

UPORABA METILENSKEGA MODRILA V ZDRAVLJENJU SEPTIČNEGA ŠOKA

THE USE OF METHYLENE BLUE IN THE TREATMENT OF SEPTIC SHOCK

AVTOR / AUTHOR:

asist. Katja Jerenec, dr. med.¹

asist. Andrej Markota, dr. med.¹

doc. dr. Polonca Ferk, mag. farm.²

¹ Univerzitetni klinični center Maribor
Oddelek za intenzivno interno medicino
Ljubljanska 5, 2000 Maribor

² Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta
Taborska ulica 8, 2000 Maribor

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

polonca.ferk@guest.arnes.si

1 UVOD

Cirkulatorna odpoved in huda hipotenzija sta eni najpogostejših stanj v akutni medicini. O šoku govorimo, ka-

POVZETEK

Smrtnost bolnikov zaradi septičnega šoka, ki zahteva velike odmerke vazokonstriktorjev, je v enotah intenzivne terapije kljub ukrepom še vedno velika. Ker klasično zdravljenje z nadomeščanjem tekočin, kateholaminskimi vazokonstriktorji in učinkovinami s pozitivnim inotropnim delovanjem v poznih fazah šoka pogosto ne zagotovi zadostne prekrvljenosti tarčnih tkiv, se je pojavila potreba po alternativnih metodah zdravljenja. Klinično priznana in pogosto uporabljena farmakoterapijska ukrepa sta aplikacija vazopresina in kortikosteroidov. V zadnjih letih pa na podlagi kliničnih primerov in posameznih kliničnih raziskav prihaja v ospredje tudi uporaba metilenskega modrila, ki deluje kot specifični inhibitor signalne poti dušikovega oksida in cikličnega gvanozin monofosfata (NO-cGMP), katere disfunkcija bi naj imela glavno vlogo v patogenezi distributivnega šoka.

KLJUČNE BESEDE:

neadrenergični vazokonstriktorji, metilensko modrilo, refraktorni šok, septični šok

ABSTRACT

Progressive hypotension in the setting of septic shock that acquires high doses of vasopressor therapy is still the main cause of mortality in intensive care units. Classical treatment with administration of fluid, catecholaminergic vasopressors and positive inotropes in the stage of refractory shock is usually insufficient in providing adequate tissue perfusion. Non-catecholaminergic vasopressor strategies were developed to improve the outcomes of refractory shock, among which the administration of vasopressin and glucocorticoids are commonly used in intensive care units. In recent years, methylene blue has emerged, based on clinical cases and some trials, as a selective inhibitor of nitric oxide – cyclic guanosine monophosphate (NO-cGMP) pathway, which is supposed to have a substantial role in the pathogenesis of distributive shock.

KEY WORDS:

nonadrenergic vasopressors, methylene blue, refractory shock, septic shock



dar srednji arterijski tlak pade pod kritično mejo, pri kateri nastopi hipoperfuzija organov s tkivno hipoksijo, ki vodi v večorgansko odpoved in smrt (1). Kadar je vzrok cirkulatorne odpovedi izguba vazomotoričnega tonusa oz. zmanjšanje sistemske žilne upornosti, pogosto spremljane s povečanjem utripnega volumna srca, govorimo o distributivnem šoku (2). Distributivni šok najpogosteje nastopi zaradi sepse ali anafilaksije, pojavi se lahko tudi zaradi jemanja zdravil oz. ob izpostavitvi toksinom (pri zastrupitvi z dušikom, ogljikovim monoksidom, cianidom, metforminom, distributivno komponento ima tudi šok zaradi zastrupitve z zaviralci napetostno odvisnih kalcijevih kanalov tipa L) (3, 4). Septični šok je eden glavnih vzrokov smrti v enotah intenzivne terapije (2). Klasično zdravljenje šoka obsega mehanično ventilacijo, nadomeščanje tekočin in aplikacijo vazoaktivnih učinkovin (vazokonstriktorjev, učinkovin s pozitivnim inotropnim delovanjem) ter uporabo mehanske podpore krvnemu obtoku (uporaba intraaortne balonske črpalke in zunajtelesnega krvnega obtoka) (1). Z vnosom tekočin pogosto ne dosežemo zadostne perfuzije organov, zato je potrebna tudi aplikacija vazoaktivnih učinkovin. Najpogosteje uporabljamo kateholamine, predvsem noradrenalin (1, 2).

2 FIZIOLOŠKA IN PATOFIZIOLOŠKA VLOGA DUŠIKOVEGA OKSIDA V TELESU

Pomembno vlogo v regulaciji žilnega tonusa v fizioloških pogojih in v patofiziologiji šoka ima dušikov oksid (NO). V telesu nastaja iz L-arginina z encimom sintaza dušikovega oksida (NOS) in deluje kot močan vazodilatator. Obstajajo tri izooblike NOS: nevronska (nNOS), inducibilna (iNOS) in endotelijska (eNOS) (3, 5). Endotelijska NOS se nahaja v endotelnih celicah, trombocitih in kardiomiocitih. Ima pomembno vlogo v zaviranju agregacije in adhezije trombocitov ter agregacije levkocitov, kar preprečuje aterogenezo, njena glavna vloga pa je v uravnavanju krvnega tlaka (6). Aktivnost eNOS se močno veča z večanjem znotrajcelične koncentracije kalcija, posledica česar je zvečano nastajanje NO. Disfunkcija eNOS je lahko povezana s prevelikim nastajanjem NO, kar povzroča oksidativni stres in endotelno disfunkcijo (3, 6).

Inducibilna NOS se lahko izrazi v skoraj vsaki celici, inducirajo jo citokini, interlevkini in bakterijski lipopolisaharidi. Njena primarna fiziološka funkcija je kataliza nastanka NO v makrofagih, v katerih NO deluje kot glavna citotoksična

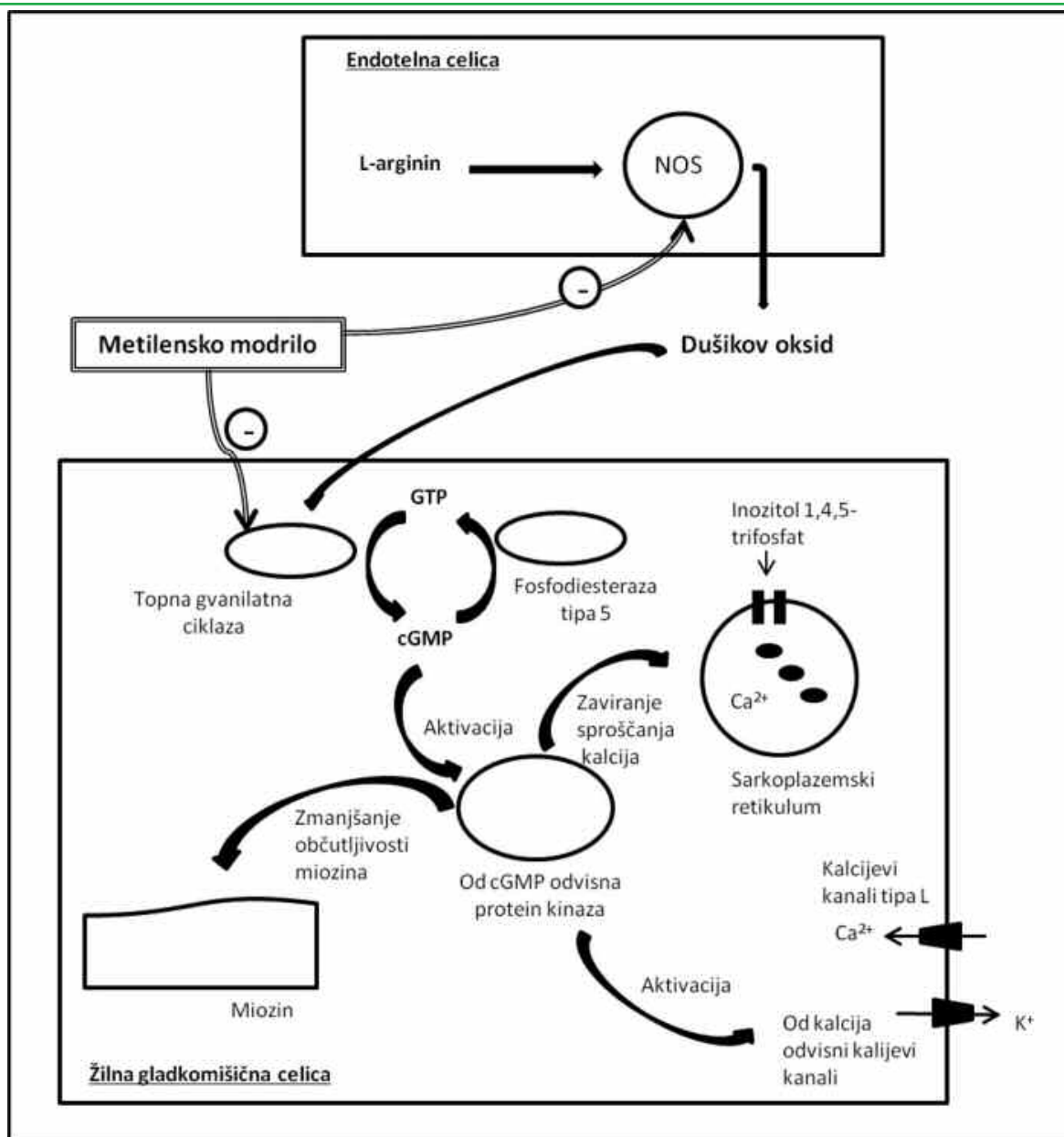
spojina ter ima pomembno vlogo v imunski obrambi ter posredovanju vnetja. NO deluje citotoksično tudi na številne tumorje, mikroorganizme in parazite (3, 7). Pomembna signalna pot NO je aktivacija topne gvanilatne ciklaze (sGC), kar vodi v nastajanje cikličnega gvanozinmonofosfata (cGMP), ki je sekundarni prenašalec za številne funkcije v telesu, vključno z uravnavanjem žilnega gladkomišičnega tonusa (8) (slika 1).

3 VAZODILATACIJSKI IN REFRAKTORNI ŠOK

K vazodilatacijskemu šoku pri vnetnih stanjih prispeva več mehanizmov. Gre predvsem za s citokini inducirano nastajanje NO (9), ki posledično poveča nastajanje cGMP (disfunkcija signalne poti NO-cGMP) (3) in zmanjša znotrajcelično koncentracijo kalcija ter povzroči vazodilatacijo. Hkrati pa zvečana koncentracija NO, celična hipoksija in acidoza aktivirajo od adenozintrifosfata (ATP) odvisne kalijeve kanale, kar povzroči hiperpolarizacijo celične membrane, ki preprečuje zvečanje znotrajcelične koncentracije kalcija, to pa vodi v dilatacijo žilja. Pri kritično bolnih se razvije tudi kortikosteroidna insuficienca, zmanjšane so plazemske koncentracije vazopresina, pride do oksidacije in inaktivacije kateholaminov ter do desenzitizacije adrenergičnih receptorjev, kar vse vodi do izgube žilnega tonusa in do zmanjšane odzivnosti na vazokonstriktorske učinkovine (4, 9, 10). Razvije se na vazokonstriktorje odporna hipotenzija oz. refraktorni šok (11). Vsak vzrok akutne kardiocirkulatorne odpovedi lahko vodi v refraktorni šok, katerega smrtnost dosega tudi 94 % (9).

4 POTREBA PO NEADRENERGIČNIH VAZOKONSTRIKTORJIH

Poleg neodzivnosti refraktornega šoka na zdravljenje z adrenergičnimi vazokonstriktori ima dolgotrajna uporaba kateholaminov tudi druge neželene učinke (povečana poraba kisika v miokardu, aritmije), ki lahko dodatno poslabšajo bolnikovo prognozo (12). Zaradi tega so se v zadnjih letih kot pomembna alternativa klasičnemu zdravljenju šoka s simpatomimetiki pojavili neadrenergični vazokonstriktori (2, 12). Trenutno najpogosteje uporabljamo vazopresin,

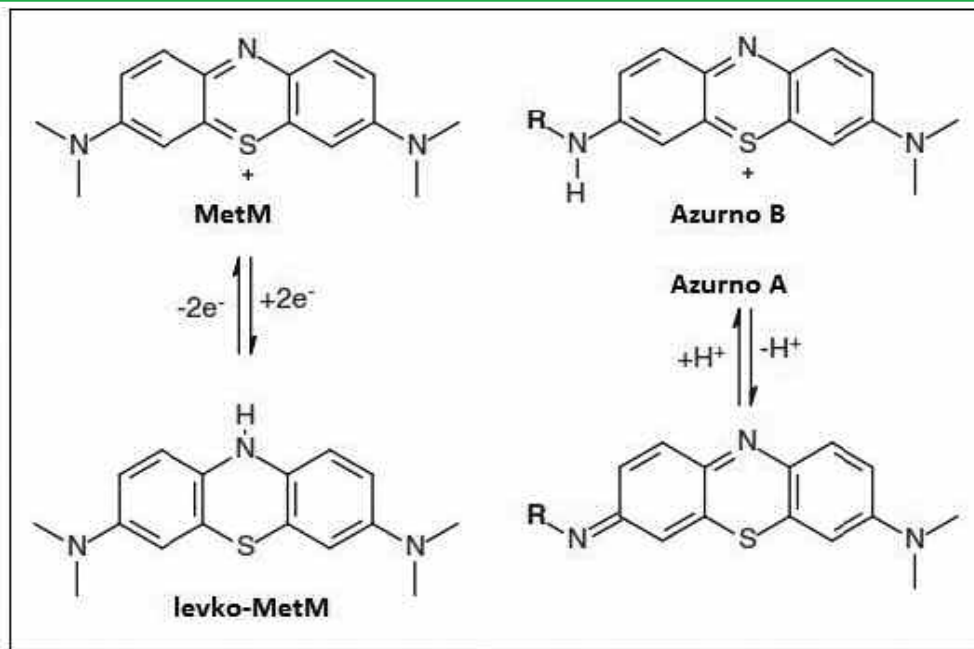


Slika 1. Vpliv metilenskega modrila na z dušikovim oksidom posredovano relaksacijo žilne gladke mišice (povzeto po (3)).

Dušikov oksid nastaja iz L-arginina preko encima sintaza dušikovega oksida (NOS) in povzroča aktivacijo topne gvanilatne ciklaze, ki katalizira nastajanje cikličnega gvanozin-monofosfata (cGMP). Posledično se aktivira od cGMP odvisna kinaza, kar vodi (1) v zmanjšano občutljivost miozina na s kalcijem povzročeno kontrakcijo, (2) v aktivacijo od kalcija odvisnih kalijevih kanalov, kar zmanjša vstop kalcija preko kalcijevih kanalov v celico ter (3) v zmanjšanje sproščanja kalcija iz sarkoplazemskega retikuluma. Vse to vodi v relaksacijo gladke mišice. Metilensko modrilo deluje kot zaviralec NOS in topne gvanilatne sintaze, s čimer povrne žilni tonus.

Figure 1. Effect of methylene blue on nitric oxide mediated relaxation of vascular smooth muscle (adapted from (3)).

Nitric oxide is produced from L-arginin by nitric oxide synthase (NOS) and causes activation of the soluble guanylyl cyclase, which catalyzes production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) that activates cGMP-dependent protein kinase. This leads (1) to decreased sensitivity of myosin to calcium induced contractions, (2) to activation of calcium-sensitive potassium channels which in turn decreases calcium entry through calcium channels, and (3) to inhibition of release of calcium from the sarcoplasmic reticulum, which in turn leads to smooth muscle relaxation. Methylene blue restores vascular tonus by selectively inhibiting NOS and soluble guanylyl cyclase.



Slika 2. Kemijske strukture metilenskega modrila (MetM), reducirane oblike metilenskega modrila (levko-MetM) in njegovih glavnih metabolitov (azurno B in azurno A) (povzeto po (17, 24)).

Figure 2. Chemical structure of methylene blue (MetM), reduced form of methylene blue (levko-MetM) and his metabolites (Azure B and Azure A) (adapted from (17, 24)).

terlipresin (dolgodelujoči derivat vazopresina) in metilensko modrilo (slika 2) (12, 14). V literaturi se pojavljajo številna klinična poročila in opazovalne študije uporabe navedenih učinkovin pri različnih vrstah šoka, predvsem v zdravljenju distributivnega šoka ob anafilaksiji in sepsi ter vazoplegičnem šoku po kardiokirurških operacijah (12, 14, 15).

4.1. METILENSKO MODRILLO IN NJEGOVA POTENCIALNA UPORABNOST V KLINIČNI PRAKSI

Metilensko modrilo (tetrametilitioninjev klorid) (slika 2) je sintezna spojina, ki jo že vrsto let uporabljamo v industriji in na številnih področjih medicine. Gre za fenotiazinom podobno triciklično aromatsko molekulo, ki je na sobni temperaturi v obliki temnomodrih kristalov brez vonja, dobro topna v vodi in le malo v etanolu (3). Metilensko modrilo so prvič sintetizirali leta 1876, ko so ga pričeli uporabljati kot sintezno barvilo v tekstilni industriji (16), sočasno pa se je izkazalo tudi kot učinkovito barvilo celičnih struktur in kot antiseptik, zato se je razširila njegova uporaba tudi v medicini. Paul Guttman in Paul Ehrlich sta ga leta 1891 prvič aplicirala bolniku kot uspešen poskus zdravljenja malarije (17). Metilensko modrilo tako velja za prvo popolnoma

sintezno učinkovino, ki so jo vnesli v človeško telo (17, 18). Od takrat se je njegova uporaba v moderni medicini precej razširila. Uporabljamo ga kot barvilo v nevroatomiji in bakteriologiji, kot reductent v biokemijskih procesih, v diagnostiki in zdravljenju karcinomov, v fotodinamični terapiji za dermalno zdravljenje dermatoloških in mukokutanih okužb oz. kroničnih obolenj ter kot antiseptik (16, 18). Klinično je indiciran za zdravljenje dedne in akutne, z zdravili povzročene methemoglobinemije, za zdravljenje z ifosfamidom povzročene encefalopatije pri bolnikih z rakom, za zdravljenje malarije in v slikovni diagnostiki tkiv (vizualizacija paratiroidnih žlez pri operaciji). Potekajo številne raziskave o njegovi potencialni uporabi v nevrologiji pri zdravljenju neurodegenerativnih bolezni (Alzheimerjeve bolezni), v psihiatriji in v zdravljenju bolečine (16, 17, 18, 19). Vedno bolj pa postaja zanimiv tudi v zdravljenju akutnega, na simptomimetike neodzivnega vazoplegičnega oz. septičnega šoka (17).

4.2. MEHANIZEM DELOVANJA METILENSKEGA MODRILA

Metilensko modrilo se v telesu nahaja v oksidirani in reducirani (t. i. levko-MetM) obliki (slika 2). V fizioloških razmerah

gre za kation, ki se z nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfatom (NADPH) reducira v levko-MetM, ki je nenabita, lipofilna, brezbarvna spojina, ki enostavno prehaja celične membrane in se v celicah spontano ponovno oksidira s kisikom (16, 17, 18). Oksidirana in levko-MetM oblika tvorita reverzibilen oksidacijsko-redukcijski sistem oz. elektron donor-akceptorski par. Redukcijske lastnosti MetM uporabljamo v zdravljenju methemoglobinemije (deluje kot elektron donor pri neencimski redukciji methemoglobina in ifosfamidno inducirane encefalopatije pri bolnikih z rakom) (18). V oksidiranem stanju MetM močno absorbira svetlobo, preko česar se pretvori v vzbujeno stanje, v katerem je sposoben fotosenzitivnih reakcij, ki privedejo do oksidacij bioloških molekul in nastanka citotoksičnih reaktivnih kisikovih vrst, kar uporabljamo v fotodinamični terapiji in dezinfekciji (16, 18). Ker lahko MetM tako sprejema kot oddaja elektrone, lahko pod različnimi pogoji deluje kot prooksidant ali kot antioksidant (18).

V patofiziologijo distributivnega šoka se metilensko modrilo vpleta preko selektivnega zaviranja NOS in sGC, s čimer povrne žilni tonus (3, 14) (slika 1). Metilensko modrilo neposredno zavira konstitutivno NOS in iNOS preko oksidacije železovega iona, vezanega neposredno na encim, s čimer zavira nastajanje cGMP. Z NO tekmuje za vezavno mesto železo-hem enote sGC in povzroči njeno deaktivacijo (20). Glavni učinek metilenskega modrila je tako povezan z zaviranjem z NO posredovane relaksacije gladkih mišic žilne stene, kar povzroči vazokonstrikcijo (20). Metilensko modrilo *in vitro* modulira transendotelijsko migracijo levkocitov in spodbudi apoptozo endotelijskih celic (21).

4.3. FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI METILENSKEGA MODRILA

Metilensko modrilo klinično uporabljamo peroralno v obliki želatinskih kapsul ali intravensko v obliki 1-odstotne vodne raztopine (10 mg/mL) (22). Intravenski terapevtski odmerek znaša 1-2 mg/kg telesne mase, apliciran v 10-20 min, peroralni odmerek znaša 50-300 mg (18). Ob uporabi v diagnostične namene kot barvilo za vizualizacijo tkiv ga apliciramo tudi z injiciranjem v lokalno tkivo, v primeru fotodinamične terapije pa lokalno na prizadeto sluznico oz. kožo. Subkutana, intratekalna ali intraspinalna uporaba niso priporočene (23). Po peroralni aplikaciji se metilensko modrilo dobro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (biološka uporabnost znaša 72,3 %), maksimalno plazemsko koncentracijo doseže po 1-2 urah (18, 19). Porazdelitev metilenskega modrila je odvisna od načina aplikacije (22); po peroralni aplikaciji doseže velike koncentracije v intestinalni mukozi in jetrih, po intravenozni aplikaciji pa doseže

večje koncentracije v možganih (17, 18, 19, 22). Njegova koncentracija v celotni krvi je 4- do 5-krat večja kot tista v plazmi, kar nakazuje, da v velikem deležu prehaja v krvne celice in tako izraža velik volumen porazdelitve (18). Razpolovni čas v plazmi je 5-7 ur (18, 22). 65-85 % metilenskega modrila se v eritrocitih in perifernih tkivih reducira v levko-MetM obliko. Metilensko modrilo se metabolizira do *N*-demetiliranih produktov: azurno B, ki je njegov glavni metabolit, in azurno A (slika 2) (24). Azurno B naj bi izražal farmakološke učinke metilenskega modrila, vendar raziskave slednjega še niso nedvoumno potrdile (17, 24). MetM se v večini izloča z urinom, v manjšem deležu pa z žolčem in preko blata. Z urinom se izloči kot mešanica MetM, levko-MetM in demetiliranih metabolitov (17). Metilensko modrilo in njegovi metaboliti povzročajo zeleno-modro obarvanje urina, sline, žolča in kože (18).

4.4. UPORABA METILENSKEGA MODRILA PRI SEPTIČNEM ŠOKU

Uporaba metilenskega modrila pri septičnem šoku se je razširila na podlagi poročil kliničnih primerov in posameznih manjših kliničnih raziskav, ki poročajo o izboljšanju hemodinamskega statusa pri distributivnem ali vazoplegičnem šoku (26, 27, 28). Uporaba je povezana s statistično značilnim povečanjem srednjega arterijskega tlaka in zmanjšanjem potrebe po vazokonstriktorjih v primerjavi s placebom (3, 26), medtem ko dokazov o izboljšanem preživetju ali pomembnem zmanjšanju smrtnosti teh bolnikov raziskave niso podale (26, 27). Učinkovit odmerek pri septičnem šoku je povzet iz rezultatov raziskav zdravljenja methemoglobinemije. Priporočen odmerek je 1-2 mg/kg telesne mase, v obliki kontinuirane infuzije, saj je hemodinamski učinek po bolusnem odmerku kratek (3). Poročajo tudi o uporabi začetnega odmerka 2 mg/kg telesne mase, ki mu sledi kontinuirana infuzija hitrosti 0,25 mg/kg telesne mase na uro (9, 25).

4.5. NEŽELENI UČINKI, KONTRAINDIKACIJE IN SOUČINKOVANJE METILENSKEGA MODRILA Z DRUGIMI UČINKOVINAMI V PRIMERU ZDRAVLJENJA SEPTIČNEGA ŠOKA

Odmerki metilenskega modrila, večji od 3 mg/kg, lahko zmanjšajo splahnjično perfuzijo in niso priporočeni (9). Pri intravenski aplikaciji velikih odmerkov (>7,0 mg/kg telesne mase) se pojavljajo neželeni učinki v obliki slabosti, abdo-

minalnih bolečin, potenja, glavobola, zmedenosti, vrtoglavice in cianoze (17, 18). Pride lahko do indukcije paradoksnе methemoglobinemije, nevrotoksičnosti in motenj srčnega ritma (13). Zaradi razvoja pljučne hipertenzije in poslabšanja alveolarne izmenjave plinov uporabe metilenskega modrila ne priporočamo pri bolnikih z akutno pljučno poškodbo. Kontraindicirana je tudi uporaba pri bolnikih z znanim pomanjkanjem glukoze-6-fosfata, saj lahko pride do akutne hemolitične anemije (13, 23). Že pri majhnih odmerkih se lahko pojavi modro obarvanje telesnih tekočin, ki pa ni nevarno (3, 18). Uporaba v nosečnosti je kontraindicirana (kategorija X), saj je metilensko modrilo teratogeno (29).

V nadaljevanju predstavljamo izbrane interakcije metilenskega modrila z drugimi učinkovinami, ki lahko povzročijo klinično pomembne učinke. V majhnih odmerkih (manj kot 1 mg/kg telesne mase) deluje kot močan reverzibilni zaviralec monoaminske oksidaze (MAO) in lahko povzroča serotoninski sindrom. Njegova uporaba povzroča serotoninsko toksičnost predvsem v kombinaciji s sočasnim jemanjem inhibitorjev MAO in serotoninergikov (selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina (SSRI), zaviralcev ponovnega privzema serotonina in noradrenalina (SNRI) ter tricikličnih antidepresivov) (30), zato je pri uporabi omenjenih učinkovin kontraindiciran oz. je potrebna posebna previdnost (17). Kot vsi zaviralci MAO izraža metilensko modrilo tudi farmakodinamično interakcijo z opioidnimi učinkovinami. Pri sočasni uporabi z opioidi lahko pride do razvoja respiratorne depresije, hipotenzije ali kome (23). Sočasna uporaba inhibitorjev MAO in neposredno delujočih simpatomimetikov lahko povzroči zvečanje krvnega tlaka in srčne frekvence, zato sta ob njihovi sočasni uporabi potrebna previdnost in skrben nadzor. Ne priporočamo sočasne uporabe z antiparkinsoniki (metildopa, levodopa), saj lahko pride do razvoja hudih hipertenzivnih reakcij ali hipervzdražnostnih reakcij osrednjega živčevja s halucinacijami (23).

Podatkov o klinično pomembnih farmakokinetičnih interakcijah metilenskega modrila z drugimi zdravili v razpoložljivi relevantni strokovni literaturi ni moč zaslediti.

5 SKLEP

Uporaba metilenskega modrila v zdravljenju septičnega šoka temelji na poročilih kliničnih primerov in posameznih

kliničnih raziskav. Zelo malo je randomiziranih kontroliranih raziskav, ki so jih večinoma izvedli na majhnih vzorcih in dajejo predvsem hemodinamične zaključke, ne pa tudi podatkov o zmanjšanju umrljivosti oz. izboljšanju preživetja. Klinična uporaba metilenskega modrila je tako zaenkrat smiselna le kot dodatna terapija v izjemnih primerih, tj. pri bolnikih z zelo rizičnim, refraktornim šokom, če se navedeni bolniki ne odzivajo na standardne možnosti zdravljenja (13).

6 LITERATURA

1. Vincent JL, de Backer D. *Circulatory Shock*. *N Engl J Med* 2013; 369: 1726-1734.
2. Angus DC, van der Poll T. *Severe Sepsis and Septic Shock*. *N Engl J Med* 2013; 369: 840-851.
3. Jang DH, Nelson LS, Hoffman S. *Methylene Blue for Distributive Shock: A Potential New Use of an Old Antidote*. *J Med Toxicol* 2013; 9: 242-249.
4. Landry DV, Oliver JA. *The pathogenesis of vasodilatory shock*. *N Engl J Med* 2001; 345: 8.
5. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS et al. *Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions*. *Hypertension* 1994; 23: 1121-1131.
6. Shaul PW. *Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location*. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 749-774.
7. Sade K, Schwartz IF, Etkin S et al. *Expression of inducible nitric oxide synthase in a mouse model of anaphylaxis*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 379-385.
8. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S et al. *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. *Pharmacol Rev* 2002; 52: 375-413.
9. Bassi E, Park M, pontes Azevedo LC. *Therapeutic Strategies for High-Dose Vasopressor-Dependent Shock*. *Critical Care Research and Practice* 2013, vol. 2013, Article ID 654708.
10. Parrillo JE. *Pathogenetic mechanisms of septic shock*. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471-1477.
11. Levy B, Collin S, Sennoun N et al. *Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside*. *Intensive Care Med* 2010; 36: 2019-2029.
12. Dünser MW, Hasibeder WR. *Sympathetic Overstimulation During Critical Illness: Adverse Effects of Adrenergic Stress*. *J Intensive Care Med* 2009; 24: 293.
13. Lavigne D. *Vasopressin and Methylene Blue: Alternate Therapies in Vasodilatory Shock*. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2010; 14: 3186-3189.
14. Beletti A, Musu M, Silveti S et al. *Non-Adrenergic Vasopressors in Patients with or at Risk for Vasodilatory Shock. A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials*. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142605.
15. Omar S, Zedan A, Nugent K. *Cardiac Vasoplegia Syndrome: Pathophysiology, Risk Factors and Treatment*. *Am J Med Sci* 2015; 349: 80-88.
16. Wainwright M, Crossley KB. *Methylene Blue – a Therapeutic Dye for All Seasons?* *J Chemother* 2002; 14: 431-443.

17. Schirmer HR, Adler H, Pickhardt M et al. "Lest we forget you — methylene blue...". *Neurobiol Aging* 2011; 32(12): 2325.e7-16.
18. Murat O, Lorke DE, Hasan M et al. *Cellular and Molecular Actions of Methylene Blue in the Nervous System. Med Res Rev* 2011; 31: 93-117.
19. Walter-Sack I, Rengelshausen J et al. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 65: 179-189.
20. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 367-374.
21. Werner I, Guo F, Bogert NV et al. Methylene Blue Modulates Transendothelial Migration of Peripheral Blood Cells. *PLoS One* 2013; 8(12): e82214.
22. Peter C, Hongwan D, K pfer A et al. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 247-250.
23. Drugs.com. Methylene blue. <https://www.drugs.com/monograph/methylene-blue.html>. Dostop: 25-10-2016.
24. Petzer A, Harvey BH, Wegener G, et al. Azure B, a metabolite of methylene blue, is a high-potency, reversible inhibitor of monoamine oxidase. *Toxicol Appl Pharm* 2012; 258: 403-409.
25. Jerenec K, Markota A, Sinkovi  A. Uporaba metilenskega modrila – naše prve izkušnje. Sre anje slovenskih in hrvaških intenzivistov, januar 2017 (poslano v objavo).
26. Pasin L, Umbrello M, Greco T et al. Methylene blue as a vasopressor: a meta-analysis of randomised trials. *Crit Care Resusc* 2013; 15: 42-48.
27. Kwok ES, Howes DW. Use of methylene blue in sepsis: a systematic review. *J Intensive Care Med* 2006; 21: 359-363.
28. Donati A, Conti G, Loggi S et al. Does methylene blue administration to septic shock patients affect vascular permeability and blood volume? *Crit Care Med* 2002; 30: 2271-2277.
29. Tiboni GM, Lamonaca D. Transplacental exposure to methylene blue initiates teratogenesis in the mouse: preliminary evidence for a mechanistic implication of cyclic GMP pathway disruption. *Teratology* 2001; 64: 213-220.
30. Top WM, Gillman PK, de Langen CJ et al. Fatal methylene blue associated serotonin toxicity. *Neth J Med* 2014; 72: 179-181.

