

3 Zusammenfassung und Ausblick

Der vorliegende Methodenvergleich von *Amphibian Metamorphosis Assay* und *Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid Assay* ist vor dem Hintergrund des EU-Projektes ERGO zu sehen, das sich das Ziel gesetzt hat, die Bewertung endokriner Disruptoren durch Extrapolation von toxikologischen Daten zwischen verschiedenen Wirbeltierklassen zu verbessern. Dazu soll ein Netzwerk von AOP bezogen auf das Schilddrüsenhormonsystem aufgebaut werden, das wiederum geeignete Biomarker und Endpunkte enthält. In diesem Sinne soll eine Priorisierung verschiedener Assays stattfinden, um entweder neue Testrichtlinien schaffen zu können oder bestehende zu optimieren. Das Schilddrüsenhormonsystem wurde für diesen Ansatz herausgegriffen, da selbiges in den Wirbeltierklassen weitestgehend erhalten ist. Im einleitenden Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Signalwege des Schilddrüsenhormonsystems von der Synthese bis hin zur Wirkung der Hormone in den Zellen von Zielgewebe vorgestellt. Daraus wurde ersichtlich auf welchen Ebenen endokrine Disruptoren mit thyreoidaler Wirkung angreifen

können. Ebenso wurden durch die Erläuterungen zur schilddrüsenhormongesteuerten Metamorphose bei Lurchen die Grundlagen amphibienbasierter Testmethoden für die Identifizierung schilddrüsenwirksamer Substanzen dargestellt. Nach einem Überblick zu validierten amphibienbasierten OECD-Testrichtlinien wurden das experimentelle Studiendesign, die Aussagekraft und die Limitierungen sowie letztlich die Sensitivität von AMA und XETA gegenübergestellt.

Anhand der wesentlich kürzeren Dauer des XETA und dem damit verbundenen geringeren Ressourcenverbrauch sowie wegen des geringeren apparativen und personellen Aufwandes zeigt sich die technische Eignung als Screeningmethode für eine große Zahl an Substanzen. Allerdings wurden aus dem Validierungsbericht zur Testrichtlinie Nr. 248 auch die Abhängigkeit der Ergebnisse von einem entsprechenden Training vor Versuchsdurchführung sowie von der apparativen Ausstattung für die Fluoreszenzdetektion ersichtlich. Zusammen mit der bedingten Verfügbarkeit des Testorganismus (transgene TH/bZIP-GFP-Linie des *X. laevis*) aber auch seiner begrenzten Aussagekraft hinsichtlich von Hemmstoffen der TH-Synthese könnten dies Gründe für die bis dato eingeschränkte Nutzung der Methode sein.

Sowohl der AMA als auch der XETA sind nach dem ‚OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals‘ als Level 3-Methode eingestuft: *In-vivo* Assays, die Daten zu ausgewählten endokrinen Mechanismen oder Wirkungspfaden liefern. Das bedeutet, sie stellen Screeningmethoden auf potentielle thyreoidale Wirkung dar, lassen dabei jedoch weder die Ableitung von Effektkonzentrationen noch eine Aussage zum *mode of action* zu, d. h. es kann nicht geschlussfolgert werden, auf welcher Ebene des Schilddrüsenhormonsystems die Disruption stattfindet. Im Gegensatz zum XETA lassen sich aus dem AMA jedoch Indizien diesbezüglich ableiten, da hier vier verschiedene apikale Endpunkte sowie die Histopathologie der Schilddrüse in Gänze betrachtet werden können. Abgesehen davon deckt der XETA bei weitem nicht alle relevanten Wirkmechanismen ab, da beispielsweise die Störung der Schilddrüsenhormonproduktion nicht abgebildet werden kann. Dies ist wahrscheinlich die stärkste Limitierung des XETA, da eine Screeningmethode, die für den frühen Einsatz bei einer Vielzahl von Substanzen gedacht ist, ungeeignet erscheint, wenn sie für eine wichtige Gruppe von Disruptoren negative Ergebnisse liefert. Dies wird dadurch widerspiegelt, dass die OECD sowohl empfiehlt nach einem positiv ausgefallenen XETA die Durchführung eines AMA anzuschließen (um den *weight-of-evidence*-Ansatz zu stärken), als auch betont, dass ein negatives Ergebnis im XETA keine Aussage zur Schilddrüsenwirksamkeit zulässt. Bezüglich der Einsatzmöglichkeiten beider Methoden zielen die Empfehlungen der Europäischen Behörden darauf ab, in Abhängigkeit bereits existierender Daten zu entscheiden. Sobald Hinweise auf eine Adversität der beobachteten Effekte vorliegen oder endokrine Wirkungen nicht ausgeschlossen sind, sollte dem AMA Vorrang gewährt werden.

Der Vergleich von ermittelten *lowest observed effect concentrations* war anhand von fünf Substanzen möglich und zeigte, dass die Sensitivität des AMA für drei der fünf Stoffe höher ist als die des XETA (Thyroxin, Triclosan, Dibutylphthalat; letzteres konnte im XETA nicht detektiert werden). Die mit beiden Testrichtlinien ermittelten LOEC für Propylthiouracil liegen nah

beieinander und für Natriumperchlorat zeigte der XETA eine höhere Sensitivität, wobei die entsprechende LOEC des AMA der niedrigsten getesteten Konzentration entsprach. Für eine verallgemeinernde Aussage zu Sensitivitätsunterschieden zwischen den Methoden scheint die Zahl von fünf zu vergleichenden Substanzen zu gering, wobei tendenziell der AMA das sensitivere Setting zu bieten scheint, um endokrine Disruptoren mit thyreoidaler Wirkung zu detektieren.

Das AMA-Protokoll ist zwar deutlich zeitintensiver als das des XETA, jedoch ist es mit dem AMA möglich, Störungen aller Ebenen des Schilddrüsenhormonsystems abzubilden, was als grundlegende Eigenschaft einer geeigneten Screeningmethode angesehen werden sollte. Des Weiteren lässt die Gesamtheit der verschiedenen Endpunkte im Gegensatz zum XETA eine Aussage über die Adversität der Effekte zu, die im Rahmen einer evidenzbasierten Stoffbewertung genutzt werden kann. In Hinblick auf eine Optimierung des AMA-Protokolls konnte 2019 gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Kaulquappen im Stadium NF48, die für sieben, 21 und 28 Tage gegenüber PTU exponiert wurden, bereits nach sieben Tagen signifikante Effekte auf das Entwicklungsstadium zu beobachten waren.(Couderq, Leemans and Fini, 2020 zitieren Zhang *et al.*) Die dabei ermittelte Sensitivität war etwa zwei Mal höher als im AMA. Ein Vorteil dieses angepassten Designs ist des Weiteren, dass die Larven bereits zehn Tage früher eingesetzt werden können, als im AMA-Protokoll. Weitere Möglichkeiten zur Optimierung liegen in der Integration zusätzlicher Endpunkte, die zu einer Steigerung der Sensitivität beisteuern könnten, wie der Schilddrüsenhormonkonzentration oder der Expression Schilddrüsenhormon-gesteuerter Gene.(Dang, 2022)