

ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ. 2023. Т. 20, № 3. С. 31–36.
 НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
 УДК 612.843.15

А. И. Лопатин¹✉, **Н. А. Пасатетская**², **Е. Г. Удовенко**³, **Е. В. Лопатина**⁴

^{2, 3, 4} Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

^{1, 4} Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

¹ ✉ lopatin.alexey@yandex.ru

² npasatetskaja@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8979-6460>

³ udovienko_ekaterina@mail.ru

⁴ evlopatina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0729-5852>

УЧАСТИЕ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ЭМБРИОНАЛЬНОЙ СЕТЧАТКИ

Аннотация. В настоящее время изучаются перспективы применения адrenoблокаторов в терапии ретинопатии недоношенных, а биогенные амины используются для инотропной поддержки при выхаживании детей с низкой и экстремально низкой массой тела. Цель исследования – изучить вклад адренорецепторов в регуляцию роста эмбриональной сетчатки в опытах *in vitro*. В работе использован метод органотипической культуры ткани сетчатки. Объектами исследования являлись эксплантаты ткани сетчатки 10–12-дневных куриных эмбрионов. В условиях органотипического культивирования ткани сетчатки обнаружен тропотропный эффект норадреналина (10^{-12} М). Этот эффект реализовывался при участии $\alpha 1$ -адренорецепторов. Ингибиторный анализ показал, что ретинотоксический эффект высоких концентраций катехоламинов основан на активации β -адренорецепторов. В прямых экспериментах на уровне *in vitro* зарегистрирован ретенопротективный эффект пропранолола. Для подтверждения перспектив применения пропранолола при лечении ретинопатий новорожденных необходимы дополнительные исследования на моделях *in vivo*. Особое внимание необходимо уделить реакциям со стороны сердечно-сосудистой системы, поскольку есть данные о провоцировании брадикардии и гипотензии при использовании пропранолола у новорожденных. Сочетание экспериментов *in vitro* и *in vivo* позволит корректно рассчитать дозы изучаемого препарата и минимизировать возможные побочные эффекты от его применения в дальнейшем.

Ключевые слова: ретинопатия недоношенных, адренорецепторы, органотипическая культура ткани, катехоламины

VOLGOGRAD SCIENTIFIC AND MEDICAL JOURNAL. 2023. VOL. 20, NO. 3. P. 31–36.
 ORIGINAL ARTICLE

A. I. Lopatin¹✉, **N. A. Pasatetskaja**², **E. G. Udovenko**³, **E. V. Lopatina**⁴

^{2, 3, 4} Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

^{1, 4} Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

¹ ✉ lopatin.alexey@yandex.ru

² npasatetskaja@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8979-6460>

³ udovienko_ekaterina@mail.ru

⁴ evlopatina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0729-5852>

PARTICIPATION OF ADRENORECEPTORS IN THE REGULATION OF THE GROWTH OF THE EMBRYONIC RETINA

Abstract. Currently, prospects for the use of adreno-blockers in the treatment of retinopathy of prematurity are being studied, and biogenic amines are used for inotropic support when caring for children with low and extremely low body weight. The aim of the investigation; to study the contribution of adrenoceptors to the regulation of the growth of the embryonic retina in *in vitro* experiments. In the work was used the method of organotypic culture of retina tissue. The objects of the study were explants of retina tissue of 10–12-day-old chicken embryos. The trophotropic effect of norepinephrine (10^{-12} M) was detected in the conditions of the organotypic cultivation of retina tissue. This effect was realized with the participation of $\alpha 1$ -adrenergic receptors. Inhibitory analysis showed that the retinotoxic effect of high concentrations of catecholamines is based on the activation of β -adrenergic receptors. In direct experiments at the *in vitro* level, the retinoprotective effect of propranolol was registered. To confirm the prospects of using propranolol in the treatment of neonatal retinopathy, additional studies on *in vivo* models are needed. Particular attention should be paid to reactions from the cardiovascular system, since there is evidence of provoking bradycardia when using propranolol in newborns. The combination of *in vitro* and *in vivo* experiments will make it possible to correctly calculate the doses of the studied drug and minimize possible side effects from its use in the future.

Keywords: retinopathy of prematurity, adrenoceptors, organotypic tissue culture, catecholamines

Ретинопатия недоношенных – одно из наиболее тяжелых заболеваний, приводящих к неустранимой слепоте с раннего детского возраста. Степень зрелости организма ребенка, как правило, определяет частоту развития и тяжесть заболевания. С 2011 г. в России принято выхаживать младенца с возраста 22 недель, если его масса тела составляет более 500 г, и длина тела более 35 см [1]. Исходя из вышесказанного, в настоящее время осуществляется активный поиск адекватных моделей, позволяющих исследовать физиологические механизмы ретинопротекции. Сетчатка глаза куриного эмбриона является уникальным экспериментальным объектом, поскольку содержит все типы клеток, которые находятся в сетчатке человека. Сетчатка и сам орган зрения играют ведущую роль в жизнеобеспечении птенцов кур (цыплят) после вылупления из яйца. Куры относятся к выводковым птицам, им свойственно зрелорождение, бинокулярное цветное зрение и такое явление как импринтинг. Гестационный возраст 10–12-дневного куриного эмбриона соответствует 19–24 неделе пренатального развития человека. В период эмбриогенеза ткань сетчатки формируется путем регуляции координации пролиферации клеток-предшественников различными нейротрансмиттерами, включая моноамины [2]. При выхаживании младенцев с низкой и экстремально низкой массой тела для инотропной поддержки применяют катехоламины. Вклад катехоламинов в регуляцию роста эмбриональной сетчатки изучен мало.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить вклад адренорецепторов в регуляцию роста эмбриональной сетчатки в опытах *in vitro*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован метод органотипической культуры ткани сетчатки. Объектами исследования являлись эксплантаты ткани сетчатки 10–12-дневных куриных эмбрионов. Каждая серия экспериментов включала в себя 40 контрольных и 40 экспериментальных эксплантатов на каждую исследованную концентрацию действующих веществ. Фрагменты ткани сетчатки размером около 1 мм помещали в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку и культивировали в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 3 суток. Состав питательной среды описан ранее [3]. В питательную среду экспериментальных эксплантатов добавляли адреналин и норадреналин, пропранолол, урапидил согласно протоколу эксперимента. Для количественной оценки степени роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Морфометрический критерий «индекс площади» (ИП) рассчитывали как отношение общей площади эксплантата к площади исходной зоны. Значение ИП контрольных эксплантатов принимали за 100 %. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 10.0». При сравнении контрольной

и экспериментальной групп использовали *t*-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднее арифметическое \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние адреналина на рост эксплантатов ткани сетчатки исследовали в диапазоне концентрации от 10^{-4} до 10^{-12} М. Трофотропного действия препарата не обнаружено. В высоких концентрациях (10^{-4} и 10^{-5} М) адреналин оказывал ретинотоксический эффект.

ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на $95,0 \pm 2,0$ % ($n = 40$, $p < 0,001$) и $35 \pm 5,0$ % ($n = 40$, $p = 0,01$) (рис. 1).

При исследовании влияния норадреналина (10^{-4} – 10^{-12} М) на рост эксплантатов ткани сетчатки обнаружен трофотропный эффект препарата в дозе 10^{-12} М. ИП был выше контрольного значения на $40 \pm 6,0$ % ($n = 40$, $p = 0,01$). В высоких концентрациях (10^{-4} – 10^{-5} М) норадреналин, так же как и адреналин, угнетал рост эксплантатов исследуемой ткани (рис. 2).

Для изучения механизма трофотропного и ретинотоксического действия катехоламинов в питательную среду экспериментальных чашек Петри вводили неселективный β -адреноблокатор пропранолол и селективный α_1 -адреноблокатор урапидил. Предварительно оценили влияние блокаторов на рост эксплантатов ткани сетчатки.

Пропранолол в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-10} М проявлял дозозависимое действие. В концентрации 10^{-4} М препарат практически полностью угнетал рост экспериментальных эксплантатов, ИП был ниже контрольного значения на $95,0 \pm 1,8$ % ($n = 40$, $p < 0,01$). При введении в питательную среду пропранолола в концентрации 10^{-6} М ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на $32,0 \pm 5,9$ % ($n = 40$, $p = 0,014$). В следующей части работы β -адреноблокатор использовали в максимальной концентрации, которая не влияет на рост эксплантатов ткани сетчатки (10^{-8} М).

Урапидил в концентрациях 10^{-4} – 10^{-8} М на рост эксплантатов ткани сетчатки не влиял. ИП не отличался от контрольного значения. Поэтому в следующих сериях экспериментов для изучения механизма трофотропного действия катехоламинов блокатор применяли в концентрации 10^{-4} М.

Для оценки механизма трофотропного действия норадреналина эксплантаты ткани сетчатки культивировали в питательной среде, содержащей норадреналин (10^{-12} М) и пропранолол (10^{-8} М) или урапидил (10^{-4} М). Стимулирующее рост эксплантатов действие норадреналина сохранялось в присутствии β -адреноблокатора. ИП был на $37,0 \pm 6,0$ % ($n = 40$, $p = 0,02$) выше контрольного значения и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых только в присутствии норадреналина (10^{-12} М). При введении

в питательную среду совместно урапидила и норадреналина, тропотропное действие последнего отсутствовало. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения (рис. 3). Оценку ретинотоксического эффекта катехоламинов проводили

при культивировании эксплантатов в питательной среде, содержащей катехоламины в концентрации 10^{-5} М и пропранолол (10^{-8} М). Ретинотоксический эффект как адреналина, так и норадреналина на фоне β -адреноблокатора отсутствовал (рис. 4).

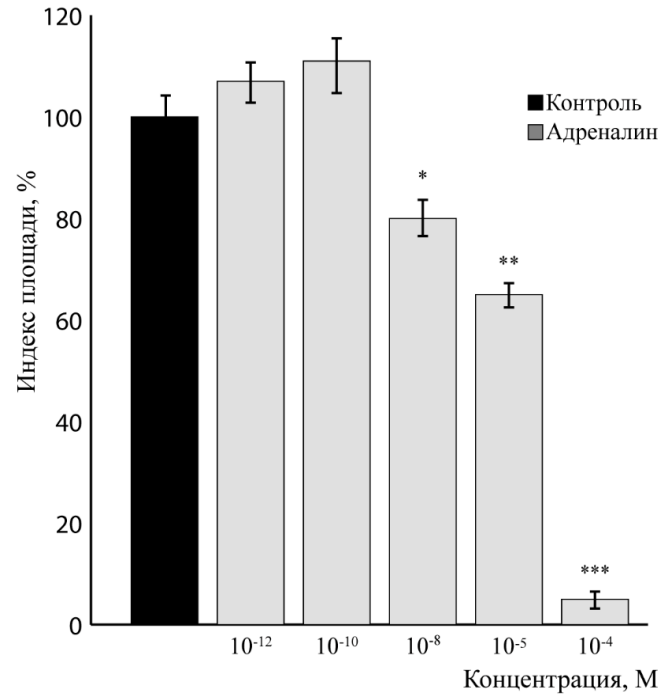


Рис. 1. Влияние адреналина на рост эксплантатов ткани сетчатки:
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольным значением

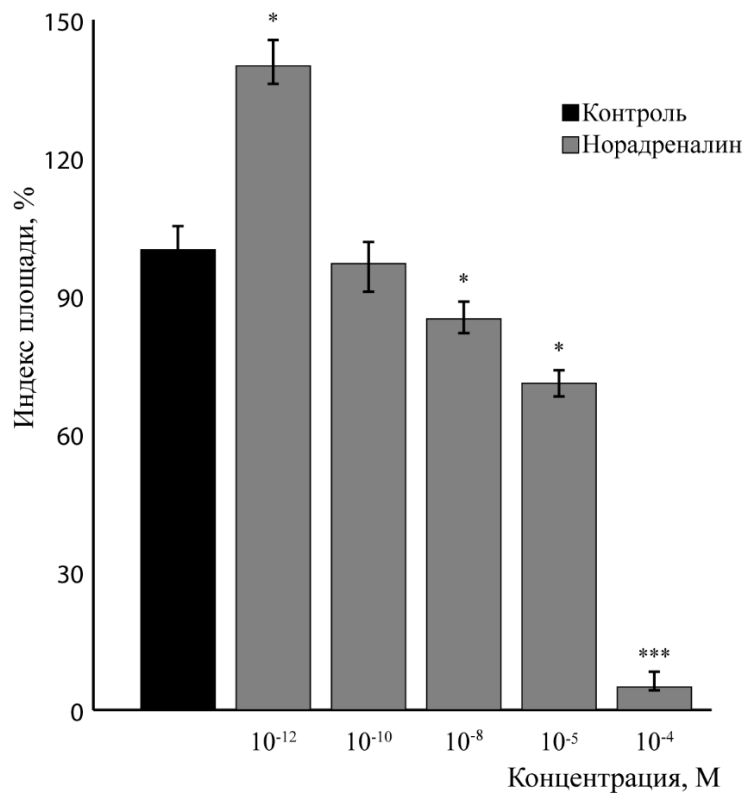


Рис. 2. Норадреналин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки:
* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольным значением

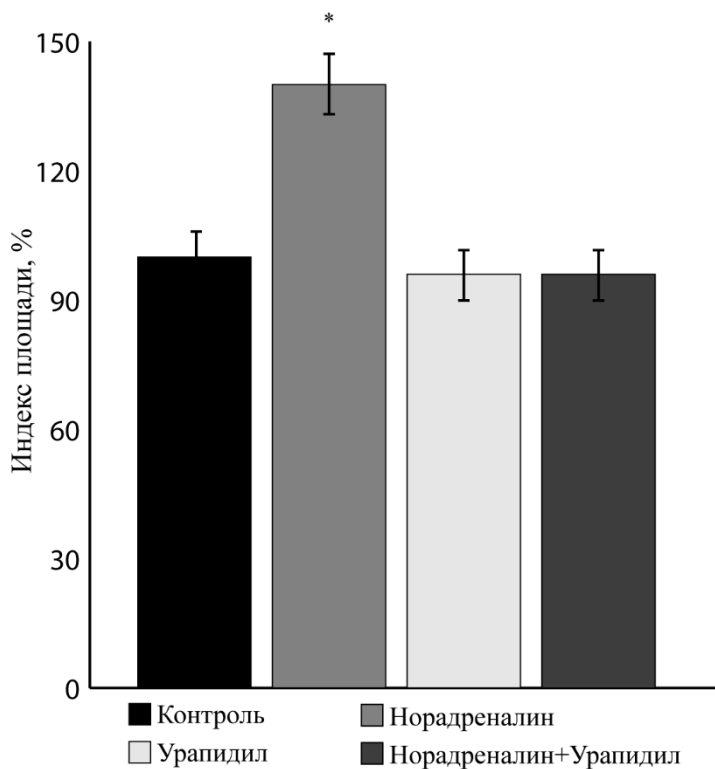


Рис. 3. Трофотропный эффект норадреналина (10^{-12} М) опосредован активацией α_1 -адренорецепторов: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольным значением

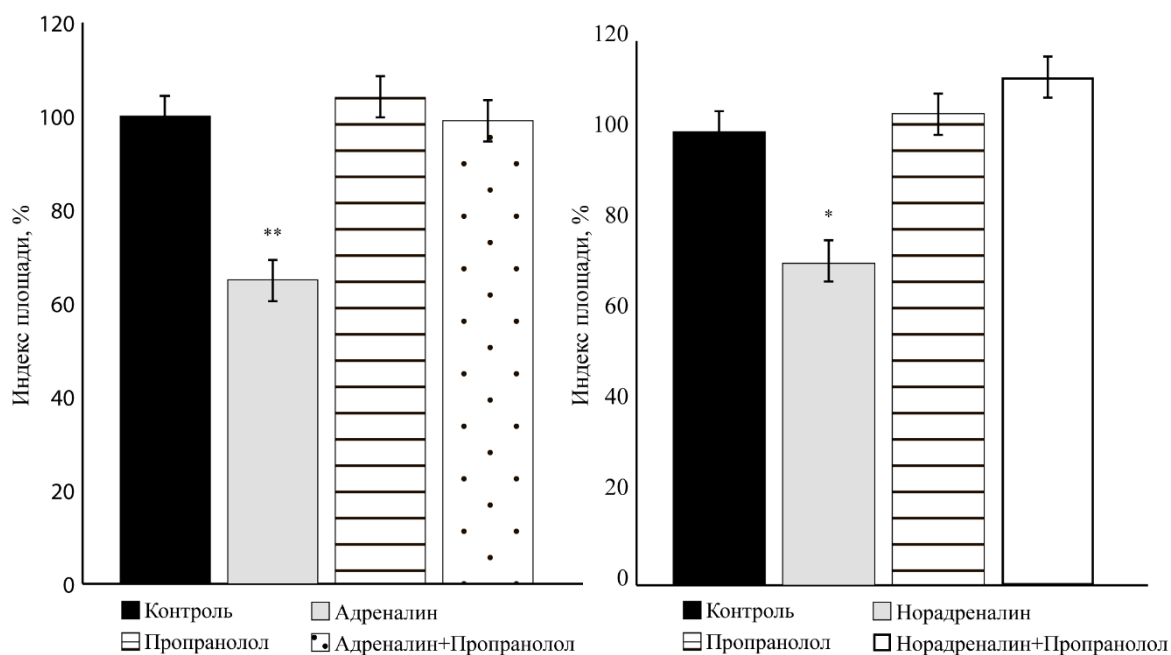


Рис. 4. Пропранолол нивелирует ретиноксический эффект катехоламинов: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольным значением

Поскольку сетчатка является тканью с высокой метаболической потребностью, неудивительно, что нарушение гемодинамики сетчатки играет критическую роль в патогенезе ряда глазных болезней. Патогенез ретинопатии недоношенных связан с нару-

шением образования новых сосудов сетчатки и изменением уже сформировавшихся сосудистых трактов. Наблюдается прекращение образования сосудов в аваскулярных зонах сетчатки, а новообразованные сосуды начинают прорастать в стекловидное тело [4].

При классическом течении заболевания высокие результаты демонстрирует применение лазеркоагуляции. Однако эта терапия разрушает части сетчатки и может привести к серьезным осложнениям в более позднем возрасте. В связи с этим разрабатываются альтернативные подходы к лечению заболевания: консервативное лечение при помощи внутривитреальных инъекций блокатора фактора роста эндотелия (VEGF), основного индуктора неоангиогенеза. Изучаются ангиогенные свойства моноаминов.

Не смотря на пристальное внимание к процессам неоангиогенеза, как ведущему патологическому фактору заболевания, нельзя игнорировать влияние препаратов на клетки сетчатки. Возможность модуляции нейропротекции в терапии ретинопатии может снизить риски оперативного лечения, а в связи с этим уменьшить осложнения анестезиологического и хирургического вмешательства. Особую роль в ретинопротекции могут играть моноамины. Доказано, что в эмбриональный период развития катехоламины проявляют трофотропные свойства и стимулируют рост ткани сердца [5] и кости [6]. Механизм трофотропного действия катехоламинов тканеспецифичен и реализуется как через β -, так и через α -адренорецепторы. Полученные ранее результаты показали, что β -адренорецепторы не вовлечены в реализацию ретиностимулирующего действия норадреналина [7].

В сетчатке зарегистрированы все типы адренорецепторов: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , β_3 [8]. α_1 -адренорецепторы локализованы преимущественно в сосудах сетчатки [9], во внешнем плексиформном слое сетчатки крысы и пигментном эпителии сетчатки крупного рогатого скота, кролика, мыши и человека, где они модулируют транспорт K^+ и Cl^- и электрические токи [10].

Результаты *in vivo* исследований влияния α_1 -адренергических агонистов на регуляцию сосудистого сопротивления и перфузию сетчатки противоречивы, что затрудняет однозначные выводы о функциональной роли α_1 -адренорецепторов [8]. Показано, что стимуляция α -адренергических рецепторов катехоламинами усиливает васкулогенез, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [11]. Вопрос об участии α_1 -адренорецепторов в регуляции ретиногенеза остается открытым. В нашем исследовании впервые показано, что трофотропное действие низких концентраций норадреналина реализуется через α_1 -адренорецепторы.

β -адренорецепторы локализованы практически во всех слоях сетчатки и играют важную роль в функционировании сосудов и нейронов сетчатки [8]. Стрессовые состояния, такие как гипоксия, резко увеличивают уровень катехоламинов в сетчатке. Считается, что активация β -адренорецепторы усиливает регуляцию индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1) и VEGF. Блокатор β -адренорецепторов, пропранолол, эффективно ингибировал повышение экспрессии VEGF, вызванное гипоксией, и сопровождающий его неоваскулярный ответ в сетчатке [4]. Ана-

логичным образом, пропранолол, вводимый подкожно, снижал уровни VEGF и HIF-1 в мышинной модели кислород-индуцированной ретинопатии (OIR). В связи с этим в настоящее время активно исследуется возможность применения пропранолола в терапии ретинопатии новорожденных. Пероральное введение препарата не было успешным, поскольку, не смотря на снижение прогрессирования заболевания, сопровождалось развитием брадикардии и гипотензии. В результате исследование было прекращено по причине роста смертности в группе лечения [12].

Были разработаны глазные микрокапли с пропранололом 0,1%, которые протестированы в многоцентровом пилотном клиническом исследовании для анализа безопасности и эффективности лечения недоношенных новорожденных со 2-й стадией ретинопатии. Однако второй этап этого исследования был прекращен, поскольку у четверых из 19 новорожденных наблюдалось прогрессирование до 2-й или 3-й стадии с дополнительным заболеванием [13]. Следовательно, несмотря на некоторые успехи, вопрос безопасности применения пропранолола для лечения ретинопатии остается открытым.

В нашем исследовании зарегистрировано ретинопротекторное действие пропранолола на фоне высоких концентрации катехоламинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода органотипической культуры ткани позволяет детально оценить физиологическую активность изучаемых веществ, поскольку отсутствуют влияния со стороны систем целого организма. Поскольку, биогенные амины используются для инотропной поддержки при выхаживании детей с низкой и экстремально низкой массой тела. Для подтверждения перспектив применения пропранолола при лечении ретинопатий новорожденных необходимы дополнительные исследования на моделях *in vivo*. Особое внимание необходимо уделить реакциям со стороны сердечно-сосудистой системы. Сочетание экспериментов *in vitro* и *in vivo* позволит корректно рассчитать дозы изучаемого препарата и минимизировать возможные побочные эффекты от его применения в дальнейшем.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Симаходский А. С., Горелик Ю. В., Горелик К. Д. и др. Смертность детей, родившихся на ранних сроках гестации, непреодолимый барьер или резерв снижения младенческой смертности? *Вопросы современной педиатрии*. 2020;19(5):340–345. <https://doi.org/10.15690/vsp.v19i5.2209>.
2. Martins R. A., Pearson R. A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res*. 2008;4(1192):37–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.076>.
3. Пасатецкая Н. А., Лопатин А. И., Кипенко А. В., Лопатина Е. В. Ремоделирование костной ткани: возможный вклад адреналина. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2017;4(56):47–50.

4. *Bancalari A., Schade R.* Update in the Treatment of Retinopathy of Prematurity. *Am J Perinatol.* 2022;39(1):22–30. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713181>.

5. *Lopatina E. V., Kipenko A. V., Pasatetskaya N. A. et al.* Modulation of the transducer function of Na⁺,K⁺-ATPase: new mechanism of heart remodeling. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016;94(10):1110–1116. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0577>.

6. *Пасатецкая Н. А., Лопатин А. И., Клишин С. И. и др.* Норадреналин регулирует остеогенез в эмбриональный период развития. *Гены и клетки.* 2021;16(4):50–53. <https://doi.org/10.23868/202112006>.

7. *Лопатина Е. В., Пенниайнен В. А., Цырлин В. А.* Исследование влияния норадреналина и селективных b1-адреноблокаторов на рост эксплантатов ткани сетчатки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012; 153(1):56–58.

8. *Ruan Y., Böhmer T., Jiang S., Gericke A.* The Role of Adrenoceptors in the Retina. *Cells.* 2020;9(12):2594. <https://doi.org/10.3390/cells9122594>.

9. *Bohmer T., Manicam C.* The alpha1b-adrenoceptor subtype mediates adrenergic vasoconstriction in mouse retinal arterioles with damaged endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171:3858–3867. <https://doi.org/10.1111/bph.12743>.

10. *Skarphedinsdottir S. B., Eysteinnsson T., Árnason S. S.* Mechanisms of Ion Transport Across the Mouse Retinal Pigment Epithelium Measured In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(6):31. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.6.31>.

11. *Tilan J., Kitlinska J.* Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. *J Oncol.* 2010; 2010:539706. <https://doi.org/10.1155/2010/539706>.

12. *Filippi L., Cavallaro G., Bagnoli P. et al.* Oral propranolol for retinopathy of prematurity: risks, safety concerns, and perspectives. *J Pediatr.* 2013;163(6):1570–1577. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.07.049>.

13. *Filippi L., Cavallaro G.* Propranolol 0.1% eye microdrops in newborns with retinopathy of prematurity: A pilot clinical trial. *Pediatric Res.* 2017;81: 307–314. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.230>.

REFERENCES

1. *Simakhodsky Anatoly S., Gorelik Yulia V., Gorelik Konstantin D. et al.* Mortality of Children Born on Early Gestational Age: is it the Impassable Barrier or the Reserve for Reducing the Infants Mortality? *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics.* 2020;19(5):340–345. <https://doi.org/10.15690/vsp.v19i5.2209>. (In Russ).

Сведения об авторах

Алексей Игоревич Лопатин – аспирант

Наталья Анатольевна Пасатецкая – кандидат биологических наук

Екатерина Григорьевна Удовенко – научный сотрудник

Екатерина Валентиновна Лопатина – доктор биологических наук, доцент

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.06.2023; одобрена после рецензирования 14.07.2023; принята к публикации 14.08.2023.

Information about the authors

Aleksei I. Lopatin – graduate student

Natalia A. Pasateckaia – Candidate of Biological Sciences

Ekaterina G. Udovenko – research associate

Ekaterina V. Lopatina – Doctor Bio Sci, Associate professor

The authors declare no conflicts of interests.

The article was submitted 16.06.2023; approved after reviewing 14.07.2023; accepted for publication 14.08.2023.

2. *Martins R. A., Pearson R. A.* Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 2008;1192:37–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.076>.

3. *Pasateckaia N. A., Lopatin A. I., Kipenko A. V., Lopatina E. V.* Remodelirovanie kostnoy tkani: vozmozhnyy vklad adrenalina. *Volgogradskij nauchno-medicinskij zhurnal = Volgograd Scientific and Medical Journal.* 2017;4 (56):47–50. (In Russ).

4. *Bancalari A., Schade R.* Update in the Treatment of Retinopathy of Prematurity. *Am J Perinatol.* 2022;39(1):22-30. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713181>.

5. *Lopatina E. V., Kipenko A. V., Pasatetskaya N. A. et al.* Modulation of the transducer function of Na⁺,K⁺-ATPase: new mechanism of heart remodeling. *Can J Physiol Pharmacol.* 2016;94(10):1110-1116. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0577>.

6. *Pasateckaia N. A., Lopatin A. I., Klimshin S. I. et al.* Norepinephrine regulates osteogenesis in the embryonic period of development. *Geny i kletki = Genes and cells.* 2021;16(4):50–53. <https://doi.org/10.23868/202112006>. (In Russ).

7. *Lopatina E. V., Pennijajnen V. A., Cyrlin V. A.* Investigation of the effect of norepinephrine and selective b1-blockers on the growth of retinal tissue explants. *Bulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2012;153(1):56–58. (In Russ).

8. *Ruan Y., Böhmer T., Jiang S., Gericke A.* The Role of Adrenoceptors in the Retina. *Cells.* 2020;9(12):2594. <https://doi.org/10.3390/cells9122594>.

9. *Bohmer T., Manicam C.* The alpha1b-adrenoceptor subtype mediates adrenergic vasoconstriction in mouse retinal arterioles with damaged endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171:3858–3867. <https://doi.org/10.1111/bph.12743>

10. *Skarphedinsdottir S. B., Eysteinnsson T., Árnason S. S.* Mechanisms of Ion Transport Across the Mouse Retinal Pigment Epithelium Measured In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2020;61(6):31. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.6.31>.

11. *Tilan J., Kitlinska J.* Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. *J Oncol.* 2010; 2010:539706. <https://doi.org/10.1155/2010/539706>.

12. *Filippi L., Cavallaro G., Bagnoli P. et al.* Oral propranolol for retinopathy of prematurity: risks, safety concerns, and perspectives. *J Pediatr.* 2013;163(6):1570–1577. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.07.049>

13. *Filippi L., Cavallaro G.* Propranolol 0.1% eye microdrops in newborns with retinopathy of prematurity: A pilot clinical trial. *Pediatric Res.* 2017;81:307–314. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.230>