثنای عود خفیف سیمبلفارون، عمل بازسازی سطح چشم در ۱۲ مورد موفقیت‌آمیز بود. جراحی در ۲ چشم موفقیت‌آمیز نبود. این دو چشم که متعلق به دو جوان بودند؛ دچار ارتشاح و نورگزایی شدید سطح چشم بودند. نویسندگان این مقاله، سه سال بعد در یک مطالعه^{۳۳} مشاهده کردند که در بیماران جوان مبتلا به سندرم استیون-جانسون، بازسازی سطح چشم به‌رغم استفاده از سرم اتولوگ، موفقیت‌آمیز نیست.

در مطالعه Poon و همکارانش نیز^{۳۴} دو بیمار تحت درمان با این قطره قرار گرفته بودند که به دنبال پیوند قرنیه دچار PED و سپس سوراخ‌شدگی قرنیه شده بودند. گرچه این بیماران پس از یک هفته، ۱۰۰ درصد بهبود یافتند اما با قطع دارو، وضعیت آنان دوباره رو به وخامت گذاشت.

تهیه و استفاده^{۱۷-۲۴}

فرآیندهای تهیه قطره سرم، براساس موارد منتشرشده، یا ناکاملند و یا تفاوت‌های زیادی بین آن‌ها به چشم می‌خورد.

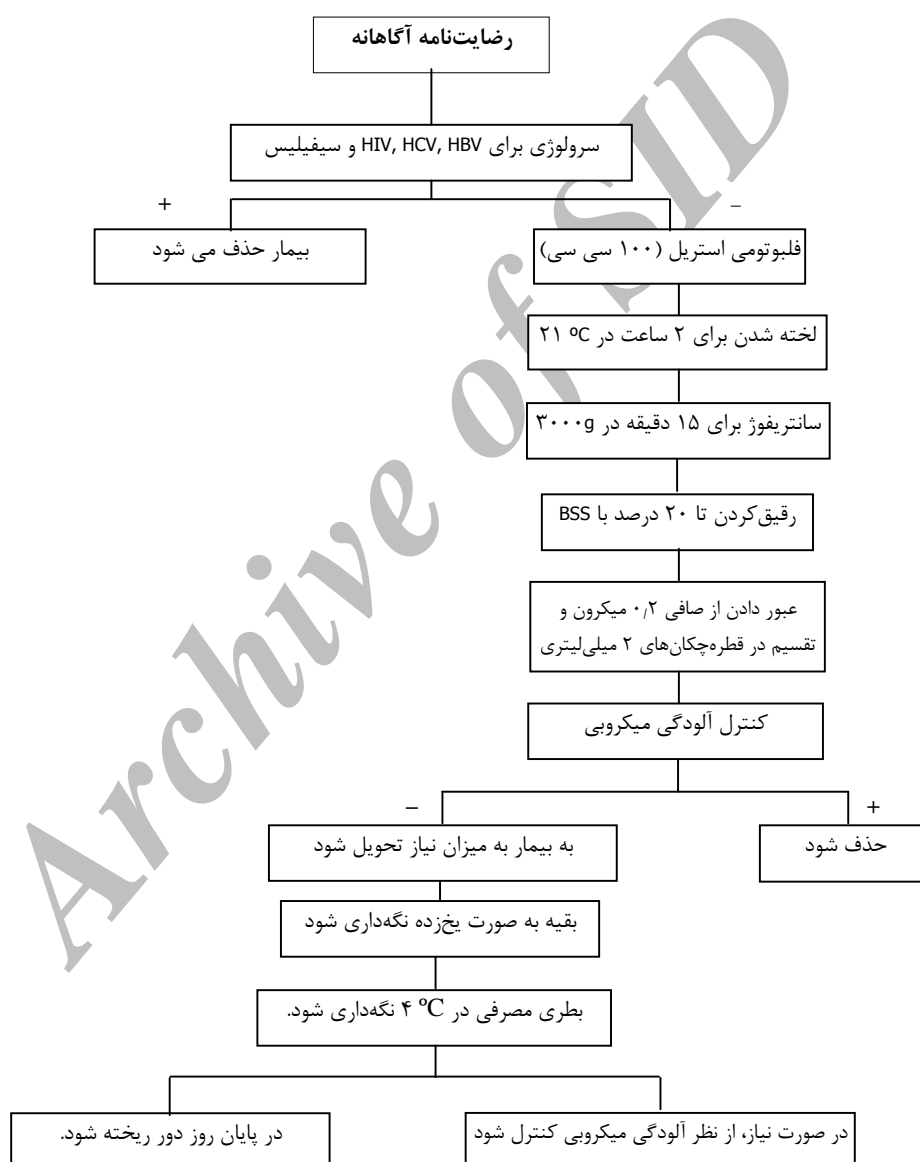
ابتدا مناسب بودن بیماران برای اهدای خون مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. آزمایش‌های سرولوژیک از نظر هپاتیت B (HBV)، هپاتیت C (HCV)، سیفیلیس و ایدز (HIV) انجام می‌شوند؛ شامل HBSAg آنتی‌بادی‌های علیه HCV، HIV-I/HIV-II، HIV-NAT، سیفیلیس، HCV-NAT و در صورتی که سرولوژی مثبت باشد؛ بیمار برای اهدای خون مناسب نیست.

بعد از توضیح کامل به بیمار واجد شرایط در رابطه با طبیعت آزمایشگاهی کار، عوارض بالقوه و درمان‌های جایگزین دیگر، رضایت‌نامه آگاهانه از بیمار اخذ می‌شود. خون‌گیری از سیاهرگ جلوی آرنجی (حفره antecubital)، تحت شرایط آسپتیک انجام و ۱۰۰ میلی‌لیتر خون کامل (whole blood) داخل ظروف استریل ریخته می‌شود. به منظور اطمینان از کامل شدن لخته، ظروف به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق در وضعیت ایستاده قرار می‌گیرند. سپس ظروف داخل یک سانتریفوژ آزمایشگاهی به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g قرار می‌گیرند. سرم باقی‌مانده تحت شرایط استریل، زیر هواکش جریان لایه‌ای (laminar air flow hood)، با سرنگ یک‌بارمصرف ۵۰ میلی‌لیتری خارج می‌شود. معمولاً با این روش، از ۱۰۰ میلی‌لیتر خون کامل، ۳۰ تا ۳۵ میلی‌لیتر سرم به دست می‌آید. سرم به دست آمده به نسبت ۱ به ۵ با محلول نمکی متعادل (BSS) استریل رقیق می‌شود و سپس از صافی‌های استریل مینی پور ۰/۲ میکرونی عبور داده می‌شود (filter sterilization). سرم به دست آمده به آرامی تکان داده می‌شود تا کاملاً هوموژنیزه گردد و سپس داخل قطره‌چکان‌های استریل ریخته می‌شود. درپوش قطره‌چکان‌ها بسته و برچسبی شامل نام، تاریخ تولد بیمار و تاریخ تولید، بر روی آن چسبانده می‌شود.

این فرآورده باید به صورت یخ‌زده نگهداری شود و حداکثر تا ۳ ماه بعد از تولید، باید مصرف گردد. بهتر است که ۲ میلی‌لیتر از آن برای ارزیابی میکروبیولوژیک به آزمایشگاه فرستاده شود. این سرم معمولاً ۴ ساعت پس از خون‌گیری قابل استفاده است ولی فقط در صورتی مورد استفاده قرار می‌گیرد که سرولوژی دهنده منفی باشد و آزمایش میکروبیولوژی محصول تهیه‌شده نیز منفی باشد. معمولاً قطره ۸ بار در روز استفاده می‌شود و هر روز یک قطره‌چکان جدید باز می‌گردد. بهتر است بعد از باز شدن از حالت انجماد، در حرارت +۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود

۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل حفظ کردن نیست؛ ممکن است سرم را برای مدت کوتاه‌تری در فریزر نگهداری کرد. هر مقدار سرم باقی‌مانده و شیشه آن در پایان روز دور ریخته خواهد شد. مراحل مختلف تهیه، تولید و مصرف قطره سرمی در نمودار (۱) ارائه شده‌اند.

و بعد از ۱۶ ساعت، با زباله خانگی (household waste) دور ریخته شود. باقی‌مانده قطره‌چکان‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا ۳ ماه نگهداری می‌شوند. اگر فریزر دارای دماسنج نیست؛ بهتر است یک دماسنج داخل آن قرار گیرد و درجه حرارت آن به طور مرتب پایش شود. اگر درجه حرارت



HBV: hepatitis B virus, HCV: hepatitis C virus, HIV: human immunodeficiency virus, BSS: balanced salt solution

نمودار ۱- مراحل مختلف تهیه و کاربرد قطره سرم

تفاوت‌های تولید

شیوه تهیه قطره سرم ۲۰ درصد انسانی در مرکز بیماری‌های سطح چشم (روش Tseng، مذاکره شخصی) تحت هواکش با جریان لایه‌ای (laminar flow hood)، در جداول ۳ و ۴ ارائه شده‌اند.

سرم بیماران متفاوت، به طور قطع متفاوت است. به علاوه، عوامل تولید به میزان چشم‌گیری بر ویژگی‌های بیوشیمیایی محصول تولیدشده اثر دارند (جدول ۲). تاثیر سانتریفوژ، به نیروی g سانتریفوژ و زمان چرخیدن نمونه بستگی دارد. سانتریفوژ ۳۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه، باعث جداسازی بسیار خوب سرم از لخته خون می‌شود؛ بدون این که همولیزی ایجاد کند.^{۳۴} اگر نیروی g کم باشد یا زمان سانتریفوژ کم‌تر باشد؛ غشای پلاکت‌ها در سرم باقی می‌مانند و اگر غلظت آن‌ها زیاد باشد؛ باعث آپوپتوز می‌شوند.^{۳۵} باید توجه داشت که نیروی g نه فقط به تعداد چرخش‌های پروانه (rotor) در دقیقه، یعنی rpm (revolutions of the rotor per minute) بستگی دارد بلکه به قطر میله پروانه نیز بستگی دارد. تفاوت در نیروی g در مطالعات منتشرشده، حداقل یک واحد لگاریتمی است. چون TGF- β بالقوه ترمیم زخم اپی‌تلیومی را کم می‌کند؛^{۱۹} Tsubota رقیق کردن سرم با محلول نمکی به میزان ۱:۵ را توصیه کرد. به هر حال باید توجه داشت که به طور هم‌زمان، غلظت سایر عوامل رشدی مانند EGF که تزاید اپی‌تلیوم را تسریع می‌کند نیز کم می‌شود. به علاوه، غلظت و نوع ماده رقیق‌کننده در قطره‌های سرم، به میزان قابل ملاحظه‌ای متغیر است. معمولاً از ظرف‌های مصرفی روزانه (dosage container) استفاده می‌گردد که در انتهای روز دور ریخته می‌شوند. با این حال، رقیق کردن با کلرامفنیکل ۰/۵ درصد به وسیله برخی محققان پیشنهاد شده است تا بتوان قطره‌چکان‌ها را تا یک هفته به کار برد.^{۳۶،۳۷} بر اساس مطالعات محیط آزمایشگاهی (in vitro)، اغلب از قطره سرم ۲۰ درصد رقیق‌شده در BSS استفاده می‌گردد.^{۳۸}

جدول ۲- مولفه‌های مهم در تولید قطره سرم

مولفه تولید	تفاوت‌ها در مقالات منتشرشده ^{۱۷-۲۴}
مرحله لخته شدن (روز)	۲-۵
نیروی سانتریفوژ (g)	۳۰۰-۴۰۰ (معادل ۵۰۰-۱۵۰۰ rpm)
زمان سانتریفوژ (دقیقه)	۵-۲۰
غلظت (درصد)	۲۰، ۳۳، ۵۰ یا ۱۰۰
مابع رقیق‌کننده	محلول NaCl (۰/۹ درصد)، BSS، قطره چشمی کلرامفنیکل (۰/۵ درصد)
ظرف	سرنگ انسولین ۱-۶ ml یا قطره‌چکان
دمای دخیره‌سازی (°C)	۲۰- تا ۴+
کاربرد روزانه	۳ تا ۲۴ یک بار

rpm: rounds per minute, BSS: balanced salt solution

جدول ۳- مواد مصرفی در تهیه قطره سرم ۲۰ درصد به روش Tseng

Supplies	Supplier/ cat
Sterile BSS (Alcon)	NDC 0065-0765- 50 VWR, 20171
Sterile 10 ml pipettes	Fisher, 13-676-10J Fisher, 13-676-10E
50 ml falcon tubes	Falcon, 2098
Sterile forceps	
20 ml sterile syringe	B/D#309661
18 G 1 1/2 needle	B/D#305196
Sterile 7 ml steril dropper bottles	Medi-Dose, 9914539
	250 ml Corning, 431096
Filter system	50 ml Millipore SCGP00525

جدول ۴- روش تهیه سرم ۲۰ درصد به روش Tseng

Centrifuge the blood sample contained in the vacutainer at 3400 rmps for 5 min
Transfer the serum from the vacutainer to a sterile 50 ml tube
Determine the volume of the serum by the graduations on the tube
Calculate the volume of BSS to be added. Volume of serum from previous step 7.3 x4
Using 20 cc syringe with 18 GI 1/2 needle add the volume of BSS calculated on previous step unto the 50 ml tube containing the serum.
Transfer the entire volume into a filter system
Apply vacuum and to the system and collect the volume into the receiver
Remove Steri Dropper bottles from the box with a sterile forceps, place bottles in the LFH
Pipette 7 ml of the diluted serum into sterile eye drop bottles
Place the receiver and drop bottles into a Ziploc bag and seal
Label the bags: Name of medication, Date of preparation, Technician name
Give to designated ocular surface center staff immediately

مشکلات و نگرانی‌ها

پایداری

اندازه‌گیری مقدار عوامل رشدی، ویتامین A، TGF- β و فیبرونکتین در سرم‌های اتولوگ که در دماهای مختلف (۴+ و ۲۰- درجه سلسیوس) و به مدت‌های متفاوت (به ترتیب، ۱ و ۳ ماه) ذخیره شده بودند؛ نشان داده است که ذخیره‌سازی سرم اتولوگ در یخچال و در دمای ۴°C به مدت یک ماه و نیز منجمد کردن آن در دمای ۲۰°C - و نگهداری به مدت ۳ ماه، بدون افت کیفیت سرم، قابل انجام است. البته طبیعی است که مشابه سایر مایعات بدن، در دمای ۴°C، با گذشت زمان، غلظت پروتئین‌های آن کاهش خواهد یافت. بنابراین در صورت در دسترس بودن فریزر، بهتر است که ویال‌های به کار نرفته را در فریزر نگهداری کرد تا حداکثر فعالیت اپی‌تلیوتروفیک عوامل رشدی آن حفظ شود.^{۱۹}

استریلیتی و خطر ایجاد عفونت

اگرچه ویژگی‌های ضد میکروبی سرم کاملاً شناخته شده‌اند ولی تاکنون به طور کمی برای قطره‌های سرمی رقیق‌شده و سردشده، اندازه‌گیری نشده‌اند. FOX و همکارانش^{۱۸} از قطره‌های چشمی تهیه‌شده از سرم، کشت تهیه کردند و مشاهده نمودند که در صورت نگهداری این قطره‌ها در ۲۰°C - حداکثر تا ۳ ماه و در ۵ تا ۲۵°C، هیچ‌گونه باکتری رشد نمی‌کند. یکی از مشکلات استفاده طولانی‌مدت از قطره‌های چشمی استریل، امکان آلوده شدن آن‌ها حین استفاده است. با این حال، دیده شده است که در استفاده از قطره‌های چشمی سرم اتولوگ در بیمارستان و توسط افراد آموزش‌دیده، تا ۴ روز احتمال آلودگی اندک است.^{۳۹} از طرف دیگر، هنگام استفاده از این قطره در خانه و توسط خود بیمار، احتمال ایجاد کراتیت میکروبی و نیز آلودگی قطره‌چکان وجود دارد. از آن‌جا که دوره درمانی در بیماری‌های سطح چشم طولانی است و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به قطره‌های چشمی سرم اتولوگ، باعث کاهش ظرفیت بازسازی اپی‌تلیوم می‌شود؛ به نظر می‌رسد که بهتر است به جای بستری کردن بیماران، از ویال‌های یک‌روزه این قطره‌ها استفاده کرد.

استانداردسازی

تاکنون تولید و نیز نحوه استفاده از قطره چشمی سرم اتولوگ استاندارد نشده است. در ضمن، هنوز مشخص نشده است که آیا تصفیه سرم برای حذف اجسام یاخته‌ای خون لازم است یا خیر. FOX^{۱۸} پیشنهاد کرده است که سرم برای حذف رشته‌های فیبرین، تصفیه شود. نتایج مختلفی که راجع به اثربخشی سرم اتولوگ در مطالعات گوناگون به دست آمده‌اند حاکی از آنند که استاندارد و بهینه‌سازی تولید قطره‌های چشمی سرم اتولوگ، پیش از انجام هرگونه کارآزمایی بالینی تصادفی شده برای ارزیابی اثربخشی واقعی این قطره‌ها، یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر است.

کنترل کیفیت و رضایت‌نامه

قبل از کاربرد قطره سرم، بیمار باید به صورت کتبی در جریان طرح درمانی قرار گیرد و با ماهیت آزمایشگاهی کار و خطرهای احتمالی و سایر روش‌های جایگزین درمانی آشنا شود. باید از بیمار رضایت‌نامه آگاهانه گرفته شود. کم‌خونی خفیف و یا اختلالات خفیف گردش خون، در مواردی که حجم کمی از خون (۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر) گرفته می‌شود؛ کنترااندیکاسیونی محسوب نمی‌شوند. به هر حال، برای به حداقل رساندن خطر آلودگی باکتریایی، هیچ‌خونی در موارد مشکوک به سپتی‌سمی نباید گرفته شود و برای به حداقل رساندن خطر انتقال ویروس‌ها به دیگران، بیمارانی که آزمایش HIV، HBV، HCV یا سیفیلیس مثبت دارند باید حذف شوند. آلودگی میکروبی، خطر بالقوه در تولید و استفاده از قطره‌های چشمی سرم می‌باشد. تولید در شرایط استریل که با ضد عفونی خوب پوست شروع می‌شود؛ دارای اهمیت به سزایی است. بهتر است فرآوری بعدی محصولات، در یک سامانه بسته انجام شود. آزمایش میکروبیولوژیک محصول، قبل از به کار بستن آن، برای رد کردن آلودگی میکروبی ناشی از مراحل تولید باید انجام شود. برای به حداقل رساندن خطر انتقال عفونت به افراد دیگر، بهتر است دهنده خون از نظر HIV، HBV و HCV کنترل شود. محصول فقط باید زمانی به کار رود که آزمایش‌های میکروبیولوژیک و سرولوژیک منفی باشند. قبل از خون‌گیری و کاربرد قطره اشک، هویت بیمار باید تایید شود.

مهاجرت یاخته‌های اپی‌تلیومی سطح چشم، به وسیله قطره سرمی، بهتر از جایگزین‌های دارویی اشک که فاقد ماده نگاهدارنده هستند؛ حفظ می‌شوند. در مطالعات بالینی، اثربخشی متغیری از قطره‌های چشمی سرم به عنوان مثال در زخم‌های اپی‌تلیومی دایم یا چشم‌های خشک مقاوم به درمان‌های معمولی، نشان داده شده است. بخشی از این تفاوت‌ها می‌تواند به تفاوت در روش ساخت این قطره‌ها مربوط باشد. قبل از انجام یک کارآزمایی بالینی شاهددار تصادفی برای ارزیابی پتانسیل درمانی حقیقی این رویکرد درمانی در بیماری‌های سطح چشم، مولفه‌های تولید آن باید به بهترین نحو تعیین شوند. تا زمانی که چنین مطالعه‌ای انجام شود؛ کاربرد قطره سرم، یک رویکرد آزمایشی است. بنابراین تمام محدودیت‌های قانونی کاربردی باید به دقت مورد ملاحظه قرار گیرند و کاملاً ثبت شوند و پیش از درمان، رضایت‌نامه آگاهانه از همه بیماران گرفته شود.

شیشه‌ها باید برچسب واضحی داشته باشند که بر روی آن نام بیمار، تاریخ تولد، نوع محصول، نام و آدرس سازنده و تاریخ ساخت نوشته شده باشد. برای به حداقل رساندن تغییرات محصول و به حداکثر رساندن سلامت کاربرد آن باید تمام مراحل ساخت بر روی برگه نوشته شده باشند. در طول ساخت، هر مرحله ساخت و کاربرد آن باید ثبت شود. بنابراین مشخص است که باید مراحل بسیار مستحکمی برای ساخت صحیح، کنترل کیفیت و ثبت وقایع طی شوند؛ این مراحل از قبل از گرفتن خون شروع و در سرتاسر طول دوره درمانی ادامه می‌یابند.

نتیجه‌گیری

لوپریکانت‌های دارویی، اثر تغذیه‌ای اندکی برای سطح چشم دارند ولی قطره‌های چشمی ساخته‌شده از سرم اتولوگ دارای ویژگی‌های بیوشیمیایی شبیه اشک و دارای ترکیبات تغذیه‌ای می‌باشند. در مطالعات آزمایشگاهی، حیات، تکثیر و

منابع

- 1- Tseng SCG, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;124:825-835.
- 2- Solomon A, Touhami A, Sandoval H, Tseng SCG. Neurotrophic keratopathy: basic concepts and therapeutic strategies. *Comp Ophthalmol Update* 2000;3:165-174.
- 3- Van Setten GB, Viinikka L, Tervo T, Pesoren K, Tarkkonen A, Perheentup J. Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989;227:184-187.
- 4- Ubels J, Loley K, Rismondo V. Retinol secretion by the lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1261-1268.
- 5- Phan TM, Foster CS, Boruchoff SA, Zagachin LM, Coluin RB. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol* 1987;104:494-501.
- 6- Tervo T, Vesaluoma M, Bennett GL, Schurall R, Helenn M, Liang Q, et al. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res* 1997;64:501-504.
- 7- Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J. Treatment of severe dry eye [letter]. *Lancet* 1996;348:123.
- 8- Yokoi N, Komura A, Nishida K, Kinoshita S. Effectiveness of hyaluronan on corneal epithelial barrier function in dry eye [see comments]. *Br J Ophthalmol* 1997;81:533-536.
- 9- Ubels J, Williams K, Lopez Bernal D, Nishida S. Evaluation of effects of a physiologic artificial tear on the corneal epithelial barrier: electrical resistance and carboxyfluorescein permeability. In: Sullivan DA, ed. *Lacrimal gland, tear film and dry eye syndromes*. New York: Plenum Press; 1994: 441-452.
- 10- Nelson JD, Drake MM, Brewer JTT, Tuley M. Evaluation of a physiological tear substitute in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:453-457.
- 11- Lopez Bernal D, Ubels JL. Artificial tear composition and promotion of recovery of the damaged corneal epithelium. *Cornea* 1993;12:115-120.
- 12- Nelson JD, Gordon JF. Topical fibronectin in the treatment of keratoconjunctivitis sicca.

- Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group. *Am J Ophthalmol* 1992;114:441-447.
- 13- Gordon JF, Johnson P, Musch DC. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 1995;119:281-287.
- 14- Geerling G, Sieg P, Bastian GO, Laqua H. Transplantation of the autologous submandibular gland for most severe cases of keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 1998;105:327-335.
- 15- Chaumeil C, Liotet S, Kogbe O. Treatment of severe eye dryness and problematic eye lesions with enriched bovine colostrum lactoserum. In: Sullivan DA, ed. *Lacrimal gland, tear film and dry eye syndromes- basic science and clinical relevance*. New York, London: Plenum Press; 1994: 595-599.
- 16- Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:948-956.
- 17- Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-1999.
- 18- Fox RI, Chan R, Michelson J, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-461.
- 19- Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-395.
- 20- Rocha EM, Pelegrino FS, de Paiva CS, Vigorito AC, de Souza CA. GVHD dry eyes treated with autologous serum tears. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1101-1103.
- 21- Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:579-583.
- 22- Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-1197.
- 23- Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, Yi Q, McKelvie P, McCarty DJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 2001;20:802-806.
- 24- Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001;20:807-810.
- 25- Diaz Rodriguez E, Toledano Fernandez N, Arteaga Sanchez A, Gomez S. Neurotrophic keratopathy management with cyanoacrylate tarsorrhaphy and autologous serum. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2003;78:119-122.
- 26- Fuchsluger TA, Steuhl KP, Meller D. Neurotrophic keratopathy--a post-LASIK case report. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2005;222:901-904.
- 27- Schrader S, Wedel T, Moll R, Geerling G. Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;17:1345-1349.
- 28- Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004;111:1115-1120.
- 29- Garcia-Jimener V, Veiga Villaverde B, Baamonde Arbaiza B, Calme Carpintero I, Celemin Vinuela ML, Simo Martinez RM. The elaboration, use and evaluation of eye-drops with outologous serum in cornela lesions. *Farm Hosp* 2003;27:21-25.
- 30- Ferreira de Souza R, Kruse FE, Seitz B. Autologous serum for otherwise therapy resistant corneal epithelial defects-prospective report on the first 70 eyes. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001;218:720726.
- 31- Del Castillo JM, de la Casa JM, Sardina RC, Fernandez RM, Feijoo JG, Gomez AC, et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 2002;21:781-783.
- 32- Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.

- 33- Tsubota K, Shimazaki J. Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1999;128:573-581.
- 34- Thomas L. Labor und Diagnose. 5. Auflage ed: *TH-Books*; 1998: 1494.
- 35- Dugrillon A, Sauer R, Nguyen XD. Platelets applied to wounds and in tissue regeneration: induction of proliferation and apoptosis by platelets. In: Mempel W, Schramm W. Artificial tear therapy and its application in medicine. 3rd ed. Philadelphia: William and Wilkins; 2002: 70-71.
- 36- Nakamura M, Nishida T, Mishima H, Otori T. Effects of antimicrobials on corneal epithelial migration. *Curr Eye Res* 1993;12:733-740.
- 37- Berry M, Gurung A, Easty DL. Toxicity of antibiotics and antifungals on cultured human corneal cells: effect of mixing, exposure and concentration. *Eye* 1995;9:110-115.
- 38- Herminghaus P, Horwig D, Sauer R, Bluthner K. Epitheliotrophe kapazität von serum-und plasma-augentropfen-Einfluss der Zentrifugation. *Ophthalmologie* 2004;101:45-49.
- 39- Sauer R, Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmologie* 2004;101:705-709.[Abstract]

Archive of SID