

# Úskalí dávkování azathioprinu a cyklosporinu v terapii myastenie

MUDr. Magda Horáková, MUDr. Stanislav Vohánka, CSc., MBA

Neurologická klinika FN a LF MU, Brno

Jedny z nejčastěji využívaných imunosupresiv v terapii myastenie jsou azathioprin (Imuran) a cyklosporin (Sandimmun Neoral, Equoral). Jedná se o velmi účinné léky, která významně zvyšují kvalitu života pacientů, ale mají i určitá rizika. Alespoň části z nich se dá předcházet nastavením správné dávky, což ale vyžaduje dostatečnou zkušenost. Cílem článku je poskytnout přehled nežádoucích účinků obou léků, hlavních metabolických interakcí, možností terapeutické monitorace a v neposlední řadě praktické doporučení pro zahájení terapie.

**Klíčová slova:** azathioprin, imuran, cyklosporin, neoral, equoral, terapeutické monitorování léčiv.

## Challenges of ciclosporin and azathioprin dosage for myasthenia gravis

Azathioprin (Imuran) and ciclosporin (Sandimmun Neoral, Equoral) are among the most widely used immunosuppressive drugs for myasthenia gravis. They are very efficient and help to improve patient's quality of life. However, such therapy has some risks. At least part of the risks can be avoided by managing the right dose, which requires certain experience. The aim of this article is a review of their side effects, metabolic pathways and interactions, therapeutic drug monitoring and some dosage recommendations.

**Key words:** azathioprin, ciclosporin, cyclosporin, neoral, therapeutic drug monitoring.

## Úvod

Prvním opravdovým průlomem v terapii myastenie byl rok 1934, kdy britská lékařka Mary Walker podala pacientovi s myastenii subkutánní injekci fysostigminu pro podobnost příznaků s otravou jedem kurare a výrazné, i když pouze dočasné zlepšení příznaků publikovala v Lancet (Walker, 1934). První pokusy s léky potenciálně ovlivňujícími imunitu přišly až v roce 1949, kdy byl pacientům podán adrenokortikotropní hormon (ACTH). Skutečným důvodem zkoušení ACTH ale byla snaha zmenšit objem thymu a zvýšit syntézu acetylcholinu, o které se předpokládalo, že je nedostatečná (Torda et Wolff 1949). V této době zatím ani autoimunitní podstata onemocnění nebyla objasněna. Až v roce 1960 byla prokázána přítomnost autoprotilátek v séru pacientů s myastenii (Strauss et al., 1960) a představena klíčová hypotéza, že by se mohlo

jednat o autoimunitní onemocnění (Simpson 1960). Následně byla v terapii myastenie zkoušena celá řada léků od kortikoidů po různá imunosupresiva, původně používaná v jiných indikacích (orgánové transplantace, lymfomy, leukémie).

Hned zpočátku ale v USA u jednoho ze čtyř pacientů léčených 6-mercaptopurinem došlo k rozvoji těžkého útlumu kostní dřeně a následně k myastenické krizi a úmrtí (Wolf et al., 1966), což celkově zpozdilo využití imunosupresiv v terapii myastenie v USA. V Evropě byly naštěstí zkušenosti s imunosupresivy výrazně lepší. Od roku 1967 byl azathioprin (prekurzor 6-mercaptopurinu) zkoušen s velmi dobrými výsledky v různých zemích (Mertens et al., 1969).

Cyklosporin A byl poprvé využit v léčbě myastenie v roce 1986, pouhé tři roky po schválení použití k orgánovým transplantacím. Bylo

prokázáno výrazné zlepšení těžkého průběhu myastenie, ale také byla zdůrazněna významná nefrotoxicita (Tindall et al., 1987).

Azathioprin (Imuran) a cyklosporin A (Sandimmun Neoral, Equoral) patří mezi nejčastěji využívaná imunosupresiva v terapii myastenie v České republice i celosvětově (Sanders et al., 2016). Kromě dvou zmíněných imunosupresiv se používá i celá řada dalších – mykofenolát mofetil, tacrolimus, methotrexát, cyklofosfamid. Frekvence použití závisí především na zkušenostech a lokálních zvyklostech pracovišť v jednotlivých zemích. Používají se jako tzv. „kortikoidy šetřící léky“, protože umožňují snížit jejich potřebnou dávku. Vzhledem k řadě nežádoucích účinků kortikosteroidů jde o velmi cennou léčebnou strategii.

Terapie imunosupresivy má ale také četná rizika a úskalí, což je patrné i z historických



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Magda Horáková, horakova.magda@fnbrno.cz

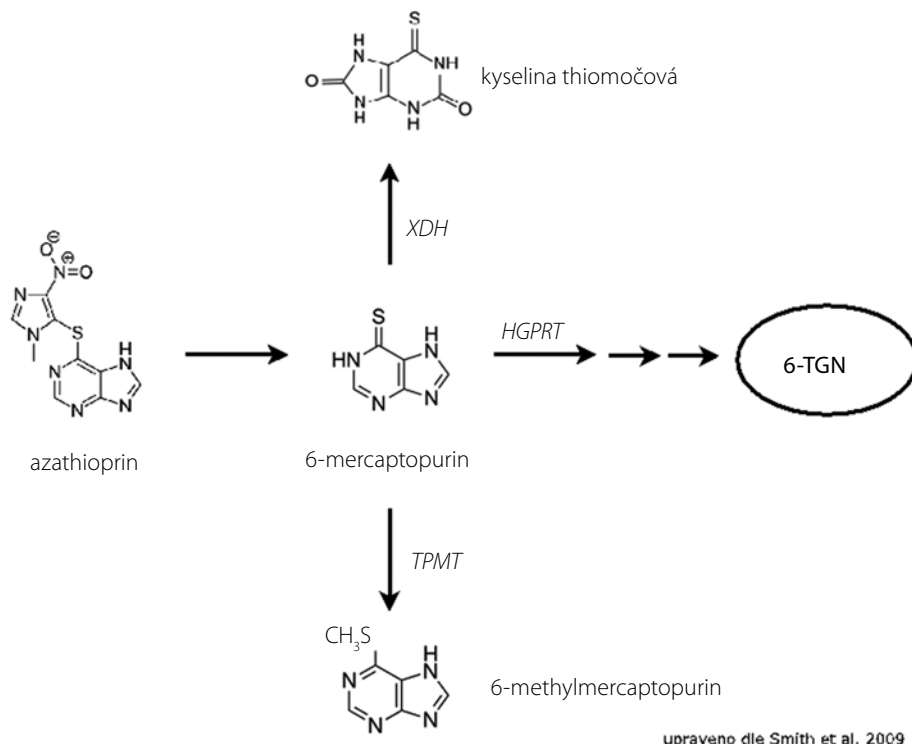
Neurologická klinika FN Brno, Lékařská fakulta MU, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Cit. zkr: Neurol. praxi 2017; 18(5): 309–313

Článek přijat redakcí: 23. 2. 2017

Článek přijat k publikaci: 21. 8. 2017

**Obr. 1.** Metabolizmus azathioprinu



souvislosti (viz výše). Části se dá předcházet správným nastavením dávkování, ale navzdory dlouholetému používání jde stále o málo pro-  
bádané pole.

## Azathioprin

Azathioprin je prekurzorem purinového ana-  
loga 6-mercaptopurinu (6-MP). Spolu s celou řa-  
dou dalších derivátů byl syntetizován v roce 1957  
stejnou skupinou vědců jako 6-mercaptopurín  
ve snaze najít méně toxický preparát (Hitchings  
et Elion, 1954). Azathioprin (tehdy nesl označení  
BW 57–322) se ukázal stejně účinným, ale méně  
toxickým pro kostní dřeň (Calne, 1961).

## Mechanismus účinku

Hlavní imunosupresivní účinek azathiopri-  
nu je zprostředkován jeho účinnými metabo-  
lity – 6-thioguaninovými nukleotidy (6-TGN).  
Jako purinová báze se inkorporují do buněč-  
né DNA a způsobí zástavu buněčného cyklu  
a apoptózu mitoticky aktivních buněk. Dalším  
významným mechanismem je přímé navození  
apoptózy T-lymfocytů intracelulární inhibicí  
CD28-dependentní Rac1 signálové dráhy (Tiede  
et al., 2003).

## Nežádoucí účinky

Zásadním problémem terapie azathiopri-  
nem je jeho potenciální myelotoxicita a hepa-

totoxicita. Jsou způsobeny různými metabolity  
azathioprinu a vzhledem ke komplikovanému  
a variabilnímu metabolismu jsou obtížně pre-  
dikovatelné. Na obrázku 1 je zjednodušeně  
znázorněn akceptovaný model metabolismu  
azathioprinu (Smith et al., 2009).

Prvním krokem v metabolismu azathioprinu  
je jeho přeměna na 6-MP. Následně se rozlišují  
tři hlavní, navzájem soutěžící metabolické dráhy.  
První, která vede k produkci účinných 6-TGN, je  
katalyzována enzymem HGPRT (hypoxanthine-  
guanine phosphoribosyltransferáza). Další dvě  
dráhy vedou k produktům, které jsou považová-  
ny za neaktivní. Známá dráha katalyzována en-  
zymem TPMT (thiopurin S-methyltransferázou)  
vede k produkci 6-methylmercaptopurinu (6-  
MMP), který je ve vyšší koncentraci hepatotoxi-  
cký. Právě v genu pro tento enzym existuje častý  
genetický polymorfismus, kvůli kterému ně-  
kteří autoři doporučují stanovení aktivity TPMT  
před zahájením terapie azathioprinem. Asi 11 %  
populace má nízkou aktivitu enzymu a u 0,3 %  
chybí enzym úplně (Lennard et Lilleyman, 1996).  
U pacientů s nízkou aktivitou hrozí zvýšená kon-  
centrace účinných 6-TGN a následná myelo-  
toxicita s aplastickou anémií. U pacientů s příliš  
vysokou aktivitou je naopak riziko hepatotoxicity  
a současně neúčinnosti imunosuprese. Aktivitu  
TPMT lze testovat komerčně dostupnými sety.  
Poslední významnou dráhou je enzymatická

reakce xanthinoxidázy (XDH) vedoucí ke vzniku  
kyseliny 6-thiomočové, která je hlavním inak-  
tivním metabolitem azathioprinu. I pro tento  
enzym je znám genetický polymorfismus. Jeho  
deficit lze velmi dobře nasimulovat podáním  
allopurinolu (Milurit), jehož bezpečné podávání  
vyžaduje snížení dávky azathioprinu až o 80 %  
(Zimm et al., 1983).

## Doporučené dávkování pro praxi

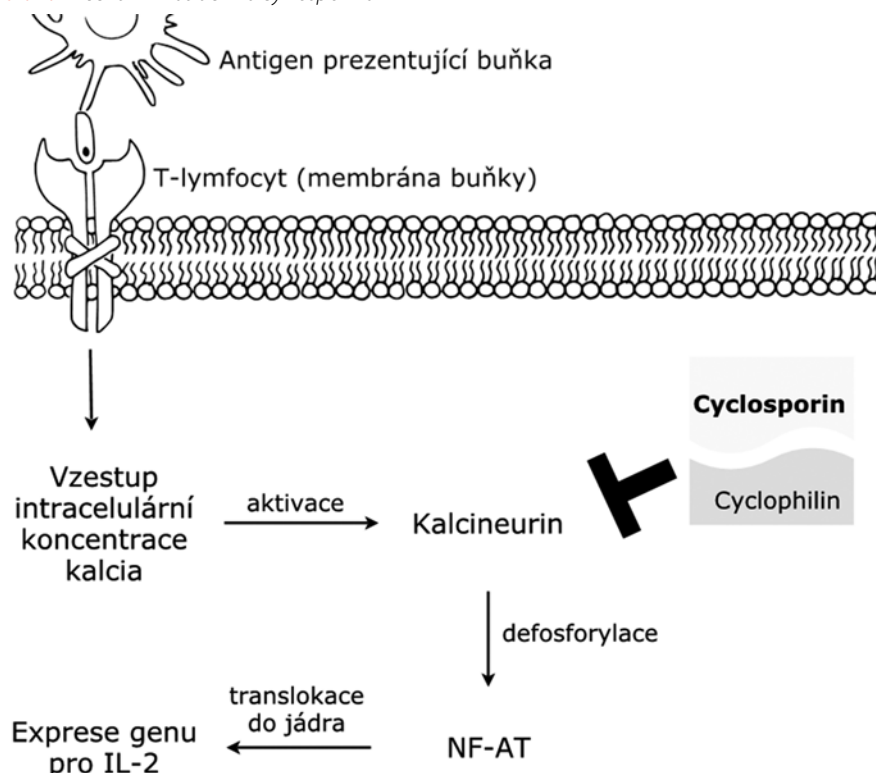
Obvykle se začíná dávkou 1–2 mg/kg (vý-  
jiměčně až 3 mg). Z výše uvedených důvodů  
je ale vysoká interindividuální variabilita mezi  
podanou dávkou a koncentrací účinných 6-TGN  
v krvi. Nejčastěji se užívá ve 2 až 3 denních dáv-  
kách, ale lze podávat i v jedné denní dávce.  
Terapeutický účinek zpravidla nastupuje až po  
3 měsících a trvá ještě 2–3 měsíce po vysazení.  
Je nutná pravidelná kontrola krevního obra-  
zu, zpočátku 1x měsíčně, později lze intervaly  
prodloužit. Jaterní testy je nutné kontrolovat  
pouze po nasazení medikace, dlouhodobá mo-  
nitorace nutná není. Lék se doporučuje vysadit  
při překročení dvojnásobku normálních hod-  
not. Existuje ale i riziko idiosynkratické reakce  
u genetických polymorfismů v TPMT, které lze  
otestovat komerčně dostupnými sety z plné krve  
i v ČR. U takových pacientů se nedoporučuje lék  
znovu podávat. Zatím ale není jednotný názor,  
zda je nutné rutinně testovat všechny pacienty.  
Počet bílých krvinek by neměl klesnout pod  
3 × 10<sup>9</sup>/l. Při výraznějším poklesu stačí často na  
přechodnou dobu (dny až týdny) lék vysadit.

## Interakce

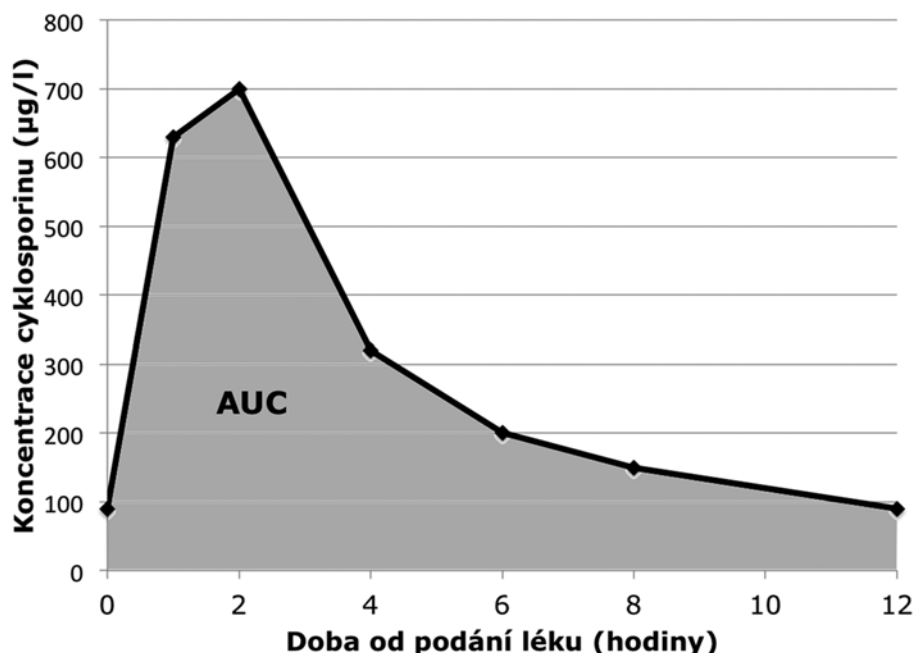
Z lékových interakcí je zásadní zmíněná in-  
terakce s allopurinolem, který výrazně zvyšuje  
účinnost a myelotoxicitu azathioprinu. Další inter-  
akcí, která sice nesouvisí s ovlivněním účinnosti  
azathioprinu, ale je velmi významná, je snížení  
koncentrace warfarinu v krvi. Pacienti vyžadují  
asi 2,5násobné zvýšení dávky warfarinu (Ng  
et Crowther, 2006). Mechanismus této interakce  
je ale zatím neznámý.

## Terapeutická monitorace koncentrace léku

Navzdory širokému uplatnění azathioprinu  
a přetrvávajícím obtížím v dávkování zatím ne-  
existuje jednoduchá dostupná metoda, která  
by dokázala určit koncentraci 6-TGN z krve. Pro  
účely studií je využívána metoda vysokoúčinné

**Obr. 2.** Mechanismus účinku cyklosporinu

upraveno dle Schumacher a Nordheim, 1992

**Obr. 3.** Modelová křivka koncentrací a AUC (Area Under Curve). Křivka znázorňuje koncentraci cyklosporinu před podáním léku (čas 0), hodinu po podání a následně 2, 4, 6, 8 a 12 hodin po podání. Uvedené časy jsou ale pouze orientační, protože neexistuje striktní doporučení z kolika odběrů a v jakých časech lze křivku stanovit

kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Pro tuto metodiku již v odborné literatuře existuje i doporučené rozmezí terapeutických koncentrací pro pacienty s nespecifickými střevními záněty: 235–450 pmol/8×10<sup>8</sup> RBC (red blood cells) (Osterman et al., 2006). Tato neobvyklá

jednotka vychází z principu metody, protože poločas 6-TGN v plazmě je velmi krátký v řádu hodin, zatímco poločas v erytrocytech je několik dní. Stejnou metodikou byla určena i horní mez pro 6-MMP, nad kterou už hrozí hepatotoxicita, a to 5700 pmol/8×10<sup>8</sup> RBC (Dubinsky

et al., 2000). Zatímco prosté sledování jaterních testů a krevního obrazu pouze sleduje míru nežádoucích účinků, monitorování metabolitů azathioprinu umožňuje sledovat i účinnost léčby a pomáhá odhalit pacienty, kteří na léčbu nereagují. Proto je monitorace metabolitů doporučována odbornou veřejností, ačkoliv je současně přiznávána nákladnost a omezená dostupnost stanovení. Byla provedena řada studií hledajících jednoduše stanovitelný marker, který by koreloval s koncentrací 6-TGN. Nejvíce byl studován počet leukocytů a střední objem erytrocytů (MCV). Opakovaně se ale prokázalo, že tyto markery nejsou spolehlivé a s koncentrací 6-TGN ani efektivitou léčby příliš nekorelují (Heerasing et al., 2015; Kopylov et al., 2015).

### Cyklosporin A

Cyklosporin (cyclosporin, cyclosporin nebo také cyclosporine) byl poprvé izolován v roce 1971 z houby *Tolypocladium inflatum*. Cyklosporin je cyklický peptid, který je vysoce lipofilní, proto vykazuje velmi nízkou absorpci z orálního podání. Tato skutečnost vedla k syntéze nových, ve vodě rozpustných prolékových forem.

### Mechanismus účinku

Cyklosporin se řadí mezi tzv. kalcineurinové inhibitory (obrázek 2).

Za normálních okolností při interakci T-lymfocyty s antigen-prezentující buňkou dochází k vzestupu intracelulární koncentrace kalcia, čímž dojde k aktivaci kalcium-dependentní fosfatázy s názvem kalcineurin. Tato fosfatáza následně defosforyluje transkripční faktor (NF-AT), který je translokován do jádra a spustí expresi interleukinu 2 (IL-2). IL-2 je hlavním cytokinem T-lymfocytů, který autokrinní stimulací vede k expanzi klonů aktivovaných T-lymfocytů a současně napomáhá diferenciaci ostatních naivních T-lymfocytů v efektorové i paměťové buňky. Cyklosporin vytváří komplex s cytoplazmatickým proteinem cyclophilinem, který kalcineurin inhibuje, což v konečném důsledku blokuje expresi IL-2 a T-lymfocyty nejsou schopny reagovat na stimulaci antigenem (Schumacher et Nordheim, 1992). Následně pak také nejsou schopny aktivovat naivní B-lymfocyty k diferenciaci v plazmocyty a nepřímě se tak snižuje i tvorba autoprotilátek.

## Nežádoucí účinky

Hlavním nežádoucím účinkem je na dávce závislá nefrotoxicita. Je způsobena uvolněním vazokonstrikčních faktorů (tromboxan A<sub>2</sub>, endothelin a angiotensin II) a sníženým uvolňováním faktorů vazodilatačních (prostacyklin, oxid dusný), což vede k renální vazokonstrikci s poruchou funkce (snížená glomerulární filtrace, vzestup koncentrace urey a kreatininu) a následně i k hypertenzi. Zpočátku je porucha funkce reverzibilní, ale chronická renální vazokonstrikce také může nenávratně ledviny poškodit. K dalším, už méně častým nežádoucím účinkům, se řadí i hepatotoxicita, porucha glukózové tolerance, hyperurikémie, třes, bolest hlavy, hyperplazie dásní, hirsutismus a zvýšená náchylnost k infekcím a malignitám. Cyklosporin je mezi imunosupresivy unikátní tím, že nemá myelotoxický efekt.

## Doporučené dávkování pro praxi

Jedním z hlavních problémů dávkování cyklosporinu je jeho nízký terapeutický index (poměr mezi dávkou smrtelnou a účinnou). Neexistují žádná striktní doporučení pro denní dávku u autoimunitních onemocnění a doporučení mezi různými autory se liší. Běžně se ale u autoimunitních onemocnění začíná dávkou 4–6 mg/kg/den rozdělené do dvou denních dávek (Feutren et Mihatsch, 1992; Italia et al., 2006). Po dosažení remise stačí dávka 1–2 mg/kg/den. Nízká a nevyrovnaná biologická dostupnost spolu s vysokou variabilitou metabolismu však vede k proměnlivým koncentracím léku v krvi a je důvodem k opatrné následné titraci dávky dle efektivity i tolerance léčby. Účinek nastupuje během 1–2 měsíců s maximem efektu asi po čtyřech měsících (Nagane et al., 2010). Před nasazením by měly být vyšetřeny renální funkce. Nutná je pravidelná měsíční kontrola renálních parametrů, krevního tlaku a jaterních enzymů. Při titraci dávky je doporučeno se vyhnout vzestupu koncentrace kreatininu o více než 30 % (Feutren et Mihatsch, 1992).

## Interakce

Cyklosporin je substrátem P-glykoproteinového transportu, transmembránové pumpy lokalizované mimo jiné i na buňkách střevní sliznice. Po orálním podání část vstřebo-

ného cyklosporinu podléhá aktivnímu transportu zpět do lumen střeva a míra absorpce je tak velmi rozdílná (Christians et al., 2006). Na této úrovni je prokázána interakce s digoxinem, který zvyšuje biologickou dostupnost cyklosporinu. Cyklosporin také podléhá presystémovému metabolismu ve střevě i v játrech jako substrát enzymů CYP450 (cytochrom P450), to nejen známého izoenzymu 3A4, ale i 3A5. Významné lékové interakce jsou uvedeny v tabulce 1 (Lill et al., 2000; Dalakas, 2013), ale hladina cyklosporinu může být potenciálně ovlivněna veškerými interakcemi popsány na CYP3A4.

Léky zvyšující hladinu cyklosporinu	Léky snižující hladinu cyklosporinu
Ketokonazol	Fenytoin
Norethisteron	Fenobarbital
Erytromycin	Rifampicin
Amfotericin B	Oxycodon
Aminoglykosidy	
Cimetidin	
Sertralin	
Melfalan	
Diltiazem	
Statiny	
Sartany	

Kromě lékových interakcí stojí za zmínku i interakce s grapefruitovým džusem a třezalkou tečkovanou. Zatímco bergamottin obsažený v grepové šťávě inhibuje CYP3A4 a vede tak ke zvýšení koncentrací cyklosporinu, extrakt z třezalky, který je využíván jako rostlinné antidepresivum naopak CYP3A4 indukuje a výsledkem je pokles koncentrace cyklosporinu. V literatuře byla popsána i akutní rejekce srdečního transplantátu u dvou pacientů tři týdny po zahájení antidepresivní medikace extraktem z třezalky tečkované (Ruschitzka et al., 2000). Existují ale i významné interakce na úrovni transportérů do žlučových cest, protože se jedná o hlavní eliminační cestu cyklosporinu. Toto vše je důvodem, proč je velmi nízká korelace mezi podanou dávkou cyklosporinu a jeho koncentrací v krvi. Vzhledem k polypragmazonii a zvýšenému užívání přírodních produktů je velmi obtížné se vyhnout všem lékovým interakcím. V kombinaci s nízkým terapeutickým indexem je proto stále velmi aktuální terapeutické monitorování koncentrací, a to i u pacientů na stabilní dávce.

## Terapeutická monitorace koncentrace léku

Stanovení koncentrace cyklosporinu v krvi je běžně dostupné. Kdy se má odběr provádět a jaké je terapeutické rozmezí, je ale stále předmětem diskuzí. Nejlépe s efektem léčby, ale i mírou nefrotoxicity koreluje plocha pod křivkou (AUC z anglického Area Under Curve) koncentrací získaných z několika odběrů (David et Johnston, 2001). Modelová křivka koncentrací je znázorněna na obrázku 3.

To je však v klinické praxi velmi nepraktické, a proto je snaha nahradit AUC jedním nebo dvěma odběry. Nejčastěji se stanovuje koncentrace těsně před podáním dávky (tzv. trough level) s označením  $C_0$ , a koncentrace dvě hodiny po podání s označením  $C_2$ , jako odhad maximální koncentrace. Zatím neexistuje jednoznačné doporučení hodnot pro pacienty s myastenii (a obecně ani pro pacienty s autoimunitním onemocněním). Japonské práce (Utsugisawa et al., 2008; Nagane et al., 2010) doporučují udržovat hladinu  $C_0$  pod 250 µg/l. Vyšší koncentrace byla častěji spojena s elevací kreatininu a krevního tlaku (Utsugisawa et al., 2008). Hodnota  $C_2$  se v obou studiích pohybovala přibližně v rozmezí 1 000–1 500 µg/l. Jiné studie naopak zdůrazňují význam AUC a její silnější korelaci s nefrotoxicitou i ostatními nežádoucími účinky oproti  $C_0$  a snaží se nalézt vhodnou dobu odběru k nejlepší predikci AUC (David et Johnston, 2001). Je proto možné, že v budoucnu bude dvojitý odběr ( $C_0$  a  $C_2$ ) nahrazen jen jedním odběrem nejlépe vystihujícím maximální koncentraci.

## Závěr

Azathioprin i cyklosporin jsou velmi účinná imunosupresiva v léčbě myastenie, která významně zlepšují kvalitu života nemocných. Většina pacientů léčbu toleruje dobře a pouze u části je obtížné nastavit správnou dávku. V takových případech by bylo vhodné mít k dispozici stanovení koncentrace léku v krvi z výše uvedených příčin. Avšak zatímco pro azathioprin taková možnost existuje, ale je velmi drahá a obtížně dostupná, pro cyklosporin naopak chybí spolehlivá definice vhodných terapeutických rozmezí. Správná titrace dávky se tak nyní opírá především o dostatečnou zkušenost ošetřujícího lékaře.

## LITERATURA

1. Calne RY. Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues. Transplant. Bull. 1961; 28: 65–81.
2. Christians U, Strom T, Zhang YL, Steudel W, Schmitz V, Trump S, Haschke M. Active drug transport of immuno-

suppressants: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics. Ther. Drug Monit. 2006; 28: 39–44.

3. Dalakas MC. Polymyositis and Dermatomyositis. Butterworth-Heinemann; 2013.
4. David OJ, Johnston A. Limited sampling strategies for estimating cyclosporin area under the concentration-time curve: review of current algorithms. *Ther. Drug Monit.* 2001; 23: 100–114.
5. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Théorêt Y, Seidman EG. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118: 705–713.
6. Feutren G, Mihatsch MJ. Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. *International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporine in Autoimmune Diseases. N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 1654–1660.
7. Heerasing NM, Ng JF, Dowling D. Does lymphopenia or macrocytosis reflect 6-thioguanine levels in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine? *Intern. Med. J.* 2015: n/a–n/a.
8. Hitchings GH, Elion GB. The chemistry and biochemistry of purine analogs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1954; 60: 195–199.
9. Italia JL, Bhardwaj V, Ravi Kumar MNV. Disease, destination, dose and delivery aspects of cyclosporin: the state of the art. *Drug Discov. Today* 2006; 11: 846–854.
10. Kopylov U, Battat R, Benmassaoud A, Paradis-Surprenant L, Seidman EG. Hematologic indices as surrogate markers for monitoring thiopurine therapy in IBD. *Dig. Dis. Sci.* 2015; 60: 478–484.
11. Lennard L, Lilleyman JS. Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Ther. Drug Monit.* 1996; 18: 328–334.
12. Lill J, Bauer LA, Horn JR, Hansten PD. Cyclosporine-drug interactions and the influence of patient age. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* 2000; 57: 1579–1584.
13. Mertens HG, Balzereit F, Leiper M. The treatment of severe myasthenia gravis with immunosuppressive agents. *Eur. Neurol.* 1969; 2: 321–339.
14. Nagane, Suzuki S, Suzuki N, Utsugisawa K. Factors associated with response to calcineurin inhibitors in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2010; 41: 212–218.
15. Nagane, Suzuki S, Suzuki N, Utsugisawa K. Two-year treatment with cyclosporine microemulsion for responder myasthenia gravis patients. *Eur. Neurol.* 2010; 64: 186–190.
16. Ng HJ, Crowther MA. Azathioprine and inhibition of the anticoagulant effect of warfarin: evidence from a case report and a literature review. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* 2006; 4: 75–77.
17. Osterman MT, Kundu R, Lichtenstein GR, Lewis JD. Association of 6-thioguanine nucleotide levels and inflammatory bowel disease activity: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1047–1053.
18. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet Lond. Engl.* 2000; 355: 548–549.
19. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, Kuntz N, Massey JM, Melms A, Murai H, Nicolle M, Palace J, Richman DP, Verschuuren J, Narayanaswami P. International consensus guidance for management of myasthenia gravis. *Neurology* 2016; 87: 419–425.
20. Schumacher A, Nordheim A. Progress towards a molecular understanding of cyclosporin A-mediated immunosuppression. *Clin. Investig.* 1992; 70: 773–779.
21. Simpson JA. Myasthenia gravis: a new hypothesis. *Scott. Med. J.* 1960; 5: 419–436.
22. Smith MA, Marinaki AM, Arenas M, Shobowale-Bakre M, Lewis CM, Ansari A, Duley J, Sanderson JD. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009; 30: 375–384.
23. Strauss AJL, Seegal BC, Hsu KC, Burkholder PM, Nastuk WL, Osserman KE. Immunofluorescence Demonstration of a muscle binding, complement-fixing serum globulin fraction in myasthenia gravis. *Exp. Biol. Med.* 1960; 105: 184–191.
24. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath M. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1133–1145.
25. Tindall RS, Rollins JA, Phillips JT, Greenlee RG, Wells L, Belendiuk G. Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 719–724.
26. Torda C, Wolff HG. Effects of adrenocorticotrophic hormone on neuro-muscular function in patients with myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.* 1949; 28: 1228–1235.
27. Utsugisawa K, Nagane Y, Suzuki S, Suzuki N. Monitoring treatment with cyclosporine microemulsion in myasthenia gravis. *Eur. J. Neurol.* 2008; 15: 598–604.
28. Walker MB. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *The Lancet* 1934; 223: 1200–1201.
29. Wolf SM, Rowland LP, Schotland DL, McKinney AS, Hofer PFA, Aranow H. Myasthenia as an autoimmune disease: clinical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1966; 135: 517–535.
30. Zimm S, Collins JM, O'Neill D, Chabner BA, Poplack DG. Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1983; 34: 810–817.