

Moxifloxacin intrakameral: Eine sichere Option zur Endophthalmitisprophylaxe?

In-vitro-Sicherheitsprofil zur intraokularen Anwendung

Hintergrund

Die Anzahl der Kataraktoperationen in Europa und der westlichen Welt hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen [1, 10]. Die operative Entfernung der grauen Stars gehört zu den am häufigsten durchgeführten operativen Eingriffe in der Medizin überhaupt, durch den Millionen von Menschen vor Erblindung bewahrt werden können [10]. Nicht erst seit der Einführung minimal-invasiver Operationstechniken ist die Kataraktoperation sicher und die Komplikationsraten sind äußerst gering [10]. Dennoch besteht immer ein geringes, aber nicht zu unterschätzendes Restrisiko für Komplikationen.

Die bakterielle Endophthalmitis ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach Intraokularchirurgie [4, 35]. Wenn es zu einer Infektion im Auginnenen gekommen ist, kann ein Verlust von Sehkraft nur durch frühzeitige und effektive Therapie minimiert werden [19]. Die Inzidenz der bakteriellen Endophthalmitis ist zwar seit den 50er Jahren von 0,5% auf 0,1% in den 90er Jahren abgesunken [20], sie scheint aber in den letzten Jahren wieder leicht anzusteigen [43]. Eine prophylaktische Anwendung von Antibiotika zur Vorbeugung der bakteriellen Endophthalmitis ist daher sinnvoll.

In einer jüngst veröffentlichten Studie der European Society of Cataract and Re-

fractive Surgeons (ESCRS) wurde der Einfluss einer prophylaktischen Anwendung von Antibiotika auf die Inzidenz der postoperativen Endophthalmitis untersucht [1]. Hierbei wurde die Wirksamkeit einer einmaligen intrakameralen Injektion von Cefuroxim (Cephalosporinantibiotikum der 2. Generation) mit der fünfmaligen perioperativen topischen Gabe von Levofloxacin Augentropfen als Prophylaxe der postoperativen Endophthalmitis nach Kataraktoperation verglichen. Im Ergebnis ließ sich durch die intrakamerale Antibiotikaeingabe am Ende des Eingriffs das Risiko für das Entstehen einer postoperativen Endophthalmitis auf ein Viertel reduzieren [1]. Im Gegensatz dazu führte die perioperative topische Anwendung von antibiotischen Augentropfen nicht zu einer Reduktion der Endophthalmitisinzidenz [1].

Derzeit werden vorwiegend Peptid- und Cephalosporinantibiotika wie Vancomycin und Cefuroxim intrakameral angewandt [31]. Die dafür angewendeten Antibiotika erscheinen in therapeutischen Konzentrationen sicher [25], aber da auch Wirkstoffe aus diesen beiden genannten Antibiotikagruppen in der Akuttherapie der bakteriellen Endophthalmitis intravitreal angewendet werden und hierfür den therapeutischen Standard darstellen [2, 3, 4], sollten diese als „Reserveantibiotika“ dienen und nicht zur Prophylaxe ein-

gesetzt werden. Außerdem sind für beide Antibiotikagruppen nach intraokularer Anwendung teils schwerwiegende Nebenwirkungen wie anaphylaktische Reaktionen, aber auch die postoperative Ausbildung eines zystoiden Makulaödems beschrieben und ihre therapeutische Breite erscheint als gering [5, 42, 44].

Fluorchinolone werden als Antibiotika seit vielen Jahren zur Behandlung von Infektionen am Auge erfolgreich eingesetzt [40]. Insbesondere die Vertreter der 3. und 4. Generation, Levofloxacin und Moxifloxacin, bieten ein sehr breites Wirkungsspektrum, das auch die häufigsten Endophthalmitiserreger sicher erreicht [9]. Seit kurzem ist mit Moxifloxacin (Vigamox® AT, 0,5% Moxifloxacin-Hydrochlorid, pH 6,5–6,8, 200–400 mOsm/kg, Alcon Pharma, Freiburg) erstmals ein Fluorchinolon der 4. Generation zur Behandlung bakterieller Infektionen am Auge in Deutschland zugelassen.

Moxifloxacin ist durch sein erweitertes Wirkungsspektrum sowohl gegen gramnegative als auch gegen grampositive Erreger wirksam und erreicht selbst atypische Erreger und Anaerobier [27, 32].

Zahlreiche mikrobiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die prophylaktische, intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin zur Vermeidung von postoperativen intraokularen Infektionen wirksam sein kann. Aber auch pharma-

kinetische Daten und Untersuchungen am Tiermodell sprechen für eine intraokulare Anwendung von Moxifloxacin zur Vorbeugung und Therapie der bakteriellen Endophthalmitis [12, 13, 22, 27].

Vor einer solchen intraokularen Anwendung des Wirkstoffs Moxifloxacin und seiner ophthalmologischen Zubereitungsform (Vigamox® AT) muss aber auch die toxikologische Sicherheit im Bezug auf eine intrakamerale Anwendung geprüft werden. Dies ist v. a. auch deshalb besonders wichtig, da bisher kein Antibiotikum für die intraokulare Anwendung zugelassen ist und es sich bei jeder prophylaktischen oder therapeutischen intraokularen Antibiotikaeingabe immer um eine „Off-Label“-Anwendung handelt.

Jüngst veröffentlichte Untersuchungen und Fallbeobachtungen deuten darauf hin, dass die intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin und seiner ophthalmologischen Zubereitungsform Vigamox® AT sicher ist [6, 12, 14, 16, 22, 27], jedoch gibt es bisher keine umfassende Untersuchung an menschlichen Zellen des vorderen und hinteren Augenabschnitts, in der die Sicherheit von Vigamox® für die intrakamerale Anwendung untersucht wurde.

Ziel dieser Studie war es deshalb, die Sicherheit von Vigamox® und seinem Wirkstoff Moxifloxacin in vitro an humanen Spenderhornhäuten zur Transplantation und menschlichen Zellen des vorderen und hinteren Augenabschnitts zu untersuchen. Hierfür wurden exemplarisch für den vorderen Augenabschnitt menschliche Spenderhornhäute, kultivierte humane Hornhautendothelzellen (CEC), humane Linsenepithelzellen (LEC) sowie primäre humane Trabekelwerkzellen (TMC) auf toxische Effekte von Moxifloxacin untersucht. Als Modell für den hinteren Augenabschnitt kamen primäre humane retinale Pigmentepithelzellen (RPE) zum Einsatz.

Um zu überprüfen, ob die Sicherheit des Wirkstoffs auch unter den extremen Bedingungen einer schweren intraokularen Entzündung wie der Endophthalmitis gewährleistet ist, wurde die mögliche Toxizität von Vigamox® zusätzlich unter den Bedingungen von Entzündungsstress untersucht. Die Zellen wurden dazu oxidativem Stress und inflammatorischen Zy-

tokinen ausgesetzt. Verwendung fand Lipopolysaccharid (LPS), ein in pharmakologischen Untersuchungen häufig angewandter Entzündungsmediator, sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) als zwei weitere für das entzündliche Geschehen bei einer bakteriellen Endophthalmitis typische proinflammatorische Zytokine [15, 17, 36, 38, 41]. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Zytokinkonzentrationen den Konzentrationen, die bei einer akuten intraokularen Entzündung auftreten, vergleichbar waren. Mögliche toxische Wirkungen von Vigamox® (Moxifloxacin) unter diesen Bedingungen wurden untersucht.

Methoden

Untersuchung auf Hornhautendotheltoxizität

Zur Beurteilung einer möglichen Toxizität von Moxifloxacin auf Endothelzellen wurden 6 Paare humaner, seropositiver Spenderhornhäute in Organkultur untersucht. Hierzu wurde jeweils eine Hornhaut aus einem Paar mit Moxifloxacin behandelt (250 $\mu\text{g/ml}$ oder 500 $\mu\text{g/ml}$). Es wurden dazu 2500 μl oder 5000 μl der gebrauchsfertigen Vigamox® Augentropflösung (Vigamox® AT, 0,5% Moxifloxacin-Hydrochlorid, Alcon Pharma, Freiburg) auf ein Gesamtvolumen von 50 ml Hornhautorgankulturmedium zugegeben. Die andere Hornhaut diente als Kontrolle. Das Organkulturmedium wurde bei allen untersuchten Hornhäuten wöchentlich gewechselt und bei den mit Vigamox® behandelten Hornhäuten auch die entsprechende Moxifloxacin-Konzentration erneut mitzugesetzt. Die Endothelzellzahl wurde wöchentlich, im Verlauf von 30 Tagen, bestimmt.

In-vitro-Toxizitätsuntersuchung an Zellen des vorderen und hinteren Augenabschnitts

Bei der intrakameralen Anwendung wird die Substanz direkt in die Vorderkammer injiziert. Um den Einfluss von Moxifloxacin auf das Hornhautendothel, das Trabekelmaschenwerk und die menschliche Linse zu untersuchen, wurden primäre, humane TMC und zwei etablierte okuläre

Zelllinien (humane CEC und LEC) mit unterschiedlichen Konzentrationen Moxifloxacin behandelt. Exemplarisch für den hinteren Augenabschnitt und die menschliche Netzhaut wurden zusätzlich primäre RPE-Zellen auf mögliche toxische Effekte von Moxifloxacin untersucht. Hierzu wurden durch entsprechende Verdünnung der handelsüblichen Vigamox® Augentropflösung (Vigamox® AT, 0,5% Moxifloxacin-Hydrochlorid, Alcon Pharma, Freiburg) 10 unterschiedlichen Konzentrationen Moxifloxacin (10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 350 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ und 750 $\mu\text{g/ml}$) getestet und zwei etablierte toxikologische Testverfahren, der MTT-Assay und der Live-Dead-Assay, durchgeführt [21, 22, 24].

Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen der entsprechenden Zellkultur. Die primären RPE-Zellen und TMC wurden von 5 Spenderaugen aus der Hornhautbank der Augenklinik der LMU gewonnen und wie bereits beschrieben kultiviert [22, 23, 24].

Alle Untersuchungen erfolgten an stationären Zellkulturen. Untersuchungen an stationären Zellkulturen erleichtern, besonders im MTT-Assay, die Abgrenzung von zytotoxischen gegenüber antiproliferativen Effekten eines Wirkstoffs.

Hierzu wurden ca. 2×10^5 Zellen (CEC, LEC und RPE) und ca. 4×10^5 Zellen (TMC) pro Well auf 6 Well-Platten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen für 24 h unter serumfreien Kulturbedingungen gehalten, um dann für weitere 24 h mit den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen behandelt zu werden. Im Anschluss daran wurde der MTT-Assay und der Live-Dead-Assay durchgeführt. Die Versuche mit primären, humanen Zellen wurden mit Zellen von je 3 unterschiedlichen Spendern durchgeführt und alle Versuche jeweils dreimal wiederholt.

Toxizitätstestung von Moxifloxacin im Entzündungsmodell

Es sollte untersucht werden, ob eine mögliche intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin auch unter Bedingungen, wie sie bei einer akuten intraokularen Entzündung vorherrschen, sicher ist.

M. Kernt · C. Hirneiss · A.S. Neubauer · R.G. Liegl · K.H. Eibl · A. Wolf · H. de Kaspar · M.W. Ulbig · A. Kampik

Moxifloxacin intrakameral: Eine sichere Option zur Endophthalmitisprophylaxe? In-vitro-Sicherheitsprofil zur intraokularen Anwendung

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Wirksamkeit von Moxifloxacin (Vigamox®) umfasst die meisten für bakterielle Endophthalmitiden verantwortlichen Keime. Die systemische und topische Anwendung von Moxifloxacin ist erprobt, es gibt aber bisher nur wenig Erfahrung über die Sicherheit bei der intrakameralen Anwendung zur Vorbeugung der bakteriellen Endophthalmitis.

Methoden. Die Endotheltoxizität von Moxifloxacin (Vigamox®) wurde an humanen, kultivierten Spenderhornhäuten untersucht. Primäre humane retinale Pigmentepithelzellen (RPE), Trabekelmaschenwerkzellen (TMC), humane Linsenepithelzellen (LEC) und korneale Endothelzellen (CEC) wurden mit Vigamox® in unterschiedlichen Konzentrationen (10–750 µg/ml Moxifloxacin) behandelt. Mögliche

toxische Effekte wurden nach 24 h untersucht (MTT-Assay, Live-Dead-Assay). Um die Sicherheit von Vigamox® im entzündeten Auge zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α, LPS und IL-6) ausgesetzt.

Ergebnisse. Nach 30 Tagen Behandlung mit 500 µg/ml Moxifloxacin zeigte sich kein Hinweis auf endotheliale Toxizität an Spenderhornhäuten. Bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml Moxifloxacin zeigten sich bei keiner der untersuchten Zelllinien Hinweise auf Toxizität. Auch in Anwesenheit von oxidativem Stress und proinflammatorischen Zytokinen wurde bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml Moxifloxacin keine signifikante Zunahme der toxischen Effekte beobachtet.

Zusammenfassung. Diese Studie zeigt, dass Vigamox® (Moxifloxacin) bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml keine toxische Wirkung auf CEC-, TMC-, LEC- und RPE-Zellen hat. Die MIC90 von Moxifloxacin für die häufigsten Erreger der bakteriellen Endophthalmitis liegt zwischen 0,25 mg/ml und 2,5 µg/ml. Daher erscheint die intrakamurale Injektion von Vigamox® zur Vorbeugung der bakteriellen Endophthalmitis in therapeutischen Konzentrationen sicher.

Schlüsselwörter

Endophthalmitis · Antibiotika · Intrakamurale Medikamenteneingabe · Fluorchinolone · Moxifloxacin

Intracameral moxifloxacin: a safe option for endophthalmitis prophylaxis? In vitro safety profile for intraocular application

Abstract

Background. Moxifloxacin (Vigamox®), a 4th-generation fluoroquinolone, covers most isolates causing endophthalmitis. It is safe and effective for systemic and topical use; however, only very limited data are available on prophylactic intracameral administration to prevent endophthalmitis. This study investigated the safety of Vigamox® for intracameral application in a cell-culture model.

Methods. The endothelial toxicity of moxifloxacin (Vigamox®) was evaluated in cultured human corneas. Primary human retinal pigment epithelium cells (RPEs), trabecular meshwork cells (TMCs), lens epithelium cells (LECs), and corneal endothelial cells (CECs) were treated with concentrations of Vigamox. Toxic effects were evaluated after 24 h (MTT assay and live–dead assay). By treating

TMC, CEC, and RPE cells either with oxidative stress or tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), lipopolysaccharide (LPS), and interleukin-6 (IL-6), the effects of moxifloxacin on cellular viability under conditions of inflammation were investigated.

Results. No corneal endothelial toxicity could be detected after 30 days of treatment with moxifloxacin 500 µg/ml. Primary RPEs, TMCs, LECs, and CECs showed adverse effects on proliferation and viability only at concentrations higher than 150 µg/ml moxifloxacin. After preincubation with TNF-α, LPS, and IL-6 for 24 h and subsequent treatment with moxifloxacin at concentrations of 10–150 µg/ml for 24 h, no significant decrease in proliferation or viability was observed. H₂O₂ exposure did not increase cellular toxicity

Conclusion. Vigamox® did not show significant toxicity on primary RPEs, TMCs, LECs, CECs, or human corneal endothelium at concentrations up to 150 µg/ml. The MIC90 of moxifloxacin for pathogens commonly encountered in endophthalmitis is known to be in the range of 0.25–2.5 µg/ml. Therefore, intracameral use of Vigamox® at concentrations up to 150 µg/ml may be safe and effective for preventing endophthalmitis after intraocular surgery.

Keywords

Endophthalmitis · Antibiotics · Intracameral drug delivery · Fluoroquinolones · Moxifloxacin

Untersuchung der Sicherheit von Moxifloxacin unter den Bedingungen des oxidativen Stresses

Akute intraokulare Entzündungen sind unter anderem durch die Bildung freier Sauerstoffradikale und damit oxidativem Stress gekennzeichnet. Um zu untersuchen, ob die intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin auch unter solchen Bedingungen sicher ist, wurden die Zellen für 4 h mit 400 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) behandelt. Danach wurde das H₂O₂ durch dreimaliges sorgfältiges Spülen mit serumfreiem Medium entfernt und die Zellen wurden den unterschiedlichen Konzentrationen Moxifloxacin behandelt. Dann wurde der MTT-Assay durchgeführt.

Untersuchung der Sicherheit von Moxifloxacin in Gegenwart von 3 proinflammatorischen Zytokinen (LPS; TNF-α und IL-6)

Um die Sicherheit von Moxifloxacin auch unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen zu testen, wurde der Wirkstoff in einem etablierten Entzündungsmodell untersucht [21, 22, 23]. Hierfür wurden die Zellen entweder mit LPS (20 µg/ml), TNF-α (10 µg/ml) oder IL-6 (20 ng/ml) für 24 h vorbehandelt. Dann wurde das zytokinhaltige Zellkulturmedium durch dreimaliges Spülen entfernt und die Zellen wie beschrieben mit den unterschiedlichen Konzentrationen Moxifloxacin behandelt und danach der MTT-Assay durchgeführt. Die Zytokinkonzentrationen wurden hierbei entsprechend den Konzentrationen gewählt, die bei einer intraokularen Entzündung in vivo auftreten können [15, 17, 36, 38, 41].

MTT-Assay

Der Tetrazolium-Farbreduktionsassay (MTT; 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und ist eine Standarduntersuchungstechnik von Substanzen in Zellkultur. Details des Untersuchungsanges sind andernorts beschrieben [22, 23]. Prinzipiell werden die Zellen mit dem initial gelben MTT-Farbstoff inkubiert. Der Farbstoff wird entsprechend dem Vitalitätsgrad der Zellen verstoffwechselt und

schlägt ins violette über. Diese Farbänderung wird photometrisch gemessen und erlaubt Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen.

Live-Dead-Assay

Im Live-Dead-Assay wird die Induktion von Zelltod unter dem Einfluss bestimmter Bedingungen untersucht. Die Zellkerne nicht lebensfähiger Zellen werden durch den roten, nichtmembrangängigen Farbstoff Propidiumjodid angefärbt werden. Gleichzeitig werden die Kerne aller Zellen durch den blauen, membrangängigen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt werden. Eine Zweifarben-Fluoreszenzuntersuchung ermöglicht die Differenzierung beider Färbungen, und die Anzahl der lebenden und der toten Zellen lässt sich bestimmen. Der Test wurde entsprechend vorangehender Beschreibung [22, 23, 24] und den Angaben des Herstellers (Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Ergebnisse

Seropositive Spenderhornhäute wurden nach Behandlung mit Vigamox® im Verlauf von 30 Tagen wöchentlich untersucht. Dabei wurde die Endothelzellzahl als das maßgebliche Kriterium für die Aufrechterhaltung der Klarheit und Vitalität der Hornhaut im Phasenkontrast-Mikroskop bestimmt. Selbst die hochdosierte Behandlung der Spenderhornhäute mit 250 µg/ml und 500 µg/ml Moxifloxacin führte zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der untersuchten Konzentration von Moxifloxacin zu einer signifikanten Abnahme der Endothelzellzahl oder zu andere Auffälligkeiten.

— **Therapeutische Konzentrationen von Moxifloxacin (Vigamox®) haben keine toxische Wirkung auf Hornhautendothel, Trabekelmaschenwerk und Linseneptithel.**

In **Abb. 1** ist die Endothelzellzahl der untersuchten Hornhäute nach 30 Tagen gezeigt.

In der Zellkultur zeigte sich nach 24 h Inkubation von primären TMC, CEC und LEC bis zu einer Konzentration von

250 µg/ml Moxifloxacin keine Toxizität von Vigamox®. Die behandelten Zellen wurden weder im MTT-Assay, der die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht, noch im Live-Dead-Assay in auffälliger Weise beeinflusst. (**Abb. 2, 3a, b**)

Die untersuchten primären RPE-Zellen zeigten bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml Moxifloxacin nach 24 h Inkubation keinerlei Beeinflussung durch Vigamox, weder im Hinblick auf die Vitalität noch im Bezug auf die Induktion von Zelltod (**Abb. 2, 3b**).

— **Es zeigte sich keine Beeinflussung der Vitalität von RPE-Zellen durch therapeutische Dosen Moxifloxacin (Vigamox®).**

Nach zusätzlicher Behandlung der untersuchten Zelllinien (CEC, TMC, LEC und RPE) mit 400 µM Wasserstoffperoxid für 4 h ließ sich im MTT-Assay bei Konzentrationen über 150 µg/ml Moxifloxacin eine deutliche Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität, die uns Rückschlüsse über die Proliferationsfähigkeit der Zellen erlaubt, zeigen. Bis 150 µg/ml Moxifloxacin kam es aber bei keiner der untersuchten Zellkulturen zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität. Im Live-Dead-Assay kam es durch Vigamox® auch unter dem Einfluss von H₂O₂ erst bei Konzentration über 250 µg/ml Moxifloxacin zu einer vermehrten Induktion von Zelltod (**Abb. 4**).

— **Auch unter Bedingungen, wie sie im Rahmen einer akuten intraokularen Entzündung auftreten können, kommt es zu keiner Toxizitätszunahme von therapeutischen Moxifloxacidosen.**

Die Vorbehandlung der Zellen mit 3 proinflammatorischen Zytokinen, LPS, TNF-α und IL-6, führte zu keiner Zunahme der Toxizität von Vigamox® (**Abb. 5**).

Diskussion

Mit Moxifloxacin (Vigamox® AT, 0,5% Moxifloxacin-Hydrochlorid, Alcon Pharma, Freiburg) steht in Deutschland seit kurzem erstmals ein Fluorchinolantonanti-

otikum der 4. Generation für die Anwendung am Auge zur Verfügung. Moxifloxacin wurde ursprünglich für die systemische Anwendung schwerwiegender Atemwegsinfektionen entwickelt [37], kommt aber in den USA bereits seit einiger Zeit erfolgreich zur topischen Therapie von Infektionen am Auge zum Einsatz [40].

Ziel dieser In-vitro-Studie war es zu untersuchen, ob eine intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin in Form von Vigamox AT aus pharmakologisch/toxikologischer Sicht sicher ist.

Durch In-vitro-Testung kann eine Substanz toxikologisch standardisiert evaluiert werden. Mögliche Nebenwirkungen auf einzelne Strukturen im Auge lassen sich durch Untersuchung einzelner Zellkulturen gut reproduzierbar analysieren.

Um die Sicherheit von Moxifloxacin im Hinblick auf wichtige Strukturen des vorderen Augenabschnitts zu untersuchen, haben wir humane Spenderhornhäute, TMC und LEC untersucht. Außerdem wurden exemplarisch für den hinteren Augenabschnitt und die Netzhaut RPE-Zellen, als etabliertes Modell grundlegende Toxizitätstestung am Auge [23, 24], beurteilt.

Der Wirkmechanismus der Fluorchinolone beruht auf einer selektiven Hemmung zweier Enzyme, die an der bakteriellen DNA Replikation beteiligt sind: die bakterielle DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV [8]. Im Gegensatz zu früheren Fluorchinolonegenerationen hemmen Fluorchinolone der 4. Generation wie Moxifloxacin beide Enzyme [8]. Dies führt zu einer verbesserten Wirksamkeit von Moxifloxacin sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Keime [8]. Die häufigsten Erreger der bakteriellen Endophthalmitis wie *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Haemophilus influenzae* und *Bacillus cereus* werden erreicht [7, 28].

Aus verschiedenen Untersuchungen weiß man, dass die minimale inhibitorische Konzentration, bei der 90% dieser Erreger durch Moxifloxacin abgetötet werden (MIC₉₀), im Bereich von 0,25 bis 2,5 µg/ml liegt [8, 32]. Moxifloxacin penetriert wie alle Fluorchinolone gut in das Au-

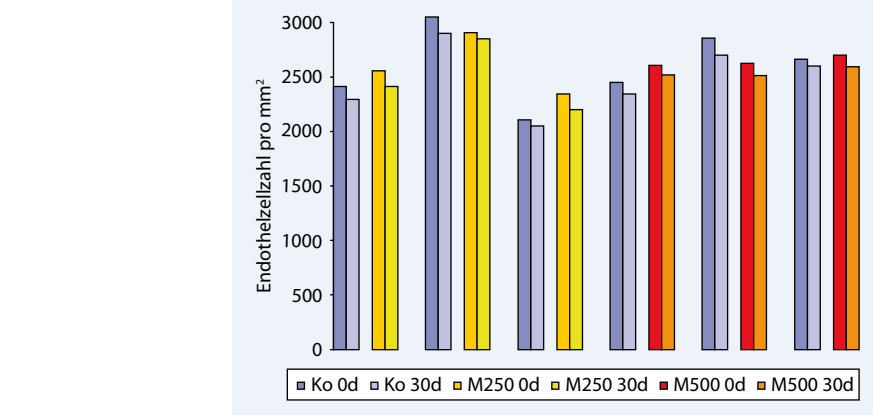


Abb. 1 ▲ Die Toxizität von Vigamox wurde an paarigen humanen Spenderhornhäuten untersucht. Hierzu wurde jeweils eine der Hornhäute mit Vigamox in einer Konzentration von 250 µg/ml (dunkel- und hellgelb) oder 500 µg/ml Moxifloxacin (rot/orange) behandelt. Die jeweils andere Hornhaut (hell- und dunkelblau) eines Paares diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Die Endothelzellzahl wurde im Verlauf von 30 Tagen beurteilt. Bei keiner der untersuchten Moxifloxacin-Konzentration und zu keinem Zeitpunkt (hier sind die Endothelzellzahlen der untersuchten Hornhäute nach 30 Tagen gezeigt) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Endothelzellzahl im Vergleich zu den Kontrollhornhäuten

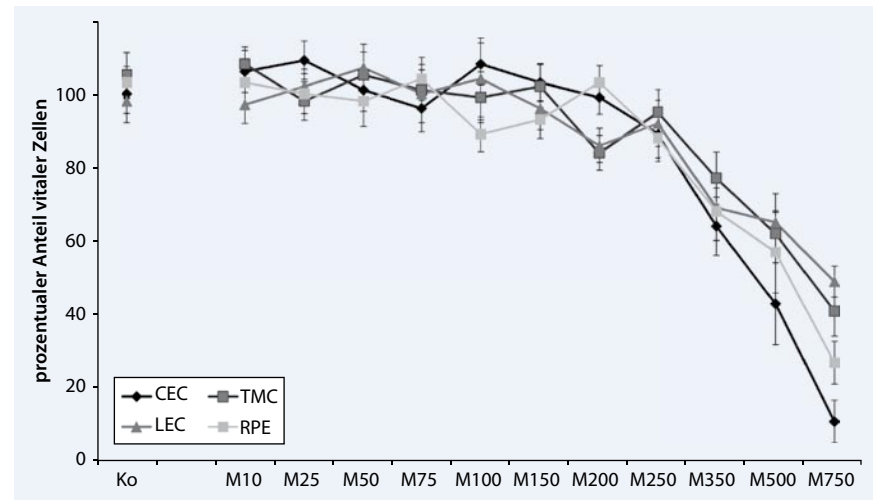


Abb. 2 ▲ Mit einem Zellproliferationsassay (MTT-Assay) wurde die Proliferationsfähigkeit von humanen Hornhautendothelzellen (CEC), Trabekelwerkzellen (TMC), Linsenepithelzellen (LEC) und retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) nach Behandlung mit Vigamox® untersucht. Erst ab einer Moxifloxacin-Konzentrationen >250 µg/ml zeigte sich eine signifikante Abnahme der Zellproliferation

ge. Bei zweistündlicher topischer Anwendung lassen sich durchschnittliche Kammerwasserkonzentrationen von 2,3 µg/ml erreichen. Im Glaskörperraum wird aber nur ein Zehntel dieser Konzentration erreicht [18]. Durch systemische Gabe von Moxifloxacin können die Glaskörperkonzentrationen bis auf 2,5 µg/ml gesteigert werden. Da aber in jüngster Zeit bei der hochdosierten systemischen Therapie mit Moxifloxacin über teils schwerwiegende muskuloskeletale Nebenwirkungen berichtet worden ist (s. Deutsches Ärzteblatt 25.07.08) und letztlich die durch systemische Gabe im Auge erreichbaren Konzentrationen für eine effektive Thera-

pie einer schwerwiegenden intraokularen Infektion immer noch deutlich zu niedrig sind [33], erscheint die lokale, intrakamerale Anwendung von Moxifloxacin als eine sinnvolle Alternative.

Unsere Untersuchung konnte zeigen, dass Moxifloxacin-Konzentrationen bis 150 µg/ml bei keiner der untersuchten Zelllinien Toxizitätsmerkmale zeigten. Dies entspricht etwa dem 50-Fachen der Konzentration, die für die effektive Therapie selbst wenig empfindlicher Keime notwendig wäre [32]. Bei den untersuchten humanen Spenderhornhäuten ließ sich selbst nach hochdosierter Langzeitexposition (500 µg/ml Moxifloxacin

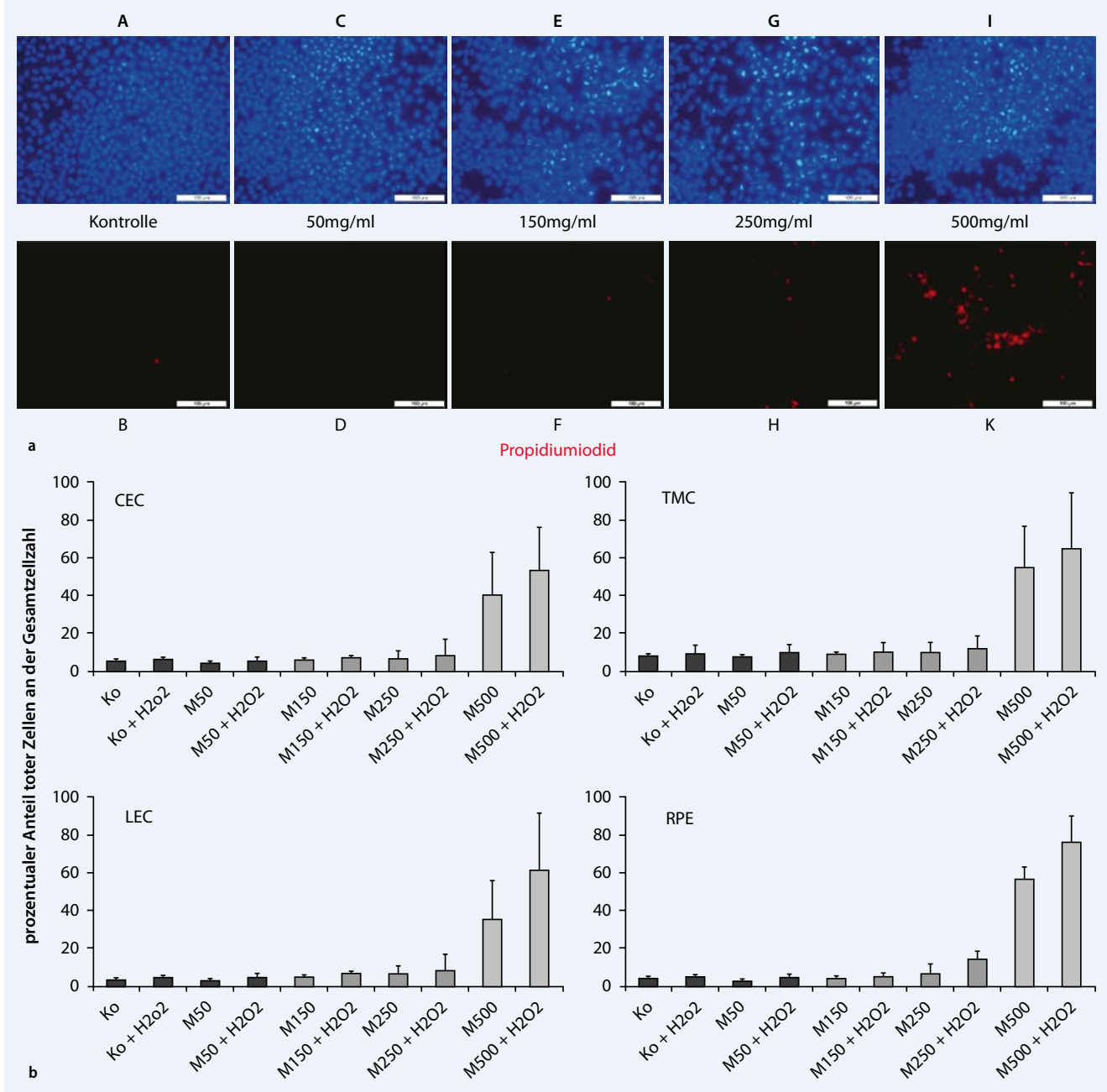


Abb. 3 **a** Live-Dead-Assay: Induktion von Zelltod nach Behandlung der Linseneithelzellen (LEC) mit Vigamox®. Die Gesamtzahl der Zellen ist blau dargestellt (A, B, E, G, I), die Anzahl toter Zellen rot (B, D, F, H, K). Bis zu einer Moxifloxacin-Konzentration von 250 µg/ml lässt sich keine signifikante Induktion von Zelltod bei den untersuchten LEC nachweisen (A–H). Erst ab einer Konzentration von 500 µg/ml kommt es zu einer dosisabhängigen Zunahme von Zelltod (I und K). Die Behandlung von TMC-, CEC- und RPE-Zellen mit Vigamox® erbrachte vergleichbare Ergebnisse im Live-Dead-Assay. **b** Der prozentuale Anteil toter Zelle an der Gesamtzellzahl nach Behandlung mit den unterschiedlichen Moxifloxacin-Konzentrationen wurde für humane Hornhautendothelzellen (CEC), Trabekelwerkzellen (TMC), Linseneithelzellen (LEC) und retinale Pigmentepithelzellen (RPE) mit einem Zweifarbenfluoreszenztest (Live-Dead-Assay) gemessen

über 30 Tage) keine Abnahme der Endothelzellichte beobachten. Diese Ergebnisse deuten auf eine ausgesprochen große therapeutische Breite von Moxifloxacin hin.

Wenn Antibiotika prophylaktisch angewendet werden sollen, drängt sich immer die Frage nach möglicher Resisten-

zentwicklung durch Keimmutation auf. Berichte über mögliche Resistenzentwicklung einzelner grampositiver Keime nach prophylaktischer topischer Anwendung von Fluorchinolonen der 3. Generation sind bekannt [11, 29]. Solche Berichte über mögliche Resistenzen müssen ernst genommen werden, es ist jedoch an-

zumerken, dass es sich hierbei um In-vitro-Untersuchungen handelt und sich die Angaben auf Serum-Wirkstoffkonzentrationen (8 µg/ml) beziehen. Für Fluorchinolone wird die zur Vorbeugung von Mutationen notwendige Wirkstoffkonzentration (MPC) mit dem 8- bis 10-Fachen der MIC₉₀ angegeben [34, 39]. Eine

Abb. 4 ► Auch nachdem die Zellen zusätzlich mit 400 μM H_2O_2 behandelt wurden, kam es im Zellproliferationsassay (MTT-Assay) bei den untersuchten Zellen (CEC, TMC, LEC und RPE) erst ab Moxifloxacin-Konzentrationen $>150\mu\text{g/ml}$ zu einer deutlichen Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Die Behandlung mit Vigamox® in niedrigeren Konzentrationen beeinflusste die Zellen aber nicht signifikant

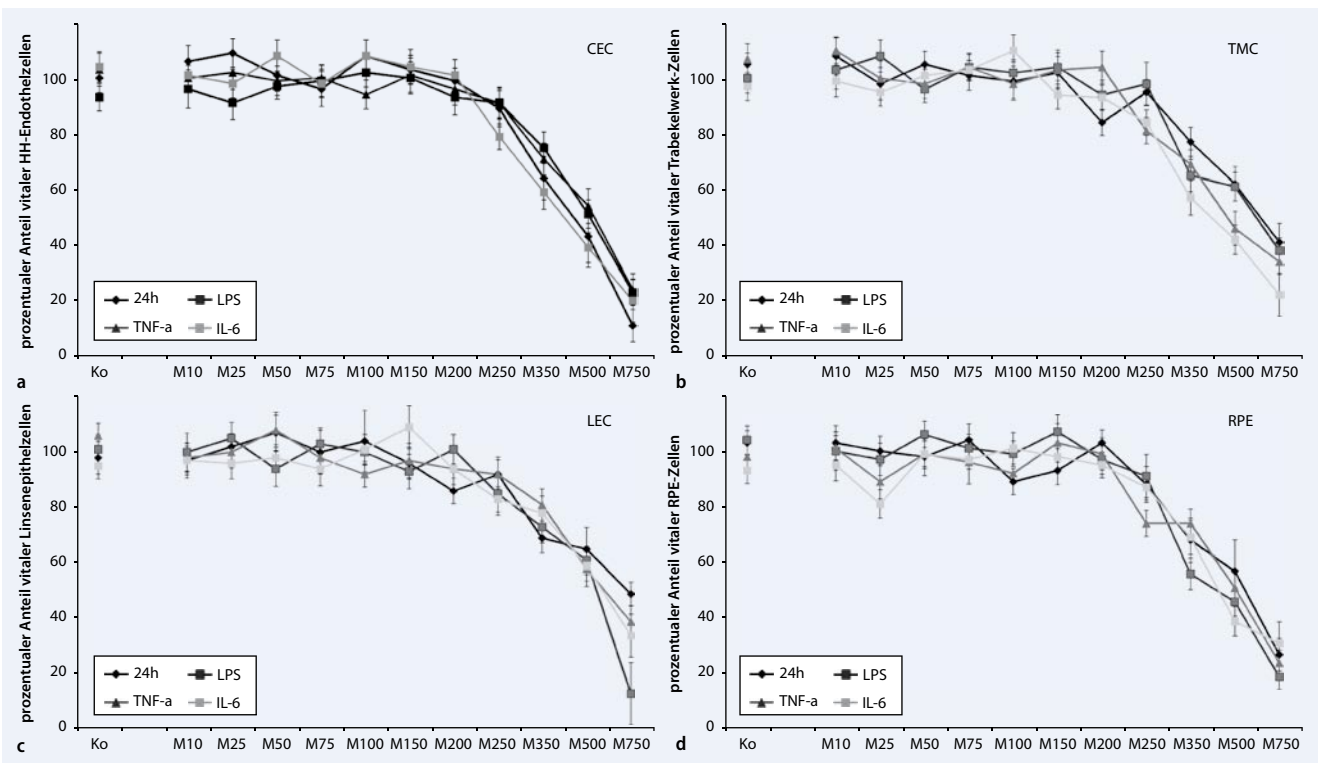
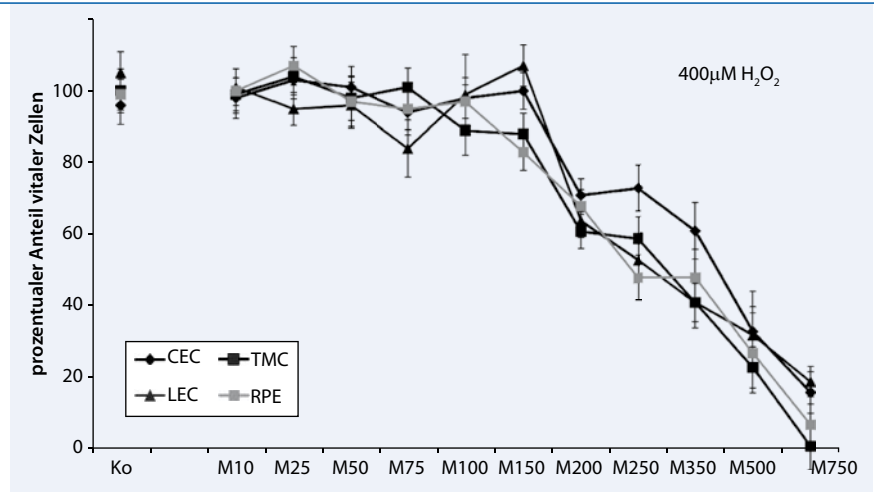


Abb. 5 ▲ Im Entzündungsmodell wurden die Zellen zusätzlich mit 3 proinflammatorischen Zytokinen behandelt. Hierbei kam es bei keiner der Untersuchten Zelllinien zu einer Zunahme an Toxizität durch Vigamox® (a CEC, b TMC, c LEC und d RPE-Zellen; LPS Lipopolysaccharid, TNF- α Tumornekrosefaktor- α , IL-6 Interleukin-6)

Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ Moxifloxacin würde selbst die MPC wenig empfindlicher Keime um das 5-Fache übersteigen, sodass die Entwicklung resistenter Keime höchst unwahrscheinlich ist [8, 32].

Zudem konnte eine kürzlich veröffentlichte mikrobiologische Studie, die 256 Bakterienstämme aus Bindehautabstrichen von 160 Patienten untersucht hat, zeigen, dass die Resistenzraten gegen Moxifloxacin sehr gering waren und selbst Problemkeime wie *S. aureus* und mul-

tiresistente Stämme eine gute Empfindlichkeit gegenüber Moxifloxacin aufwiesen [26].

Nicht nur eine intraokulare Infektion, auch ein chirurgischer Eingriff als solcher kann zu entzündlichen Reaktionen im Auge führen, die mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, oxidativem Stress und dem Untergang von Zellen einhergehen. Eine potentielle Komplikation nach Kataraktoperation ist das „toxic anterior segment

syndrom“ (TASS). Es kann durch primäre Toxizität von in die Vorderkammer eingebrachten Substanzen, aber auch durch zu große pH-Wert- oder Osmolaritätsschwankungen hervorgerufen werden [30]. Schwere Fällen eines TASS gehen nicht selten mit Endotheldekompensation und akutem Glaukom einher [30]. In diesem Zusammenhang erscheint die Tatsache, dass selbst in unserem Entzündungsmodell, in dem die Zellen hochdosiertem oxidativem Stress und 3 hochwirksamen

proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt wurden, bis zu einer Konzentration von 150 µg/ml Moxifloxacin keine zusätzliche Toxizität auftrat, besonders wichtig. Zudem ist die Vigamox® Augentropflösung unkonserviert, isotonisch und liegt mit einem pH-Wert von 6,8 und einer Osmolarität von 200–400 mOsm/kg (Angaben des Herstellers) im physiologischen Bereich. Die Galenik lässt somit die intrakamerale Anwendung von Vigamox® unbedenklich erscheinen.

Fazit für die Praxis

Ingesamt deuten die Ergebnisse unserer In-vitro-Studie zur Sicherheit von Vigamox®/Moxifloxacin für die intrakamerale Anwendung auf eine gute Verträglichkeit des Medikaments und des Wirkstoffs hin. Wir konnten zeigen, dass Moxifloxacin in Konzentrationen von 10–150 µg/ml an keiner der untersuchten Zelllinien (CEC, TMC, LEC und RPE) und selbst im Modell einer schweren Entzündung keinerlei Hinweise auf Toxizität oder negative Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten gezeigt hat. Diese Konzentrationen liegen bis zu 50mal über der MIC90 der häufigsten Endophthalmitiserreger [8, 32]. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit experimentellen In-vitro-Untersuchungen, die die Sicherheit und Wirksamkeit von Moxifloxacin in einem Endophthalmitismodell untersucht haben [6, 12, 13, 27]. Unsere Studie untersuchte nicht die Wirksamkeit von Vigamox® und seinem Wirkstoff Moxifloxacin. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die direkte Applikation von Vigamox® in therapeutischen Konzentrationen in vitro keine toxischen Effekte auf die untersuchten okulären Zellen hatte. Zur weiteren Evaluierung dieser Daten sind klinische Studien notwendig. Unsere Ergebnisse unterstützen aber vorangegangene Untersuchungen, die daraufhin deuten, dass Vigamox®/Moxifloxacin eine vielversprechende und sichere Option zur Vorbeugung der bakteriellen Endophthalmitis ist.

Korrespondenzadresse

Dr. M. Kernt



Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
Mathildenstraße 8,
80336 München
Marcus.Kernt@
med.uni-muenchen.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehung hin: Die Durchführung der Untersuchung wurde durch die ALCON Pharma GmbH, Freiburg, unterstützt.

Literatur

1. (n a) (2007) Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. *J Cataract Refract Surg* 33:978–988
2. (n a) (1995) Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Arch Ophthalmol* 113:1479–1496
3. Aaberg TM Jr, Flynn HW Jr, Murray TG (1994) Intracocular ceftazidime as an alternative to the aminoglycosides in the treatment of endophthalmitis. *Arch Ophthalmol* 112:18–19
4. Aaberg TM Jr, Flynn HW Jr, Schiffman J, Newton J (1998) Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis survey. A 10-year review of incidence and outcomes. *Ophthalmology* 105:1004–1010
5. Axer-Siegel R, Stiebel-Kalish H, Rosenblatt I et al (1999) Cystoid macular edema after cataract surgery with intraocular vancomycin. *Ophthalmology* 106:1660–1664
6. Aydin E, Kazi AA, Peyman GA, Esfahani MR (2006) Intravitreal toxicity of moxifloxacin. *Retina* 26:187–190
7. Benz MS, Scott IU, Flynn HW Jr et al (2004) Endophthalmitis isolates and antibiotic sensitivities: a 6-year review of culture-proven cases. *Am J Ophthalmol* 137:38–42
8. Blondeau JM (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol* 49(Suppl 2):S73–S78
9. Callegan MC, Ramirez R, Kane ST et al (2003) Antibacterial activity of the fourth-generation fluoroquinolones gatifloxacin and moxifloxacin against ocular pathogens. *Adv Ther* 20:246–252
10. Congdon N, Vingerling JR, Klein BE et al (2004) Prevalence of cataract and pseudophakia/aphakia among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:487–494
11. Deramo VA, Lai JC, Fastenberg DM, Udell IJ (2006) Acute endophthalmitis in eyes treated prophylactically with gatifloxacin and moxifloxacin. *Am J Ophthalmol* 142:721–725
12. Ermis SS, Cetinkaya Z, Kiyici H et al (2007) Effects of intravitreal moxifloxacin and dexamethasone in experimental Staphylococcus aureus endophthalmitis. *Curr Eye Res* 32:337–344
13. Ermis SS, Cetinkaya Z, Kiyici H, Ozturk F (2005) Treatment of Staphylococcus epidermidis endophthalmitis with intravitreal moxifloxacin in a rabbit model. *Tohoku J Exp Med* 205:223–229
14. Espiritu CR, Caparas VL, Bolinao JG (2007) Safety of prophylactic intracameral moxifloxacin 0.5% ophthalmic solution in cataract surgery patients. *J Cataract Refract Surg* 33:63–68
15. Feys J, Emond JP, Salvanet-Bouccara A, Dublanquet A (1994) Interleukin-6 and other cytokines in the aqueous humor in uveitis and endophthalmitis. *J Fr Ophtalmol* 17:634–639
16. Gao H, Pennesi ME, Qiao X et al (2006) Intravitreal moxifloxacin: retinal safety study with electroretinography and histopathology in animal models. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1606–1611
17. Giese MJ, Sumner HL, Berliner JA, Mondino BJ (1998) Cytokine expression in a rat model of Staphylococcus aureus endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2785–2790
18. Hariprasad SM, Blinder KJ, Shah GK et al (2005) Penetration pharmacokinetics of topically administered 0.5% moxifloxacin ophthalmic solution in human aqueous and vitreous. *Arch Ophthalmol* 123:39–44
19. Javitt JC, Street DA, Tielsch JM et al (1994) National outcomes of cataract extraction. Retinal detachment and endophthalmitis after outpatient cataract surgery. Cataract Patient Outcomes Research Team. *Ophthalmology* 101:100–105; discussion 106
20. Kattan HM, Flynn HW Jr, Pflugfelder SC et al (1991) Nosocomial endophthalmitis survey. Current incidence of infection after intraocular surgery. *Ophthalmology* 98:227–238
21. Kernt M, Neubauer AS, HM DEK, Kampik A (2008) INTRAVITREAL VORICONAZOLE: In Vitro Safety-Profile for Fungal Endophthalmitis. *Retina* 29:362–370
22. Kernt M, Neubauer AS, Liegl RG et al (2009) Intracameral Moxifloxacin: In Vitro Safety on Human Ocular Cells. *Cornea*
23. Kernt M, Neubauer AS, Ulbig MW et al (2008) In vitro safety of intravitreal moxifloxacin for endophthalmitis treatment. *J Cataract Refract Surg* 34:480–488
24. Kernt M, Welge-Lüssen U, Yu A et al (2007) Bevacizumab is not toxic to human anterior- and posterior-segment cultured cells. *Ophthalmologie* 104:965–971
25. Kim SY, Park YH, Lee YC (2008) Comparison of the effect of intracameral moxifloxacin, levofloxacin and cefazolin on rabbit corneal endothelial cells. *Clin Experiment Ophthalmol* 36:367–370
26. Koss MJ, Eder M, Blumenkranz MS et al (2007) The effectiveness of the new fluoroquinolones against the normal bacterial flora of the conjunctiva. *Ophthalmologie* 104:21–27
27. Kowalski RP, Romanowski EG, Mah FS et al (2005) Intracameral Vigamox (moxifloxacin 0.5%) is nontoxic and effective in preventing endophthalmitis in a rabbit model. *Am J Ophthalmol* 140:497–504
28. Kunimoto DY, Das T, Sharma S et al (1999) Microbiologic spectrum and susceptibility of isolates: part I. Postoperative endophthalmitis. Endophthalmitis Research Group. *Am J Ophthalmol* 128:240–242
29. Kunimoto DY, Sharma S, Garg P, Rao GN (1999) In vitro susceptibility of bacterial keratitis pathogens to ciprofloxacin. Emerging resistance. *Ophthalmology* 106:80–85
30. Mamalis N, Edelhauser HF, Dawson DG et al (2006) Toxic anterior segment syndrome. *J Cataract Refract Surg* 32:324–333
31. Masket S (1998) Preventing, diagnosing, and treating endophthalmitis. *J Cataract Refract Surg* 24:725–726

32. Mather R, Karenchak LM, Romanowski EG, Kowalski RP (2002) Fourth generation fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *Am J Ophthalmol* 133:463–466
33. McCulley JP, Caudle D, Aronowicz JD, Shine WE (2006) Fourth-generation fluoroquinolone penetration into the aqueous humor in humans. *Ophthalmology* 113:955–959
34. Metzler K, Hansen GM, Hedlin P et al (2004) Comparison of minimal inhibitory and mutant prevention drug concentrations of 4 fluoroquinolones against clinical isolates of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 24:161–167
35. Miller JJ, Scott IU, Flynn HW Jr et al (2005) Acute-onset endophthalmitis after cataract surgery (2000–2004): incidence, clinical settings, and visual acuity outcomes after treatment. *Am J Ophthalmol* 139:983–987
36. Mo JS, Streilein JW (2001) Immune privilege persists in eyes with extreme inflammation induced by intravitreal LPS. *Eur J Immunol* 31:3806–3815
37. Rossi C, Stermon J (2001) Fluoroquinolones of the third and fourth generations. *J Pharm Belg* 56:137–148
38. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N et al (2006) Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by inhibiting nonproteolytic activation of prorenin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2686–2692
39. Schentag JJ (2002) Pharmacokinetic and pharmacodynamic predictors of antimicrobial efficacy: moxifloxacin and *Streptococcus pneumoniae*. *J Chemother* 14(Suppl 2):13–21
40. Smith A, Pennefather PM, Kaye SB, Hart CA (2001) Fluoroquinolones: place in ocular therapy. *Drugs* 61:747–761
41. Thomas J, Kanangat S, Rouse BT (1998) Herpes simplex virus replication-induced expression of chemokines and proinflammatory cytokines in the eye: implications in herpetic stromal keratitis. *J Interferon Cytokine Res* 18:681–690
42. Villada JR, Vicente U, Javaloy J, Alio JL (2005) Severe anaphylactic reaction after intracameral antibiotic administration during cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 31:620–621
43. West ES, Behrens A, McDonnell PJ et al (2005) The incidence of endophthalmitis after cataract surgery among the U.S. Medicare population increased between 1994 and 2001. *Ophthalmology* 112:1388–1394
44. Yoeruek E, Spitzer MS, Saygili O et al (2008) Comparison of in vitro safety profiles of vancomycin and cefuroxime on human corneal endothelial cells for intracameral use. *J Cataract Refract Surg* 34:2139–2145