

**Effekte des Antidiabetikums Metformin und seines  
Transformationsprodukts Guanylharnstoff  
auf den Gesundheitszustand von Bachforellen  
(*Salmo trutta f. fario*) und Posthornschnellen  
(*Planorbarius corneus*)**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Stefanie Jacob  
aus Saarlouis

Tübingen  
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

|                                   |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Tag der mündlichen Qualifikation: | 18.02.2020                    |
| Dekan:                            | Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel |
| 1. Berichterstatter:              | apl. Prof. Dr. Rita Triebkorn |
| 2. Berichterstatter:              | Prof. Dr. Christian Zwiener   |

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Teil 1: Zusammenfassung .....                                                                                                                                                  | 1   |
| 1. Promotionsthema.....                                                                                                                                                        | 1   |
| 2. Graphische Zusammenfassung.....                                                                                                                                             | 1   |
| 3. Einleitung.....                                                                                                                                                             | 2   |
| 4. Übergeordnete Fragestellungen .....                                                                                                                                         | 5   |
| 5. Material und Methoden .....                                                                                                                                                 | 6   |
| 6. Ergebnisse und Diskussion .....                                                                                                                                             | 24  |
| 7. Synthese .....                                                                                                                                                              | 32  |
| 8. Referenzen .....                                                                                                                                                            | 45  |
| Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten<br>Publikationen und Manuskripten.....                                                | 57  |
| Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten .....                                                                                                                                       | 59  |
| Kapitel I: Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea on<br>the health of the big ramshorn snail ( <i>Planorbarius corneus</i> )..... | 59  |
| Kapitel II: Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of<br>brown trout ( <i>Salmo trutta f. fario</i> )? .....                            | 77  |
| Kapitel III: Effects of guanylurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin,<br>on the health of brown trout ( <i>Salmo trutta f. fario</i> ) .....      | 103 |
| Anhang I.....                                                                                                                                                                  | 122 |
| Anhang II.....                                                                                                                                                                 | 126 |
| Publikationsliste und Konferenzbeiträge .....                                                                                                                                  | 129 |
| Danksagung .....                                                                                                                                                               | 130 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                         |                                                                                                                                                                 |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C                      | Grad Celsius                                                                                                                                                    |
| µg                      | Mikrogramm                                                                                                                                                      |
| µl                      | Mikroliter                                                                                                                                                      |
| µS                      | Mikro-Siemens                                                                                                                                                   |
| ADA                     | American diabetes association = Amerikanische Diabetes-Gesellschaft                                                                                             |
| AG                      | Arbeitsgruppe                                                                                                                                                   |
| AMP                     | Adenosinmonophosphat                                                                                                                                            |
| AMPK                    | Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase                                                                                                                   |
| ANOVA                   | Analysis of variance = Varianzanalyse                                                                                                                           |
| atm/m <sup>3</sup> /mol | Atmosphäre pro Kubikmeter pro Mol                                                                                                                               |
| ATP                     | Adenosintriphosphat                                                                                                                                             |
| bzw.                    | Beziehungsweise                                                                                                                                                 |
| cAMP                    | Cyclisches Adenosinmonophosphat                                                                                                                                 |
| CAS                     | Chemical abstracts service; CAS-Registrierungsnummer = internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe                                                |
| CE                      | Capillary electrophoresis = Kapillarelektrophorese                                                                                                              |
| CHP                     | Cumolhydroperoxid                                                                                                                                               |
| cm                      | Zentimeter                                                                                                                                                      |
| DNA                     | Desoxyribonukleinsäure                                                                                                                                          |
| EG                      | Europäische Gemeinschaft                                                                                                                                        |
| EMA                     | European medicines agency = Europäische Arzneimittel-Agentur                                                                                                    |
| EPA                     | Environmental protection agency = Umweltschutzbehörde                                                                                                           |
| EU                      | Europäische Union                                                                                                                                               |
| FOX-Assay               | Ferrous oxidation xylenol orange = Eisenoxidation-Xylenolorange-Assay                                                                                           |
| g                       | Gramm                                                                                                                                                           |
| GLP-1                   | Glukagon-like Peptid 1                                                                                                                                          |
| GLUT                    | Glukosetransporter                                                                                                                                              |
| HPLC                    | High performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie                                                                               |
| Hsp70                   | Hitze-Schock-Protein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa                                                                                                      |
| im Vgl.                 | Im Vergleich                                                                                                                                                    |
| insg.                   | insgesamt                                                                                                                                                       |
| kDa                     | Kilo-Dalton                                                                                                                                                     |
| KIT                     | Karlsruher Institut für Technologie                                                                                                                             |
| L                       | Liter                                                                                                                                                           |
| LOEC                    | Lowest observed test concentration = niedrigste Testkonzentration eines Stoffes, bei der in einem ökotoxikologischen Test ein signifikanter Effekt zu sehen ist |
| log Kow                 | Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten                                                                                                         |
| M                       | Mol pro Liter                                                                                                                                                   |
| mA                      | Milli-Ampere                                                                                                                                                    |
| mg                      | Milligramm                                                                                                                                                      |
| min                     | Minute                                                                                                                                                          |
| ml                      | Milliliter                                                                                                                                                      |
| mm                      | Millimeter                                                                                                                                                      |
| mRNA                    | Messenger Ribonukleinsäure                                                                                                                                      |
| MS 222                  | Tricain-Methansulfonat                                                                                                                                          |
| nm                      | Nanometer                                                                                                                                                       |
| NOEC                    | No observed effect concentration = höchste Konzentration eines Stoffes, die in einem ökotoxikologischen Test gerade noch keinen signifikanten Effekt zeigt      |

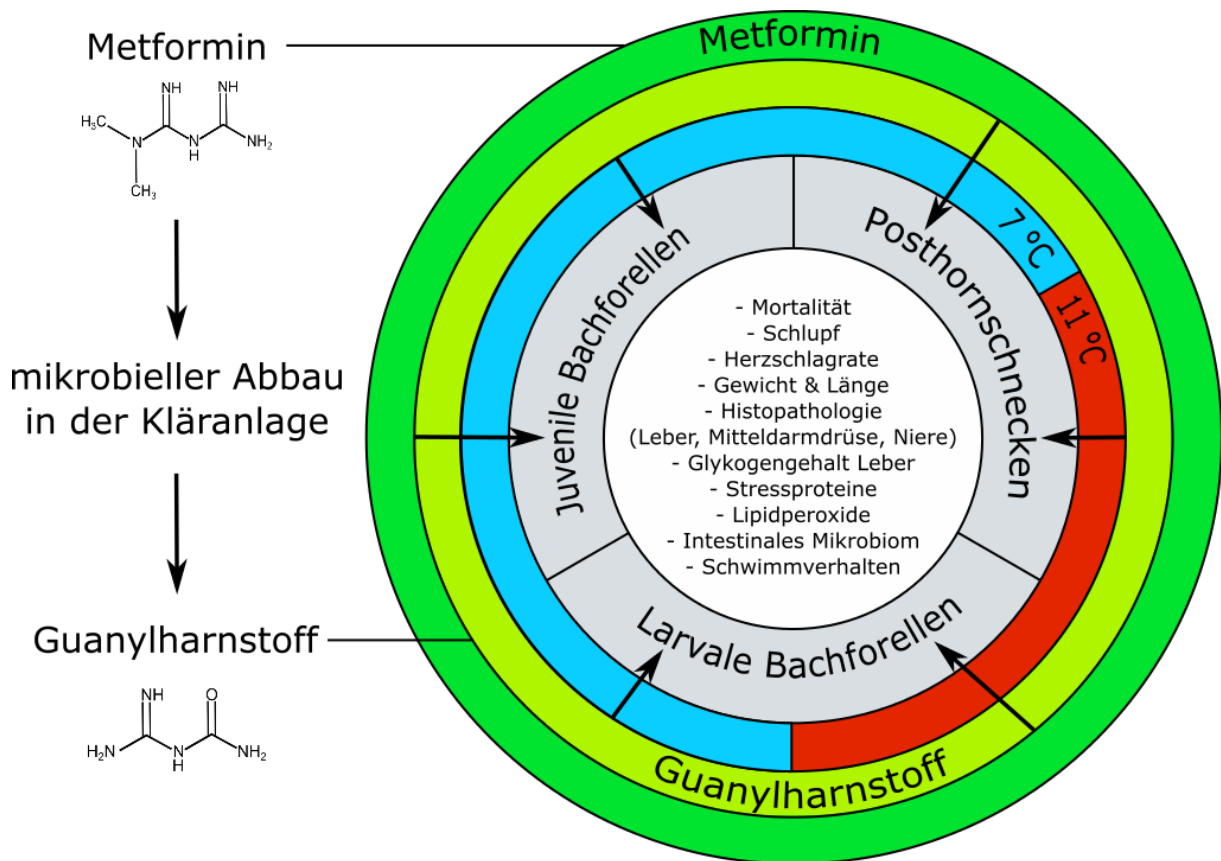
|         |                                                                                                                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| OECD    | Organisation for economic co-operation and development = Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung |
| OGewV   | Oberflächengewässerverordnung                                                                                            |
| P1      | Proximaler Tubulus 1                                                                                                     |
| P2      | Proximaler Tubulus 2                                                                                                     |
| PAS     | Periodic acid-Schiff = Periodsäure und Schiffssches Reagenz                                                              |
| PEC     | Predicted environmental concentration = vorausgesagte Umweltkonzentration eines Stoffes                                  |
| pg      | Pikogramm                                                                                                                |
| PNEC    | Predicted no effect concentration = vorausgesagte Konzentration eines Stoffes, bei der noch kein Effekt auftritt         |
| QqQ-MS  | Triple quadropole mass spectrometer= Dreifaches Quadropol-Massenspektrometer                                             |
| QTOF-MS | Quadropol time of flight mass spectrometer = Quadropol-Flugzeit-Massenspektrometer                                       |
| rcf     | Relative centrifugal force = relative Zentrifugalkraft                                                                   |
| ROS     | Reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies                                                                     |
| rpm     | Rounds per minute = Runden pro Minute                                                                                    |
| rRNA    | Ribosomale Ribonukleinsäure                                                                                              |
| RTL-W1  | Rainbow trout liver -Waterloo 1 = Regenbogenforellen-Leberzellen Waterloo 1                                              |
| s       | Sekunden                                                                                                                 |
| SDS     | Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat                                                                               |
| t       | Tonne                                                                                                                    |
| TBS     | Tris buffered saline = Tris-gepufferte Salzlösung                                                                        |
| V       | Volt                                                                                                                     |
| vgl.    | vergleiche                                                                                                               |
| WFD     | Water framework directive = Wasserrahmenrichtlinie                                                                       |
| WHO     | World health organization = Weltgesundheitsorganisation                                                                  |
| w.w.    | Wet weight = Nassgewicht                                                                                                 |
| z.B.    | Zum Beispiel                                                                                                             |

# Teil 1: Zusammenfassung

## 1. Promotionsthema

Effekte des Antidiabetikums Metformin und seines Transformationsprodukts Guanylharnstoff auf den Gesundheitszustand von Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und Posthornschnellen (*Planorbarius corneus*)

## 2. Graphische Zusammenfassung



### 3. Einleitung

Zum Schutz und zur Verbesserung des Zustands von aquatischen Ökosystemen wurde im Jahr 2000 die Wasserrahmenrichtlinie in Kraft gesetzt. Dabei wurde berücksichtigt, dass verschiedene anthropogene Einflüsse eine Bedrohung für aquatische Organismen in Oberflächengewässern darstellen können. Dazu gehören beispielsweise strukturelle Veränderungen von Flüssen, die zu einer schlechteren Durchgängigkeit führen, durch den Klimawandel bedingte höhere Wassertemperaturen, die Einwanderung von Neobiota sowie der Eintrag von Chemikalien. Laut Wasserrahmenrichtlinie soll für Oberflächengewässer ein guter ökologischer und chemischer Zustand erreicht werden (EU, 2000). Untersucht werden biologische (z.B. die Zusammensetzung und Abundanz von Arten), hydromorphologische (z.B. die Struktur der Uferzone) und physikalisch-chemische Komponenten (z.B. Temperatur) sowie prioritäre und national festgelegte flussgebietsspezifische Schadstoffe. Zur Beurteilung der chemischen Belastung werden gemessene Umweltkonzentrationen von momentan 45 prioritären Chemikalien, die ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt darstellen, mit den EU-weit geltenden Umweltqualitätsnormen für diese Substanzen abgeglichen (EU, 2013). Gleiches gilt für 67 flussgebietsspezifische Schadstoffe, die in Deutschland untersucht werden (OGewV, 2016). Zusätzlich befinden sich auf einer Beobachtungsliste aktuell acht Stoffe bzw. Stoffgruppen, die EU-weit überwacht und analysiert werden sollen, um zu bestimmen, ob sie ebenfalls auf die Liste prioritärer Substanzen aufgenommen werden sollen (EU, 2018). Generell ist im Hinblick auf die Verschmutzung von Gewässern mit Chemikalien eine große Anzahl verschiedenster Substanzen in Konzentrationen von pg/L bis µg/L in Oberflächengewässern zu finden. Beispiele hierfür sind Pestizide, Industriechemikalien, Wasch- und Reinigungsmittel, Körperpflegeprodukte, Biozide, Nahrungsmittelzusatzstoffe und Pharmazeutika sowie deren Metabolite und Transformationsprodukte (Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Scheurer et al., 2009a; Bueno et al., 2012; Aus der Beek et al., 2016). Zum einen stiegen Anzahl und Verbrauch dieser Stoffe in den letzten Jahren und Jahrzehnten stetig, zum anderen erlaubten aber auch verbesserte Messmethoden eine genauere Identifizierung und Quantifizierung dieser Spurenstoffe (Zwiener und Frimmel, 2004; Fischer et al., 2012; Agüera et al., 2013).

Humanpharmazeutika sind dabei eine Gruppe von Stoffen, die einen spezifischen Effekt im Mensch haben sollen, um therapeutisch wirken zu können (Cleuvers, 2003), und deren Wirkmechanismus zumeist stark konserviert ist. Im Körper des zu behandelnden Patienten sollen die Arzneistoffe stabil sein, um ihren Wirkort erreichen und dort den vorgesehenen Effekt hervorrufen zu können. Anschließend werden die Substanzen in Abhängigkeit ihrer Stoffeigenschaften entweder metabolisiert oder unverändert wieder ausgeschieden und gelangen über das Kanalisationssystem in Kläranlagen. Ein weiterer Eintrag in Kläranlagen erfolgt durch eine unsachgemäße Entsorgung von ungenutzten oder abgelaufenen Medikamenten über das Abwasser (Taylor und Senac, 2014). Bereits im Kanalisationssystem können die Arzneimittelwirkstoffe und potentiell entstandene Metabolite abiotisch durch Hydrolyse oder biotisch durch mikrobielle Aktivität transformiert werden. In den Kläranlagen findet ein weiterer Abbau der Stoffe durch diese beiden Prozesse statt; dieser natürlich auftretende Abbau der Substanzen kann aber auch durch technische Prozesse wie Ozonierung optimiert werden (Fatta-Kassinos et al., 2011). Schließlich gelangen die Pharmazeutikareste und ihre Metabolite und Transformationsprodukte mit dem Kläranlagenablauf in Oberflächengewässer. Auch hier kann es zu weiteren Transformationsprozessen beispielsweise durch Photolyse kommen. Aufgrund des kontinuierlichen Eintrags dieser Stoffe in Oberflächengewässer bleiben trotz der Abbauprozesse die Konzentrationen der Pharmazeutika annähernd gleich, sodass von einer „Pseudopersistenz“ dieser Stoffe gesprochen werden kann (Hernando et al., 2006). Über die

Auswirkungen dieser Stoffe auf die in den Oberflächengewässern lebenden Organismen gibt es meist nur wenige Informationen. Zwei bekannte Beispiele für Arzneimittel mit ökotoxikologischen Effekten auf Nichtzielorganismen sind 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, der Hauptwirkstoff hormoneller Verhütungspäparate, sowie der Entzündungshemmer Diclofenac. Ethinylestradiol kann bereits in sehr geringen Konzentrationen die Reproduktion von Fischen und Schnecken beeinflussen (Palace et al., 2002; Jobling et al., 2003; Casey, 2006; Palace et al., 2006; Aris et al., 2014). Diclofenac ist dafür bekannt, die Niere und Leber von Fischen schädigen zu können (Schwaiger et al., 2004; Tribskorn et al., 2004; Tribskorn et al., 2007; Bickley et al., 2017; Näslund et al., 2017; Schwarz et al., 2017). Dabei ist zu beachten, dass bereits umweltrelevante Konzentrationen der beiden Arzneistoffe die beschriebenen Effekte hervorrufen können, sodass ein Risiko für aquatische Organismen besteht (WFD, 2011a; b; Loos et al., 2018).

Von Seiten der Gesetzgebung wird in der Humanarzneimittel-Richtlinie 2001/83/EG im Artikel 8 (3) eine Umweltrisikobewertung für alle Humanarzneimittel verlangt. Diese Bewertung soll in einem gestuften Verfahren durchgeführt werden. In Phase I wird die Umweltexposition durch das Pharmazeutikum abgeschätzt. Liegt die ermittelte Umweltkonzentration (*predicted environmental concentration* = PEC) über dem Trigger-Wert von 10 ng/L, so werden in Phase II das Umweltverhalten und mögliche Effekte des Arzneimittels abgeprüft (EMA, 2006; 2016). Dazu wird in Stufe A ein Grunddatensatz zur aquatischen Toxizität des Pharmazeutikums mit chronischen Algen-, Daphnien- und Fischtests, Atmungshemmtests mit Belebtschlamm sowie Informationen zur Adsorption und Abbaubarkeit gefordert. Sollte ein Umweltrisiko bestehen, weil die ermittelte Umweltkonzentration (PEC) höher ist als die Konzentration, bei der unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors noch kein Effekt auftritt (*predicted no effect concentration* = PNEC), so können in Stufe B die PEC-Berechnung verfeinert und weitere Tests mit Boden- und Sedimentorganismen durchgeführt werden, um das Risiko noch genauer abschätzen zu können. Ein großes Defizit besteht jedoch darin, dass keine Umweltrisikobewertung für diejenigen Medikamente durchgeführt werden muss, die bereits vor 2006 auf dem Markt waren. Somit liegen hier häufig keine oder nur unvollständige Dossiers vor. Ein weiteres Problem sind die oftmals unbekanntes Transformationsprodukte der Humanpharmazeutika. Eine Identifikation der Transformationsprodukte nach OECD-Test 308 wird laut Humanarzneimittel-Richtlinie erst dann verlangt, wenn das Produkt in einer Konzentration von  $\geq 10\%$  der Muttersubstanz vorkommt (OECD, 2002). Dieser OECD-Test soll nach der aktuell durchgeführten Überarbeitung des Leitfadens zur Umweltrisikobewertung von Arzneimitteln jedoch nur noch für solche Stoffe gemacht werden, die im Verdacht stehen persistent, bioakkumulierend und toxisch zu sein (EMA, 2018). Damit würden für viele Arzneimittelwirkstoffe keine Informationen über die Bildung von Transformationsprodukten generiert werden. Eine Bewertung der ökotoxikologischen Effekte der Transformationsprodukte fehlt in der Humanarzneimittel-Richtlinie gänzlich. Dabei können insbesondere Transformationsprodukte, die in einer wesentlich höheren Konzentration im Vergleich zur Muttersubstanz vorkommen oder eine höhere Persistenz oder Toxizität als diese aufweisen, ein Risiko für Nichtzielorganismen darstellen (Escher und Fenner, 2011).

Veränderungen im Lebensstil verbunden mit ungesunden Ernährungsgewohnheiten, geringer physischer Aktivität und einem vermehrten Tabak- und Alkohol-Konsum führen zu einer weltweiten epidemiologischen Ausbreitung von nicht übertragbaren, chronischen Krankheiten, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs, Atemwegserkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 (WHO, 2014). 2017 litten circa 8,8 % der Weltbevölkerung an Diabetes, das entspricht 425 Millionen Menschen. 2045 werden voraussichtlich 629 Millionen Menschen (9,9 % der Weltbevölkerung) an



Diabetes erkrankt sein (IDF, 2017). Circa 90 % davon haben Diabetes Typ 2. Bei dieser Form des Diabetes ist der Körper zwar dazu in der Lage Insulin zu produzieren, welches aber aufgrund einer körpereigenen Insulin-Resistenz nicht nutzbar ist. Somit kann ein erhöhter Blutzuckerspiegel nach Nahrungsaufnahme nicht abgesenkt und zu einem homöostatischen glykämischen Zustand zurückgeführt werden. Das Mittel der ersten Wahl zur Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ 2 ist das Antidiabetikum Metformin (ADA, 2017). Es hat eine antihyperglykämische Wirkung, was bedeutet, dass der erhöhte Blutzuckerspiegel von Typ 2 Diabetes Patienten auf ein normales Niveau abgesenkt wird, indem der Glukose-Output der Leber verringert und die Aufnahme von Glukose in die Skelettmuskelzellen erhöht wird (An und He, 2016). In Deutschland wurden im Jahr 2018 circa 1864 t Metformin verordnet (IMS Health, 2019), was bei einer Tagesdosis von 2 g (WHO, 2018) etwa 932 Millionen verschriebenen Tagesdosen entspricht. Damit ist Metformin das am häufigsten verbrauchte Humanarzneimittel Deutschlands (Ebert et al., 2014). Im Körper des Patienten wird Metformin nicht metabolisiert und somit unverändert im Urin ausgeschieden (Pentikäinen et al., 1979; Graham et al., 2011). Über die Kanalisation gelangt das Arzneimittel dann in Kläranlagen, in deren Zulauf es in Konzentrationen von bis zu 129 µg/L detektiert werden kann (Scheurer et al., 2009b). In Kläranlagen wird das Arzneimittel zu circa 90 % aus dem Abwasser eliminiert und mikrobiell in Guanylarnstoff transformiert (Scheurer et al., 2012; Oosterhuis et al., 2013; Tisler und Zwiener, 2018; 2019). In Oberflächengewässern können Metformin bzw. Guanylarnstoff in Konzentrationen von maximal 3 µg/L bzw. 28 µg/L nachgewiesen werden (Scheurer et al., 2012). Die beiden Stoffe können dann auf die dort lebenden aquatischen Organismen einwirken. Diese Oberflächenwasserkonzentrationen sind im Vergleich zu anderen Arzneimittelwirkstoffen sehr hoch. Über die Wirkung dieser Substanzen auf Nichtzielorganismen ist jedoch nur wenig bekannt.

An diesem Punkt setzt das Projekt Effect-Net an. Dieses Projekt, gefördert durch das Wassernetzwerk und das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, beschäftigt sich mit Substanzen, die zur Behandlung von weit verbreiteten Krankheiten eingesetzt und in hohen Mengen verbraucht werden, sowie deren Metaboliten und Transformationsprodukten. Zu diesen Substanzen gehören Antidiabetika wie Metformin, künstliche Süßstoffe wie Sucralose, zur Verwendung als Zuckerersatzstoff bei Adipositas, sowie Antidepressiva wie Citalopram. Dabei soll einerseits das Vorkommen und die Verteilung dieser Substanzen in der Umwelt analysiert werden, zudem soll aber auch gezeigt werden, welche Effekte in der aquatischen Umwelt durch die Stoffe hervorgerufen werden können. Bei der Effektbewertung werden verschiedene Ebenen abgeprüft: a) auf Molekül- und Zellebene wird der genaue Wirkmechanismus der Stoffe sowie mögliche Bindungen an verschiedene Rezeptoren untersucht; b) auf Organismenebene werden Effekte der Stoffe auf individuelle, einheimische Nichtzielorganismen mit einem klassischen Modellorganismus verglichen; c) auf Populationsebene wird die bakterielle Zusammensetzung im Fischdarm untersucht, zudem werden mögliche Veränderungen im Verhalten der Organismen analysiert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen dann, in einen sozio-politischen Kontext eingebettet, Einfluss auf Regierungs- und Regulierungsprozesse sowie das Konsumentenverhalten nehmen.

Die vorliegende Arbeit ist Teil dieses Projekts und beschäftigt sich mit den Effekten des Antidiabetikums Metformin und seines Transformationsprodukts Guanylarnstoff auf den Gesundheitszustand zweier einheimischer aquatischer Organismen – der Posthornschncke (*Planorbarius corneus*), als Vertreter der Invertebraten, und der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*), als Vertreter der Vertebraten. Für die Bachforelle wurden sowohl larvale als auch juvenile Tiere verwendet, um zu bestimmen, welches Lebensstadium sensitiver auf die beiden Testsubstanzen

reagiert. Getestet wurden dabei sowohl Konzentrationen im umweltrelevanten Bereich bis hin zu 1000-fach höheren Konzentrationen, welche mögliche Effekte der Testsubstanzen abbilden sollten. Außerdem wurde vor dem Hintergrund der globalen Erwärmung getestet, ob Effekte, die von den Testsubstanzen induziert würden, durch Veränderungen in der Temperatur moduliert werden könnten. Dazu wurden die Tiere bei 7 und 11 °C exponiert. Mehrere Parameter wurden untersucht: apikale Endpunkte, wie Mortalität und Wachstum, sowie generelle, biochemische Stressmarker zur Analyse von proteotoxischen oder oxidativen Effekten im Organismus. Des Weiteren wurde der Gewebezustand der wichtigsten am Stoffwechsel und der Biotransformation beteiligten Organe histopathologisch untersucht und die mikrobielle Zusammensetzung in der Darmflora der Bachforellen im Hinblick auf die starke Korrelation zwischen Darmmikrobiom und Gesundheit des Wirts analysiert. Schließlich wurde als weiterer Parameter noch das Schwimmverhalten der Bachforellen getestet, da Verhaltensveränderungen ein gutes Warnsignal für Stressreaktionen auf verschiedenen physiologischen Ebenen sein können und gleichzeitig eine hohe ökologische Relevanz haben (Scott und Sloman, 2004).

#### **4. Übergeordnete Fragestellungen**

Folgende Fragen zur Wirkung von Metformin und Guanylharnstoff sollen in der Arbeit beantwortet werden:

- I. Haben das Antidiabetikum Metformin und sein Transformationsprodukt Guanylharnstoff einen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Bachforellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf? Sind diese relevant für die aquatische Umwelt? Welches Lebensstadium der Bachforellen reagiert sensitiver auf die beiden Stoffe?
- II. Haben das Antidiabetikum Metformin und sein Transformationsprodukt Guanylharnstoff einen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Posthornschnellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf? Sind diese relevant für die aquatische Umwelt?
- III. Welcher der beiden Testorganismen reagiert sensitiver auf die beiden Stoffe?
- IV. Können Unterschiede in der Temperatur (7 °C bzw. 11 °C) auftretende Effekte in den Testorganismen modifizieren?

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Testsubstanzen

#### 5.1.1. Metformin

Metformin (1,1-Dimethylbiguanid) wird zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Seine Wirkungsweise beruht hauptsächlich auf einer Inhibierung der Glukoneogenese (Glukose-Neubildung) in der Leber (An und He, 2016). Weitere Effekte von Metformin sind die Erhöhung der Aufnahme von Glukose in die Skelettmuskulatur und eine Verringerung der Gesamtrate der Glykogenolyse (Glykogen-Abbau) (Giannarelli et al., 2003). Der genaue molekulare Wirkmechanismus zur Reduktion des Glukose-Outputs der Leber durch Metformin ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. In der Literatur werden verschiedene molekulare Wirkweisen diskutiert (Pernicova und Korbonits, 2014; Rena et al., 2017). Vermutlich ist es ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Wirkpfade, die kombiniert zur therapeutischen Wirkung des Antidiabetikums führen.

Eine mögliche Erklärung des Wirkmechanismus ist die von Metformin verursachte Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Protein-Kinase (AMPK) durch eine erleichterte Bildung des heterotrimeren AMPK-Komplexes (Zhou et al., 2001). Dadurch kommt es zu einer Hemmung der Genexpression von Enzymen, die für die Glukoneogenese verantwortlich sind, und somit zu einer Reduktion des Glukose-Outputs (He et al., 2009). Jedoch wurde in einer Studie gezeigt, dass Metformin auch bei transgenen Mäusen mit fehlender AMPK zu einer Reduktion der Glukose-Produktion führen konnte (Foretz et al., 2010). Dies macht deutlich, dass die AMPK-Aktivierung nicht die alleinige Wirkweise von Metformin sein kann. Des Weiteren wird diskutiert, ob Metformin AMPK durch die Inhibierung des Komplex 1 der Atmungskette in Mitochondrien und der daraus resultierenden Verringerung der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion und gleichzeitigen Erhöhung des AMP-Levels beeinflussen könnte (El-Mir et al., 2000; Foretz et al., 2010; Hawley et al., 2010; Foretz et al., 2014), da AMPK aufgrund seiner Funktion als Energiesensor auch bei geringen ATP-Konzentrationen aktiviert wird. Unabhängig von der Wirkweise über AMPK würde ein geringer ATP-Level auch direkt die Glukoneogenese beeinträchtigen, da dies ein sehr energieintensiver Prozess ist (6 ATP pro neugebildetem Glukose-Molekül). Gleichzeitig würde ein hoher AMP-Gehalt die Aktivität der *Adenylate Cyclase* verringern, sodass weniger cyclisches AMP gebildet wird, was zu einer Inhibierung der Glukoneogenese führt (Miller et al., 2013). Ein großer Kritikpunkt an der postulierten Wirkweise des Antidiabetikums über die Inhibierung des Komplex 1 der Atmungskette ist aber, dass dieser Mechanismus nur bei sehr hohen Konzentrationen von Metformin funktioniert, die bei der klinischen Anwendung im Blut von Patienten unmöglich erreicht werden können (An und He, 2016). Aufgrund dessen gehen einige Studien davon aus, dass die Wirkungen dieser hohen Metforminkonzentrationen eher ein *off-target* Phänomen (unerwünschte Nebenwirkung, die nicht dem therapeutischen Effekt im Patienten entspricht) darstellen und keine pharmazeutische Relevanz haben (He und Wondisford, 2015; An und He, 2016).

Weitere Effekte des Antidiabetikums sind zum einen die Stimulation der Insulin-induzierten Glykogen-Synthese in der Leber und im Muskel (Purrello et al., 1988; Mithieux et al., 2002; Giannarelli et al., 2003; Al-Khalili et al., 2005). Zum anderen erhöht das Antidiabetikum die Aufnahme von Glukose in Skelettmuskulatur durch eine Zunahme in der Aktivität des Insulin-Rezeptors und eine Translokation der Glukose-Transporter GLUT-1 und GLUT-4 in die Zellmembran (Gunton 2003, Rice 2011). Fullerton et al. (2013) und Ford et al. (2015) postulierten, dass eine Verbesserung der Insulinsensitivität der Leber durch eine von Metformin verursachte Veränderung des Lipidmetabolismus hervorgerufen würde, indem das Antidiabetikum durch die AMPK-Aktivierung

Acetyl-Coenzym A Carboxylase phosphoryliert und Acetyl-Coenzym A inhibiert, wodurch in der Folge die Synthese von Fettsäuren (Lipogenese) reduziert und die Oxidation der Fettsäuren erhöht wird.

Neben der Leber zählt auch der Darm zu den wichtigsten Organen für die antihyperglykämische Wirkung von Metformin (Bailey et al., 1994; Bailey et al., 2008). Im Darm erhöht Metformin die Sekretion des *Glukagon-like Peptid 1* (GLP-1), das für die Sekretion von Insulin und die Inhibierung der Glukagon-Produktion zuständig ist (Holst, 1994). Des Weiteren wird die Reduktion des Glukose-Outputs der Leber zum Teil auch durch die Wirkung von Metformin auf die Darm-Gehirn-Leber-Achse erklärt, ausgelöst durch eine Metformin-induzierte Aktivierung von AMPK im Darm (Duca et al., 2015). Schließlich zeigten mehrere Studien, dass Metformin das Darmmikrobiom im Menschen und in Mäusen verändern kann (Lee und Ko, 2014; Shin et al., 2014; Forslund et al., 2015; De La Cuesta-Zuluaga et al., 2017; Wu et al., 2017). Es ist bis jetzt jedoch noch unklar, in welchem Zusammenhang diese Mikrobiomveränderungen mit der blutzuckersenkenden Wirkung von Metformin stehen (Rena et al., 2017).

Neben seiner Verwendung als Antidiabetikum wird Metformin auch zur Behandlung vieler weiterer Krankheiten wie dem Polyzystischen Ovar Syndrom (Lord et al., 2003), Übergewicht (Seifarth et al., 2013) und in der Krebs-Therapie (Martin-Castillo et al., 2010; Sahra et al., 2010; Bost et al., 2012; Kasznicki et al., 2014) eingesetzt.

Haupteliminationsweg von Metformin in der Umwelt ist der aerobe Bioabbau zu Guanylharnstoff (Trautwein und Kümmerer, 2011). Mehrere Studien zeigen, dass Metformin in Kläranlagen zumeist zu über 90 % eliminiert und dabei zu 17–95 % in Guanylharnstoff transformiert wird (Scheurer et al., 2009b; Scheurer et al., 2012; Oosterhuis et al., 2013; Trautwein et al., 2014; Kosma et al., 2015; Tisler und Zwiener, 2018). Die unterschiedlichen Anteile in der Bildung des Transformationsprodukts werden darauf zurückgeführt, dass es noch weitere Eliminationsprozesse für Metformin geben könnte, oder dass Guanylharnstoff selbst weiter abgebaut werden kann (Tisler und Zwiener, 2018). Es ist auch möglich, dass Metformin, zumindest teilweise, durch Sorption an Böden, Klärschlamm oder Sediment nicht mehr bioverfügbar wird. Allerdings hängt die Sorption dabei stark von den Eigenschaften des Sorbens ab (z.B. Anteil des organischen Materials, Tonanteil, Ionenaustauschkapazität oder pH). Abiotische Eliminationswege, wie Hydrolyse oder Photolyse, können für Metformin ausgeschlossen werden (Neamțu et al., 2014; Straub et al., 2019). Auch eine Verflüchtigung von Metformin aus der Wasserphase ist aufgrund einer berechneten Henry-Konstante von  $3,46 \times 10^{-9} \text{ atm/m}^3/\text{mol}$  (<https://comptox.epa.gov/dashboard>) unwahrscheinlich.

Metformin ist eine sehr polare Substanz mit einem mittleren berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von -1,37 (<https://comptox.epa.gov/dashboard>). Folglich ist Metformin sehr hydrophil und eine Bioakkumulation im Fettgewebe von Organismen eher unwahrscheinlich. In natürlichen Gewässern mit einem neutralen bis leicht alkalischen pH-Wert liegt Metformin als zweifach geladenes Kation vor. Bei einem pH-Wert zwischen 10–12 dominiert die einfach positiv geladene Form, nur bei pH-Werten > 12 ist Metformin in neutraler Form vorhanden und somit eine starke Base (Scheurer et al., 2009b).

In den Versuchen wurde Metformin Hydrochlorid von Sigma-Aldrich mit einem Molekulargewicht von 165,62 g/mol verwendet (Steinheim, Deutschland; CAS: 1115-70-4, Reinheitsgrad: 99,9 %, Chargennummer: BCBP0558V). Die getesteten Konzentrationen bezogen sich dabei immer nur auf die Metformin-Base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5$ ), ohne das Hydrochlorid.

### 5.1.2. Guanylharnstoff

Guanylharnstoff (1-(Diaminomethylen)harnstoff) wird hauptsächlich durch mikrobielle Transformation von Metformin in Kläranlagen gebildet. In einigen Studien wurden aber bereits im Zulauf der Kläranlagen erhöhte Guanylharnstoff-Konzentrationen gemessen (Tisler und Zwiener, 2018). Dies könnte auf einen im Kanalisationssystem erfolgten Bioabbau von Metformin oder anderen Biguaniden, wie z.B. Desinfektionsmitteln, zurückgeführt werden (Trautwein et al., 2014; Tisler und Zwiener, 2018).

Trautwein und Kümmerer (2011) nahmen zunächst an, dass Guanylharnstoff sich in der Umwelt nicht weiter abbaut. Tisler und Zwiener (2018; 2019) zeigten aber, dass Guanylharnstoff durchaus bioabbaubar ist, wobei der Abbau unter anaeroben Bedingungen schneller vorstättenging als unter aeroben. Eine Adsorption von Guanylharnstoff an Klärschlamm konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei dies – wie bei der Muttersubstanz – stark von den Eigenschaften des Klärschlammes abhing (Tisler und Zwiener, 2019). Scheurer et al. (2012) stellten fest, dass Guanylharnstoff zu 18–45% an Böden sorbieren kann. Ein photolytischer Abbau von Guanylharnstoff kann ausgeschlossen werden (Trautwein und Kümmerer, 2011). Auch eine hohe Flüchtigkeit ist durch die geringe berechnete Henry-Konstante von  $3,49 \times 10^{-9}$  atm/m<sup>3</sup>/mol (<https://comptox.epa.gov/dashboard>) nicht gegeben.

Guanylharnstoff ist, wie auch seine Muttersubstanz, sehr polar und hat einen mittleren berechneten Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von -1,28 (<https://comptox.epa.gov/dashboard>). Auch für Guanylharnstoff ist anzunehmen, dass es aufgrund seiner Hydrophilie nicht dazu neigt, sich im Fettgewebe von Organismen anzureichern. In der Umwelt liegt das Transformationsprodukt zumeist als geladenes Kation vor, erst ab einem pH Wert > 13,5 dominiert die neutrale Form (Scheurer et al., 2012). Damit ist Guanylharnstoff, wie die Muttersubstanz Metformin, eine Base.

In den Versuchen wurde Guanylharnstoff Sulfat von Tokyo Chemicals Industry (Tokyo, Japan; CAS: 591-01-5; Reinheitsgrad: 98 %, Chargennummer: WIA7F & AKJLG) mit einem Molekulargewicht von 302,27 g/mol verwendet. Die getesteten Konzentrationen bezogen sich dabei immer auf die pure Substanz (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O), ohne Sulfat.

## 5.2. Testorganismen

### 5.2.1. Posthornschncke (*Planorbarius corneus*)

Als ein Vertreter der Invertebraten wurde die Posthornschncke (*Planorbarius corneus*) aus der Familie der Planorbidae (Tellerschncken) untersucht, die wiederum zu den Pulmonaten (Lungenschncken) gehören. *Planorbarius corneus* ist eine weitverbreitete Gastropodenart mit einer wichtigen Funktion in Süßwasserökosystemen, da sie als Nahrung für Fische und Vögel dient (Costil und Bailey, 1998). Die Posthornschncke bevorzugt stehende oder langsam fließende Gewässer mit einem hohen Pflanzenbewuchs und ist von Europa bis Sibirien verbreitet (Glöer, 2002). Posthornschncken ernähren sich hauptsächlich von Detritus (Engelhardt und Martin, 2008). Sie haben ein braunes, planspirales Gehäuse mit circa fünf runden Umgängen, die durch eine tiefe Naht getrennt sind (Glöer, 2002). Das Gehäuse ist etwa 9–12 mm hoch und 20–34 mm breit (Glöer, 2002). Auffällig ist die den Planorbiden eigene Rotfärbung des Blutes, da Hämoglobin anstatt Hämozyanin als Sauerstofftransporter genutzt wird (Alyakrinskaya, 2002). Posthornschncken sind zwittrig, sie befruchten sich simultan gegenseitig (Soldatnko und Petrov, 2013) und reproduzieren ein- bis

zweimal jährlich von Frühling bis Herbst in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (Costil und Daguzan, 1995).

Die für die Experimente verwendeten Testorganismen stammten aus der Nachzucht von Posthornschnellen an der Universität Tübingen, die im Kölle Zoo Stuttgart (Schwieberdingerstraße 230, 70435 Stuttgart, Deutschland) sowie beim Versandhandel Bachflohkrebse (Rotenwaldstraße 70A, 70197 Stuttgart, Deutschland) gekauft wurden. Vor der Exposition wurden die Tiere für zwei Tage bei 11 °C in der Klimakammer gehalten, damit sie sich an die Testtemperatur anpassen konnten.

### 5.2.2. Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*)

Als Vertreter der Vertebraten wurde die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) untersucht. In Süßwasserökosystemen hat die Bachforelle eine wichtige Funktion als Raubfisch, aber auch ökonomisch betrachtet ist sie als beliebter Speisefisch von Relevanz. Die Bachforelle gehört neben der anadromen Meerforelle (*Salmo trutta f. trutta*) und der lakustrinen Seeforelle (*Salmo trutta f. lacustris*) zu den drei Ökotypen der zu den Salmoniden gehörigen *Salmo trutta*, welche ursprünglich in Europa, Westasien und Nordamerika heimisch ist (MacCrimmon et al., 1970). Die Bachforelle ist in kleinen bis mittleren Flüssen zu finden, die kühl und sauerstoffreich sind (Dußling und Berg, 2001). Sie wird zumeist zwischen 20–30 cm lang, kann in manchen Fällen aber auch bis zu 60 cm Körperlänge erreichen (Vilcinskas, 2004). Der stromlinienförmige Körper der Bachforelle weist ventral eine weißliche Färbung, dorsal und an den Flanken eine braun-grüne Färbung auf. Auf den Flanken sind zudem dunkle und rote, hell umrandete Punkte zu sehen. Der Kopf ist zumeist klein mit einem großen Maul. Die Fettflosse, die alle Salmoniden aufweisen, hat einen roten Rand. (fishbase.org; Vilcinskas, 2004)

Im Herbst und Winter reproduziert die Bachforelle. Der Laich wird dabei vom Weibchen in kleine Kiesgruben abgelegt und vom Männchen befruchtet (Klemetsen et al., 2003). Killeen et al. (1999) beschreiben sehr detailliert die Entwicklung der Bachforelle vom befruchteten Ei über die Augenentwicklung des Embryos im Ei (Augenpunktstadium) bis hin zum Schlupf der Larve, die sich zunächst von ihrem Dottersack ernährt, bis dieser aufgezehrt ist, und dann zur exogenen Futteraufnahme übergeht. Dieser Prozess dauert mehrere Monate und hängt stark von der Umgebungstemperatur ab. Die karnivore Bachforelle frisst Insektenlarven oder mit zunehmendem Alter auch andere Fische (Klemetsen et al., 2003).

Für die Experimente wurden Bachforellen aus der Forellenzucht Lohmühle in Alpirsbach (Am Lohmühlebach 85, 72275 Alpirsbach-Ehlenbogen, Deutschland) verwendet. Diese Forellenzucht ist als Kategorie I (frei von Krankheiten) nach der EC Council Directive 2006/88/EC gelistet (EU, 2006). In die Experimente wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium (Alter: 48 Tage nach Befruchtung für das Metformin-Experiment, 46 Tage nach Befruchtung für das Guanylharnstoff-Experiment) bzw. juvenile Bachforellen (Alter: circa 9 Monate nach Schlupf) eingesetzt. Die Experimente waren durch die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen autorisiert (ZO 1/15 und ZO 2/16).

### 5.3. Durchgeführte Versuche

Es wurden vier Experimente mit Bachforellen und zwei mit Posthornschnucken durchgeführt:

Versuch 1: Start: 05.01.16 – Ende: 08.04.16 (11 °C) bzw. 21.04.16 (7 °C): Bachforellenlarven wurden vom Augenpunktstadium bis drei und acht Wochen nach Dottersackaufzehrung gegenüber Metformin exponiert (Exposition bis drei Wochen nach Dottersackaufzehrung nicht Teil der vorliegenden Arbeit)

Versuch 2: Start: 03.08.16 – Ende: 25.08.16: Juvenile Bachforellen wurden gegenüber Metformin und Sucralose exponiert (Sucralose-Exposition nicht Teil der vorliegenden Arbeit)

Versuch 3: Start: 11.11.16 – Ende: 16.12.16: Posthornschnucken wurden bei 7 und 11 °C gegenüber Metformin exponiert

Versuch 4: Start: 02.06.17 – Ende: 23.06.17: Posthornschnucken wurden bei 7 und 11 °C gegenüber Guanylharnstoff exponiert

Versuch 5: Start: 08.08.17 – Ende: 05.09.17: Juvenile Bachforellen wurden gegenüber Guanylharnstoff und Sucralose exponiert (Sucralose-Exposition nicht Teil der vorliegenden Arbeit)

Versuch 6: Start: 29.12.17 – Ende: 26.03.18 (11 °C) bzw. 17.04.18 (7 °C): Bachforellenlarven wurden vom Augenpunktstadium bis acht Wochen nach Dottersackaufzehrung gegenüber Guanylharnstoff exponiert

Versuch 2 mit den gegenüber Metformin exponierten juvenilen Bachforellen sowie die Expositionen der Posthornschnucken gegenüber einer Temperatur von 7 °C (Versuche 3 und 4) und die Exposition der Bachforellenlarven gegenüber Guanylharnstoff bei einer Temperatur von 11 °C (Versuch 6) sind kein direkter Bestandteil der vorliegenden Arbeit und werden im Material- und Methoden-Teil sowie im Ergebnis-Teil nicht genauer beschrieben (tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Abschnitt 7.3., Rohdaten siehe Anhang II). Sie werden aber in der Synthese zur Interpretation der Ergebnisse der anderen Experimente miteinbezogen.

#### 5.3.1. Exposition von Bachforellenlarven

Bachforelleneier im Augenpunktstadium (Metformin: 48 Tage nach Befruchtung, Guanylharnstoff 46 Tage nach Befruchtung) wurden gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Metformin (0; 1; 10; 100; 1000 µg/L) und Guanylharnstoff (0; 10; 100; 1000 µg/L) in Triplikaten in einem randomisierten Blockdesign exponiert. Der Metformin-Versuch (Experiment 1) wurde in thermokonstanten Klimakammern bei 7 und 11 °C durchgeführt, der Guanylharnstoff-Versuch (Experiment 6) in einer Kammer bei 7 °C. Die Testorgansimen wurden in belüfteten Glasaquarien exponiert, die mit jeweils 10 L Testmedium gefüllt waren (semi-statisches System) und jeweils 28 (Metformin) bzw. 30 (Guanylharnstoff) Individuen enthielten. Im Guanylharnstoff-Experiment wurde das Volumen des Testmediums nach 91 Tagen auf 15 L erhöht. Somit wurden insgesamt 840 (Metformin) bzw. 360 (Guanylharnstoff) Testorganismen exponiert. Die Beleuchtung hatte dabei einen Hell-Dunkel-Zyklus von 10 h/14 h Die Aquarien waren zusätzlich mit schwarzer Plastikfolie vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Nach einer Exposition von 57 Tagen (11 °C) bzw. 73 Tagen (7 °C), zum Zeitpunkt drei

Wochen nach Dottersackaufzehrung, wurden im Metformin-Experiment die Hälfte der Fische beprobt. Bei einer zweiten Probenahme nach einer Expositionszeit von 95 Tagen (11 °C) bzw. 108 Tagen (7 °C), zum Zeitpunkt acht Wochen nach Dottersackaufzehrung, wurde die andere Hälfte der Fische beprobt. Das Guanylharnstoff-Experiment hatte eine Dauer von 110 Tagen. Bei diesem Experiment gab es nur eine Probenahme, die zum Zeitpunkt acht Wochen nach Dottersackaufzehrung stattfand. Zwei Mal pro Woche wurde die Hälfte des Testmediums durch neu hergestelltes Medium ersetzt. Das dafür verwendete Wasser war gefiltertes, vortemperiertes und belüftetes Leitungswasser (Eisenfilter, Aktivkohlefilter, Partikelfilter). Während des Experimentes wurden täglich Schlupf und Mortalität notiert. Als die Fische in der Phase der Flossenbildung und Dottersackresorption (Schritt 38/39 nach Killeen et al. (1999)) waren, wurde die Herzschlagrate gezählt. Dazu wurden jeweils 15 Fische (3 pro Replikat) aus der Kontrolle und der höchsten getesteten Konzentration in Petrischalen mit dem entsprechenden Medium transferiert. Dann wurde für 20 s der Herzschlag jedes Individuums gezählt. Während der letzten acht Wochen der Exposition, nachdem der Dottersack aufgezehrt war, wurden die Larven täglich mit einem kommerziellen Forellenfutter gefüttert (3 mm, INICIO plus von Biomar, Dänemark). In Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus der Forellen wurde die Futtermenge konstant angepasst. Überschüssiges Futter und Faeces wurden während des Wasserwechsels entfernt. In beiden Experimenten wurden Temperatur, pH, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit zu Beginn und am Ende der Exposition in allen Aquarien gemessen. Zudem wurden diese Wasserparameter noch nach 21 Tagen (11 °C) bzw. 37 Tagen (7 °C) im Metformin-Experiment in den Kontrollbecken und den Aquarien mit der höchsten Testkonzentration aufgenommen. Im Experiment mit Guanylharnstoff wurden die Wasserparameter zusätzlich noch nach 55 Tagen in allen Expositionsgruppen gemessen. Zum Ende der Experimente wurden die Fische mit einer Überdosis MS 222 (1 g/L Tricain gepuffert durch NaHCO<sub>3</sub>) betäubt und getötet, was durch einen Genickschnitt zusätzlich abgesichert wurde. Dann wurden Länge und Gewicht der Fische sowie mögliche Verletzungen oder sonstige Auffälligkeiten protokolliert.

Aufgrund der geringen Größe der Bachforellenlarven wurden die Tiere zur Generierung der Proben in Gruppen eingeteilt (Tabelle 1). Im Metformin-Experiment wurden in jeder Gruppe jeweils sieben Tiere pro Aquarium beprobt (21 pro Expositionsgruppe). In der ersten Gruppe wurden Leberproben zur histopathologischen Auswertung in Glutardialdehyd fixiert. Für die chemische Gewebeanalytik wurden Proben vom Kopf (ohne Kiemen) bis zur Schwanzflosse inklusive Muskel und Niere genommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert. In der zweiten Gruppe wurden Leberproben zur Bestimmung des Glykogengehalts in flüssigem Stickstoff eingefroren. Des Weiteren wurden Darmproben für die Untersuchung des intestinalen Mikrobioms und die Köpfe zur Analyse der Stressproteine entnommen. Auch diese Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Im Guanylharnstoff-Experiment wurden in jeder Gruppe jeweils zehn Tiere pro Aquarium beprobt (30 pro Expositionsgruppe). In der ersten Gruppe wurden Leberproben zur histologischen Untersuchung in Glutardialdehyd fixiert und Darmproben in flüssigen Stickstoff eingefroren. In der zweiten Gruppe wurden die Köpfe der Fische zur Analyse des Lipidperoxid-Levels verwendet und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zudem wurden in der dritten Gruppe Gewebeproben der Tiere entnommen. Hierfür wurde der mittlere Teil des Fisches (zwischen Kopf und Rückenflosse), bestehend aus Muskeln, Leber und Darm, verwendet. Auch diese Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



**Tabelle 1: Übersicht zu den beprobten Organen der larvalen Bachforellen und den entsprechenden Analysen für das Metformin-Experiment (Versuch 1) und das Guanylarnstoff-Experiment (Versuch 6)**

| Larvale Bachforellen<br>exponiert gegenüber Metformin                                                                                                                                                                          | Larvale Bachforellen<br>exponiert gegenüber Guanylarnstoff                                                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.Gruppe: 21 Tiere pro Expositionsgruppe <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leber → Histologie</li> <li>• Gewebe: Kopf (ohne Kiemen) bis zur Schwanzflosse inklusive Muskel und Niere → Gewebeanalytik</li> </ul>        | 1.Gruppe: 30 Tiere pro Expositionsgruppe <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leber → Histologie</li> <li>• Darm → Analyse des intestinalen Mikrobioms (noch in Arbeit)</li> </ul>                                   |
| 2.Gruppe: 21 Tiere pro Expositionsgruppe <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leber → biochemische Glykogenanalyse</li> <li>• Darm → Analyse des intestinalen Mikrobioms</li> <li>• Kopf → Stressproteinanalyse</li> </ul> | 2.Gruppe: 30 Tiere pro Expositionsgruppe <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kopf → Lipidperoxidanalyse</li> <li>• Gewebe: Filet, bestehend aus Muskel → Gewebeanalytik (nicht ausgewertet)</li> </ul>              |
|                                                                                                                                                                                                                                | 3.Gruppe: 30 Tiere pro Expositionsgruppe <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebe: mittlerer Teil des Fisches (zwischen Kopf und Rückenflosse), bestehend aus Muskeln, Leber und Darm → Gewebeanalytik</li> </ul> |

### 5.3.2. Exposition von juvenilen Bachforellen

Juvenile Bachforellen (Alter: circa neun Monate nach Schlupf) wurden gegenüber vier Guanylarnstoff-Konzentrationen (0; 10; 100; 1000 µg/L) in Triplikaten in einem randomisierten Blockdesign exponiert (Experiment 5). Die Exposition erfolgte bei 7 °C in einer thermokonstanten Klimakammer in einem semi-statischen System in Glasaquarien. Jedes Aquarium enthielt 15 L Testlösung und zehn Testorganismen. So wurden insgesamt 120 juvenile Bachforellen exponiert. Die Bedingungen für den Wasserwechsel und die Beleuchtung waren identisch mit denjenigen in den Versuchen mit den Fischlarven. Täglich wurden die Tiere mit einer bestimmten Menge an kommerziellem Forellenfutter (8 mm, INICIO plus von Biomar, Dänemark) gefüttert. Zu Beginn und am Ende des Experimentes wurden die Wasserparameter (z.B. Sauerstoffgehalt und pH-Wert) bestimmt. Das Experiment hatte dabei eine Dauer von 29 Tagen. Wie oben beschrieben wurden sieben Tiere pro Aquarium (21 pro Expositionsgruppe) betäubt und getötet. Länge, Gewicht und Verletzungen oder sonstige Auffälligkeiten wurden protokolliert. Leber und Niere der Forellen wurden für histopathologische Untersuchungen in Glutardialdehyd fixiert, zur Stressproteinanalyse wurde der Kopf der Tiere verwendet (Tabelle 2). Dazu wurden die Proben zunächst in flüssigem Stickstoff gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Mit den restlichen drei Fischen pro Aquarium (neun pro Expositionsgruppe) wurde eine Analyse des Schwimmverhaltens durchgeführt und anschließend der ganze Fisch für die Gewebeanalytik in flüssigem Stickstoff eingefroren (Tabelle 2). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

**Tabelle 2: Übersicht zu den beprobten Organen der juvenilen Bachforellen und den entsprechenden Analysen für das Guanylharnstoff-Experiment (Versuch 5)**

| Juvenile Bachforellen exponiert gegenüber Guanylharnstoff                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. Gruppe: 21 Tiere pro Expositionsgruppe</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leber → Histologie</li> <li>• Niere → Histologie</li> <li>• Kopf → Stressproteinanalyse</li> <li>• Darm → Analyse des intestinalen Mikrobioms (noch in Arbeit)</li> </ul> |
| <p>2. Gruppe: 9 Tiere pro Expositionsgruppe<br/>(nach Versuch zum Schwimmverhalten)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebe: ganzer Fisch → Gewebeanalytik (noch in Arbeit)</li> </ul>                                                                  |

### 5.3.3. Exposition von Posthornschnegen

Die Posthornschnegen wurden gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Metformin (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L (Experiment 3)) und Guanylharnstoff (0; 0,1; 10; 100 mg/L (Experiment 4)) in Triplikaten in einem randomisierten Blockdesign exponiert. Die Experimente wurden in thermokonstanten Klimakammern bei 11 °C durchgeführt. Die Exposition erfolgte in einem semi-statischen System in Glasaquarien. Diese waren mit jeweils 10 L Testlösung gefüllt und enthielten jeweils sieben Schnegen. Einmal pro Woche wurde 50 % der Testlösung durch neu hergestelltes Medium (wie oben beschrieben) ersetzt. Die Schnegen wurden jeden zweiten Tag mit kommerziellen Algentabletten (NovoPleco, JBL, Neuhofen, Deutschland) gefüttert. Die Beleuchtungsbedingungen waren die gleichen wie in den Experimenten mit Bachforellen. Nach 21 Tagen (Guanylharnstoff) bzw. 35 Tagen (Metformin) wurden die Schnegen beprobt. Dazu wurde die Schale der Tiere entfernt und es folgte eine Dekapitation. Von fünf Schnegen pro Aquarium (15 pro Expositionsgruppe) wurden Proben des Hepatopankreas für die histopathologische Untersuchung (vorderer Teil des Organs) in Glutardialdehyd fixiert sowie für die Analyse der Stressproteine (hinterer Teil des Organs) in flüssigem Stickstoff eingefroren (Tabelle 3). Die Sohle und der Darm wurden für die Analyse der Lipidperoxide bzw. des Mikrobioms verwendet (Tabelle 3). Diese Proben wurden ebenfalls in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Die restlichen sechs Schnegen pro Treatment wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur chemischen Analyse der Gewebe bei –20 °C gelagert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Übersicht zu den beprobten Organen der Posthornschnegen und den entsprechenden Analysen für das Metformin-Experiment (Versuch 3) und das Guanylharnstoff-Experiment (Versuch 4)**

| Posthornschnegen exponiert gegenüber Metformin / Guanylharnstoff                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. Gruppe: 15 Tiere pro Expositionsgruppe</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatopankreas (vorderer Teil) → Histologie</li> <li>• Hepatopankreas (hinterer Teil) → Stressproteinanalyse</li> <li>• Sohle → Lipidperoxidanalyse</li> <li>• Darm → Analyse des intestinalen Mikrobioms (noch in Arbeit)</li> </ul> |
| <p>2. Gruppe: 6 Tiere pro Expositionsgruppe</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewebe: ganze Schnecke → Gewebeanalytik (noch in Arbeit)</li> </ul>                                                                                                                                                                    |

## 5.4. Chemische Analysen

### 5.4.1. Bestimmung der Realkonzentrationen im Wasser

Zur Bestimmung der Realkonzentrationen von Metformin und Guanylharnstoff im Testmedium wurden Wasserproben zu Beginn und am Ende der Experimente genommen sowie an verschiedenen Zeitpunkten während der Exposition, vor und nach Wasserwechseln. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Die Quantifizierung der Konzentrationen der beiden Testsubstanzen im Testmedium wurde von einem Projektpartner im Effect-Net-Projekt (Selina Tisler, AG Zwiener, Universität Tübingen) durchgeführt. Die Analyten in den Wasserproben wurden mithilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (1260 Infinity HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) aufgetrennt. Durch eine Elektrospray-Ionisation im Positiv-Modus wurden die Analyten ionisiert. Anschließend wurden diese entweder mit einem Triple-Quadropol-Massenspektrometer (QqQ-MS 6490, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) im Multiple Reaction Monitoring-Modus oder mit einem Quadropol-time of flight-Massenspektrometer (6550 iFunnel QTOF-MS, Agilent Technologies) analysiert. Die Daten wurden mit der Software MassHunter (Agilent Technologies) verarbeitet. Die Bestimmungsgrenze lag für Metformin bei 1 ng/L und für Guanylharnstoff bei 10 ng/L. Für Metformin wurde zur Bestimmung zusätzlich noch ein deuterierter Metformin-D6 Standard (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Kanada) verwendet.

### 5.4.2. Nachweis von Metformin und Guanylharnstoff in Gewebeproben

Um die Konzentrationen von Metformin im Gewebe der Bachforellenlarven zu untersuchen, wurden am Ende des Experimentes Gewebeproben vom Kopf (ohne Kiemen) bis zur Schwanzflosse inklusive Niere und Muskel, jedoch ohne Leber und Darm genommen. Im Guanylharnstoff-Experiment wurde das Gewebe der Bachforellenlarven zwischen Genick und Rückenflosse inklusive Leber, Darm und Niere verwendet. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt. Die Quantifizierung der Konzentrationen der beiden Testsubstanzen im Gewebe der Bachforellen wurde von einem Projektpartner im Effect-Net-Projekt (Sarah Knoll, AG Huhn, Universität Tübingen) durchgeführt.

Zunächst wurden die Gewebeproben aus dem Metformin-Experiment auf flüssigem Stickstoff homogenisiert und der Analyt durch Zugabe von Methanol unter Ultraschall extrahiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und gefiltert. Die Auftrennung der Analyten erfolgte mithilfe einer Kapillarelektrophorese (Agilent CE 7100, Agilent Technologies). Anschließend wurden die Analyten mittels positiver Elektrospray-Ionisation ionisiert und mit einem Quadropol-time of flight-Massenspektrometer analysiert (6550 iFunnel QTOF-MS, Agilent Technologies). Für die Datenanalyse wurde die Software MassHunter (Agilent Technologies) verwendet. Zur Bestimmung der Metforminkonzentrationen im Gewebe wurde ein deuterierter Metformin-D6 Standard verwendet, die Nachweisgrenze lag bei 0,6 µg/L.

Die Gewebeproben aus dem Guanylharnstoff-Experiment wurden zunächst auf flüssigem Stickstoff homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand in die Festphasenextraktion gegeben. Dann wurde der Analyt Guanylharnstoff durch Zugabe einer Methanol-Acetonitril-Mischung mit Ameisensäure eluiert. Mithilfe eines kontinuierlichen Stickstoff-Stroms wurde das Eluat eingengt und der aufkonzentrierte Rückstand in Methanol gelöst. Nach einem Filtrationsschritt wurden die Proben wie oben beschrieben mittels Kapillarelektrophorese gekoppelt mit einem Quadropol-time of flight-Massenspektrometer analysiert und mit der Software MassHunter ausgewertet.

## 5.5. Untersuchte Organe

### 5.5.1. Leber

Zu den wichtigsten Aufgaben der Leber gehören der Lipid-, Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel, mit der Produktion von Galle, aber auch die Detoxifikation von Fremdstoffen und die Speicherung von Glykogen und Lipiden (Rodrigues und Fanta, 1998; Barton, 2007). Die Fischleber weist eine retikulo-tubuläre Struktur auf, wobei die konzentrisch angeordneten Hepatozyten apikal die Gallencanaliculi begrenzen (Hampton et al., 1988). Die Hepatozyten stellen den Hauptzelltyp der Leber dar. Sie besitzen einen runden Nukleus mit viel Heterochromatin und einem prominenten Nukleolus (Hampton et al., 1985). Im Zytoplasma der Hepatozyten kann zudem Glykogen gespeichert werden (Takashima und Hibiya, 1995). Die von den Hepatozyten produzierte Galle wird über die Gallencanaliculi und die Gallengänge in die Gallenblase geleitet (Takashima und Hibiya, 1995). Sinusoide befinden sich zwischen den Tubuli am basalen Teil der Hepatozyten und verbinden diese mit der Pfortader (Hampton et al., 1988; Takashima und Hibiya, 1995).

### 5.5.2. Niere

Die Hauptfunktionen der Niere sind die Exkretion von Wasser, Eliminierung von Stoffwechselendprodukten und Rückresorption von Ionen. Die Fischniere wird eingeteilt in einen vorderen Teil (Kopfniere) mit einer blutbildenden Funktion (Barton, 2007) und einen hinteren Teil (Rumpfniere), der hauptsächlich der Exkretion dient, mit dem in hämatopoetisches (blutbildendes) Gewebe eingebetteten Nephronen als wichtigster funktioneller Einheit. Das Nephron besteht aus Nierenkörperchen und Nierentubuli. Die Filterstruktur des Nierenkörperchen ist der Glomerulus - ein Knäuel an Blutkapillaren, das von der Bowmanschen Kapsel umschlossen wird (Takashima und Hibiya, 1995). Die Kapillarwände bestehen dabei aus fenestrierten Endothelzellen, darüber befindet sich die Basallamina, auf der Podozyten sitzen (Takashima und Hibiya, 1995). Im Nierenkörperchen findet die Ultrafiltration des Blutes und Bildung des Primärharns statt (Tampi, 1959; Hickman und Trump, 1969). Die Rückresorption von Ionen und organischen Molekülen findet im daran anschließenden Tubulus statt (Hickman und Trump, 1969; Triebkorn et al., 2007). Der Tubulus untergliedert sich wiederum in mehrere Teilabschnitte. Die wichtigsten sind hierbei der proximale Tubulus 1 und 2 sowie der distale Tubulus. Im proximalen Tubulus 1 (P1) haben die Zellen eine kubische Form mit einem basal oder zentral liegenden runden Zellkern. Zudem weisen die Zellen von P1 viele große Vesikel in der apikalen Zone sowie einen Mikrovilli-Saum am Apex auf. Die Zellen des proximalen Tubulus 2 (P2) sind größer als in P1 und haben einen zentral liegenden ovalen Zellkern. In P2 sind keine größeren Vesikel zu erkennen. Die Epithelzellen des distalen Tubulus sind kleiner im Vergleich zum proximalen Tubulus. Sie haben nur noch wenige Mikrovilli, die unter dem Lichtmikroskop nicht mehr zu erkennen sind. (Anderson und Loewen, 1975; Takashima und Hibiya, 1995)

### 5.5.3. Kopf

Wichtigste Bestandteile des Fischkopfes sind Maul, Kiemen, Nasengruben, Augen und Gehirn. Das Maul dient der Aufnahme von Nahrung, die über den Schlund und die Speiseröhre zum Magen-Darmtrakt des Fisches befördert wird. Die Kiemen sind für die Atmung, Osmoregulation und Exkretion des Fisches zuständig. Vier der fünf Kiemenbogenpaare sind mit Primärlamellen besetzt sind, von denen seitlich Sekundärlamellen abgehen (Takashima und Hibiya, 1995). An dieser vergrößerten Oberfläche findet der Gasaustausch statt. Das fünfte Kiemenbogenpaar hat bei der Forelle keine respiratorische Funktion. Geschützt werden die Kiemenbögen von einem Kiemendeckel, dem *Operculum*. Das Gehirn des Fisches lässt sich in drei Hauptregionen gliedern: das Vorderhirn,

bestehend aus Telencephalon und Diencephalon, das Mittelhirn (Mesencephalon), und das Rhombencephalon, das sich in Metencephalon und Myelencephalon unterteilen lässt (Yamamoto, 2009). Das Telencephalon besteht dabei aus dem *Cerebrum* und dem für die olfaktorische Wahrnehmung zuständigen *Lobus olfactorius*, der über den *Tractus olfactorius* mit dem in der Nasenhöhle befindlichen *Bulbus olfactorius* verbunden ist (Kotrschal et al., 1998). Das Diencephalon stellt das Zwischenhirn dar, dessen wichtigster Bestandteil der Hypothalamus ist (Genten, 2009). An der Basis des Diencephalon befindet sich die Hypophyse, eine vom Hypothalamus gesteuerte Hormondrüse. Das für die visuelle Wahrnehmung zuständige *Tectum opticum*, das über den *Nervus opticus* mit den Augen verbunden ist, und das *Tegmentum* sind die Hauptkomponenten des Mesencephalon (Genten, 2009). Ein weiterer essentieller Bestandteil des Gehirns ist das *Cerebellum*, das zum Metencephalon gehört und für die Koordination der Bewegung und die Regulation der Muskeln verantwortlich ist (Kotrschal et al., 1998). Daran schließt sich das Myelencephalon mit der *Medulla oblongata* als wichtigster funktioneller Einheit an. Der Schädel des Fisches, bestehend aus vielen einzelnen Knochenplatten, umschließt und schützt das Gehirn und die Wahrnehmungsorgane.

#### 5.5.4. Darm

Der Fischdarm hat, neben der Absorption und Verdauung von Nährstoffen, noch weitere wichtige Funktionen, z.B. bei der Sekretion von Hormonen und anderen Botenstoffen, bei der Osmoregulation und in der Immunabwehr (Buddington und Krogdahl, 2004; Grosell et al., 2010). Der Darm erstreckt sich vom Magen bis zum Anus. Die Darmwand der Forelle gliedert sich, ähnlich wie bei anderen Vertebraten, in vier Hauptschichten: Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa (Khojasteh et al., 2009). Die Mukosa-Schicht besteht (von apikal nach basal betrachtet) aus einem einschichtigen Epithel von hochprismatischen Enterozyten, die einen basal liegenden Nukleus und einen hohen, durchgängigen Mikrovilli-Saum aufweisen (Khojasteh et al., 2009). Zwischen den Enterozyten befinden sich schleimproduzierende Becherzellen, die im hinteren Teil des Darms vermehrt auftreten (Iwai, 1968; Khojasteh et al., 2009). In der von den Becherzellen produzierten Schleimschicht, die an die Mikrovilli der Enterozyten assoziiert ist, tritt eine Vielzahl an Mikroorganismen auf, die das autochthone Darmmikrobiom der Forellen bilden. An der Basis der Epithelzellen liegt die Basallamina, darunter eine dünne Bindegewebsschicht (Takashima und Hibiya, 1995). Daran schließt sich eine weitere Bindegewebsschicht an, die Submukosa, die von der Muskularis-Schicht umschlossen wird. Die Muskularis-Schicht besteht aus einer inneren, zirkulären und einer äußeren, longitudinalen Muskelschicht. Begrenzt wird die Darmwand durch die Serosa-Schicht, eine dünne Bindegewebsschicht (Khojasteh et al., 2009).

Der Darm der Schnecke besteht neben hochprismatischen Epithelzellen noch aus Schleim- und Drüsenzellen (auch Granulazellen genannt) (Franchini und Ottaviani, 1992). Die Epithelzellen besitzen einen mittig gelegenen Zellkern und weisen am Apex entweder Mikrovilli oder Zilien auf, zudem können oberhalb des Zellkerns Lipidtropfen auftreten (Franchini und Ottaviani, 1992; Lobo-da-Cunha und Batista-Pinto, 2007). In den Schleimzellen befinden sich sekretorische Vesikel, die hauptsächlich mit Mukopolysacchariden gefüllt sind (Lobo-da-Cunha und Batista-Pinto, 2007). Wie auch bei den Forellen, ist in der von den Schleimzellen produzierten Schleimschicht das Darmmikrobiom der Schnecken enthalten. Die Drüsenzellen sind größer als die anderen Epithelzelltypen und beinhalten dunkle, runde Granula (Franchini und Ottaviani, 1992). Außerdem haben sie oft eine breitere Basis und einen apikal befindlichen Mikrovilli-Saum (Franchini und Ottaviani, 1992). Der Darm der Schnecke wird, wie auch bei den Fischen, von einer Basallamina begrenzt und von einer Bindegewebsschicht und einer Muskelschicht umschlossen (Boer und Kits, 1990; Lobo-da-Cunha und

Batista-Pinto, 2007). Der Darm der Schnecke hat eine unterstützende Funktion bei der Verdauung, die hauptsächlich in der Mitteldarmdrüse (vgl. 5.5.5.) stattfindet, und kann Lipide oder Glykogen speichern (Franchini und Ottaviani, 1992; Lobo-da-Cunha und Batista-Pinto, 2007).

#### **5.5.5. Hepatopankreas**

Der Hepatopankreas, auch Mitteldarmdrüse genannt, ist das Hauptstoffwechselorgan in Mollusken, zuständig für die Verdauung und Absorption von Nährstoffen sowie die Detoxifikation und Immobilisierung von Xenobiotika (Dallinger und Wieser, 1984; Rószler, 2014). Der Hepatopankreas hat eine verzweigte, tubuläre Struktur und ist assoziiert an den Mitteldarm (Rószler, 2014). Die Tubuli sind dabei von Bindegewebe umgeben und bestehen aus drei verschiedene Epithelzelltypen: Resorptionszellen, Kryptenzellen und Exkretionszellen. Die hochprismatischen Resorptionszellen beinhalten viele Vakuolen, die zur Basis der Zellen in der Größe zunehmen (Triebskorn, 1989). Am Apex der Resorptionszellen befinden sich Mikrovilli. Die Aufgabe der Resorptionszellen ist die Pinozytose von Nährstoffen und die Fett- und Glykogenspeicherung (Owen, 1970; Triebskorn, 1989). Die Kryptenzellen (auch Kalkzellen oder basophile Zellen genannt) haben eine konische Form mit einer breiten Basis (Triebskorn, 1989). Der basal liegende Nukleus der Kryptenzellen besitzt einen großen Nukleolus mit viel Heterochromatin. Ihre Funktion ist die Sekretion von Proteinen wie Verdauungsenzymen (Owen, 1970; Lobo-da-Cunha, 2000). In den Exkretionszellen befinden sich viele gelblich-bräunliche Granula, in denen Lipofusazine akkumuliert sind (Sumner, 1965). Exkretionszellen sind dabei vermutlich keine eigene Zellform, sondern werden entweder Resorptionszellen in ihrem letzten Entwicklungszustand zugeordnet (Porcel et al., 1996; Zaldibar et al., 2007b) oder als degenerierte Kryptenzellen angesehen (Sumner, 1965). Die Mikrovilli am Apex der Kryptenzellen und Exkretionszellen sind dabei länger als die der Resorptionszellen (Triebskorn, 1989).

#### **5.5.6. Sohle**

Die Sohle bildet als äußerste Schicht die Epidermis des Schneckenfußes, dessen Hauptfunktion die Fortbewegung ist. Die Sohle besteht aus einem einschichtigen Epithel aus hochprismatischen Zellen mit basal liegenden Zellkernen, welche am Apex Zilien oder Mikrovilli aufweisen (Tonar und Markoš, 2004; Bravo Portela et al., 2012). Weitere wichtige Zelltypen der Sohle sind die zu den Schleimzellen gehörenden Sohlen-, Mantel- und Peripodialdrüsenzellen, die sich entweder zwischen den Epithelzellen oder weiter innen liegend, basal der Epithelzellen, befinden und von dort eine schmale Verbindung bis zur äußeren Epitheloberfläche haben, um Mukopolysaccharide nach außen abgeben zu können (Chaparro et al., 1998; Triebskorn et al., 1998; Bravo Portela et al., 2012). Neben ihrer essentiellen Funktion bei der Fortbewegung erfüllen diese Schleime noch weitere Aufgaben, wie beispielsweise als Schutz vor äußeren Einflüssen (Triebskorn und Ebert, 1989; Davies und Hawkins, 1998; Triebskorn et al., 1998). An der Basis wird die Epithelschicht der Sohle von einer dünnen Bindegewebsschicht abgegrenzt, auf die eine Muskelschicht folgt (Jung et al., 2006).

### **5.6. Biomarkeruntersuchungen**

Details zur Zusammensetzung der verwendeten Chemikalien sowie zu den Einbett- und Färbeprotokollen sind im Anhang zu finden.

#### **5.6.1. Histopathologische Untersuchungen**

Histopathologische Veränderungen von Geweben sind gute Marker, um subletale Effekte von Chemikalien auf Zell- und Organ-Ebene zu analysieren (Schwaiger et al., 1992; Johnson et al., 1993;

Triebskorn et al., 1997; Bernet et al., 1999; Triebskorn et al., 2007). Die Kinetik der Gewebeschädigung folgt dabei einer Sättigungskurve. Im Grundzustand ist das Gewebe intakt und in einem optimalen Zustand. Mit zunehmender Belastung, beispielsweise durch Chemikalien, werden zunächst Reaktionen des Gewebes sichtbar. Bei anhaltender oder verstärkter Belastung kann das Gewebe schließlich in einen Destruktionszustand übergehen. Damit sind histopathologische Veränderungen von Geweben integrative Biomarker für Effekte (*Biomarker of effect*) und eine gute Ergänzung zur Auswertung von biochemischen Biomarkern, deren Reaktionskinetik meist einer Optimumskurve folgen (Triebskorn et al., 1996; Köhler und Triebskorn, 2004).

#### **5.6.1.1. Mögliche Veränderungen in den untersuchten Organen**

Leber

Als mögliche pathologische Veränderungen der Leber sind Zellhypertrophie und –hyperplasie, Entzündungen, Veränderungen im Glykogengehalt, Vakuolisierung des Zytoplasmas, dilatierte Kapillaren, erweiterte Interzellularen, Zellkerne mit hypertrophen Nukleoli, Karyolysen und Nekrosen bekannt (Triebskorn et al., 2008).

Niere

In der Niere können die folgenden Gewebeschäden auftreten: hyalintropfige Proteinspeicherungen in proximalen Tubuli, eine Reduzierung des hämatopoetischen Gewebes, erweiterte Interzellularen, eine stark erhöhte Anzahl an Makrophagen, dilatierte Tubuli und Nekrosen (Schwaiger, 2001; Triebskorn et al., 2007).

Mitteldarmdrüse

Mögliche histopathologische Veränderungen im Hepatopankreas sind ein erweitertes Lumen und Veränderungen in den Resorptionszellen wie vorgewölbte Apizes, Hyperplasie und Hypertrophie der Vakuolen sowie eine gestörte Kompartimentierung. Des Weiteren kann die Anzahl und Form der Kryptenzellen verändert sein sowie auch die Form der Zellkerne oder die Anzahl und Größe der Vakuolen. Schließlich können auch Destruktionen der einzelnen Zellen oder der ganzen Tubuli auftreten. (Osterauer et al., 2010)

#### **5.6.1.2. Methodik**

Die Proben für die histologischen Untersuchungen wurden bei den Probenahmen in einer Lösung mit 2 % Glutardialdehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einem Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Puffer (0,1 M, pH 7,6 für Fische und 0,01 M, pH 7,4 für Schnecken; AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland) für mindestens zwei Wochen fixiert. Nachdem die Proben dreimal für 10 min mit dem Puffer und dreimal für 15 min mit 70 %-igem Ethanol gewaschen worden sind, wurden die Leberproben weiter mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, bevor sie mit Paraffinwachs (Parablast, Leica, Wetzlar, Deutschland) in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica) infiltriert wurden. Die Nieren- und Hepatopankreasproben wurden vor der Entwässerung und Infiltration in einem Zwischenschritt einmal für 30 min und dann über Nacht mit einer 1:2 Mischung aus Ameisensäure und 70 %-igem Ethanol dekalzifiziert. Nach der Infiltration wurden die Proben mit Mikrotomen (Leica SM 2000 R) geschnitten, die Schnittdicke betrug dabei circa 3 µm. In einem Färbeautomaten (Varistain 24-4, Thermo Scientific, Deutschland) wurde ein Teil der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin und der andere Teil mit Alcianblau, Periodsäure und Schiffschem Reagenz (*Periodic acid-Schiff* = PAS) gefärbt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente hierbei als Übersichtsfärbung, bei der Zellkerne blau und Zytoplasma pink-rot angefärbt werden (Schmitz et al., 2010). Die Alcianblau-PAS-Färbung wird dazu eingesetzt, um (Muko-) Polysaccharide wie Schleime

und Glykogen sichtbar zu machen (Yamabayashi, 1987). Bei dieser Färbung werden Zellkerne und saure Mukopolysaccharide blau bzw. hellblau angefärbt, Glykogen und neutrale Mukopolysaccharide dagegen rot-violett (Benson, 1966). Die Auswertung wurde mit einem Lichtmikroskop durchgeführt (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Gewebeintegrität der untersuchten Organe wurde zunächst qualitativ beschrieben und anschließend semi-quantitativ bewertet. Dazu wurde der Zustand jeder Probe in eine von fünf Kategorien eingeteilt (1: Kontrollzustand, 2: leichte Reaktion, 3: Reaktion, 4: schwere Reaktion, 5: Destruktion) nach dem Einteilungsschema von Osterauer et al. (2010) für den Hepatopankreas und von Triebkorn et al. (2008) für Leber und Niere. Am Ende wurde nach Verblindung und Randomisierung der Proben eine weitere Auswertung durchgeführt, um einen *Observer-Bias* zu verhindern.

### **5.6.2. Nachweis des Glykogengehalts in der Leber**

Der Glykogengehalt der Leber ist ein wichtiger Parameter, um den energetischen Status der Fische zu bestimmen. Verschiedene Stressoren, wie beispielsweise Chemikalien, können zum Abbau des Leberglykogens führen, z.B. wenn es einen erhöhten Bedarf an Glykogen für die Biotransformation gibt (Braunbeck et al., 1990; Schramm et al., 1998; Triebkorn et al., 2004). Die Bestimmung des Glykogengehalts in der Leber der Bachforellen, die gegenüber Guanylarnstoff exponiert wurden, erfolgte hierbei mit einer histologischen Methode. Bei den gegenüber Metformin exponierten Bachforellen wurde die Glykogenanalyse zusätzlich mit einer biochemischen Methode durchgeführt.

Bei der histologischen Methode wurden die Leberschnitte wie oben beschrieben mit Alcianblau-PAS gefärbt. Glykogen wird dabei rot-violett dargestellt. Der Glykogengehalt der Leberschnitte wurde dann in die Kategorien hoch, mittel oder gering eingeteilt. Die Kategorie „hoch“ wurde vergeben, wenn in der Leber großflächig Glykogen zu finden war und die Zellen prall mit Glykogen gefüllt waren. In diesem Fall war eine intensive dunkelrote Anfärbung des Glykogens sichtbar. Kategorie „mittel“ wurde solchen Schnitten zugeordnet, die lediglich teilweise Glykogen in der Leber eingelagert hatten, und wenn dieses im Vergleich zur Kategorie „hoch“ deutlich reduziert war. Kategorie „wenig“ wurde vergeben, wenn der ganze Leberschnitt kaum bis gar nicht rot angefärbt war und somit nur wenig Glykogen enthielt. Die Klassifizierung der Proben in die drei Kategorien wurde randomisiert und verblindet durchgeführt.

Die biochemische Quantifizierung des Glykogengehalts wurde mit einem Glykogen-Assay von Sigma-Aldrich (MAK016, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei wird über ein gekoppeltes Enzym-Verfahren ein kolorimetrisches Produkt erzeugt (Sigma-Aldrich, 2015). Die Leberproben wurden mit bidestilliertem Wasser (10 µl/mg Probe) auf Eis homogenisiert, für 5 min auf 97 °C erhitzt und anschließend für 5 min bei 13 000 rcf bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5424R, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Die Überstände der Proben wurden 1:15 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und in Duplikaten auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden für die Erstellung einer Kalibriergeraden Glykogenstandards (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 µg/Well) ebenfalls im Duplikat auf die Platte pipettiert. Dann wurden 2 µl eines Hydrolyse-Enzym-Mix zu jedem Well gegeben. Um ein Hintergrundsignal herauszurechnen, welches durch bereits in der Probe enthaltene Glukose verursacht werden kann, wurde pro Probe noch ein weiteres Replikat ohne Hydrolyse-Enzym-Mix pipettiert. Die Platte wurde dann für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde pro Well 50 µl des Master-Reaktionsmix hinzu gegeben, bestehend aus 46 µl Puffer, 2 µl Development Enzym-Mix und 2 µl Fluoreszenz-Peroxidase-Substrat. Die durch Aluminiumfolie von Licht geschützte Platte wurde wiederum für 30 min inkubiert. Schließlich wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem Photometer (BioTek Instruments



ELx800G, Winooski, VT, USA) gemessen. Anhand der Kalibriergerade wurde der Glykogengehalt errechnet.

### 5.6.3. Analyse von Stressproteinen

Hitze-Schock-Proteine mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (Hsp70) bilden eine Familie der Stressproteine und fungieren als Chaperone: sie unterstützen den Transport von Proteinen sowie die Faltung von ungefalteten bzw. die Rückfaltung von teilweise beschädigten Proteinen. Hsp70-Proteine werden induziert, indem diese ungefalteten oder teilweise beschädigten Proteine an vorhandene Hsp70-Proteine binden und den zuvor daran gebundenen *heat shock factor* verdrängen. Nach einer Phosphorylierung bindet dieser Faktor als Trimer im Zellkern an das *heat shock element* der DNA, was zu einer Transkription und Translation von weiteren Hsp70-Proteinen führt. Vermehrtes Auftreten ungefalteter bzw. fehlgefalteter Proteine erhöht damit die Hsp70-Expression. Dabei können verschiedene Faktoren den Stressproteinlevel erhöhen. Natürliche, endogene Prozesse, wie Wachstum, führen zu einem erhöhten Bedarf an Proteinen und folglich auch an Chaperonen. Aber auch andere Faktoren, wie z.B. Hitze, UV-Strahlung oder Chemikalien, können zur Beschädigung von Proteinen führen und dadurch die Stressprotein-Produktion erhöhen (Sanders, 1993). Somit ist die Hsp70-Induktion stressorunspezifisch und ein Marker für die Gesamtheit aller Stressoren, die auf einen Organismus einwirken (Köhler und Triebkorn, 2004). Wichtig ist dabei, dass die Kinetik der Stressprotein-Induktion einer Optimumskurve folgt. Bei einer sehr starken proteotoxischen Wirkung nimmt die Stressprotein-Menge in der Zelle wieder ab, da das System selbst strukturelle Schäden erleidet (Köhler und Triebkorn, 2004). Um die Ursache für ein geringes Hsp70-Level zu bestimmen, das entweder auf eine Überlastung des Systems durch eine stark proteotoxische Wirkung eines Stressors zurückzuführen ist oder anzeigt, dass ein Stressor keine proteotoxische Effekte hat, ist es unbedingt erforderlich zum Vergleich einen strukturellen Marker (beispielsweise Veränderungen des Gewebezustands) heranzuziehen.

In den Experimenten mit Bachforellen und Posthornschnucken wurde der Kopf bzw. die Mitteldarmdrüse für die Hsp70-Analyse verwendet. Die Proben wurden zunächst 1:4 mit einem Extraktionsgemisch aus 98 % Extraktionspuffer und 2 % Proteaseinhibitor verdünnt und auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden sie bei 20 000 rcf bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und die Überstände auf zwei Eppendorf-Tubes pro Probe aufgeteilt: zum einen wurden zur Bestimmung des Gesamt-Proteingehalt der Proben mittels eines Bradford-Assays 5 µl des Überstands in 245 µl des 1:10 verdünnten Extraktionspuffers gegeben. Zum anderen wurden zur Quantifizierung des Hsp70-Gehalts in den Proben 60 µl des Überstands mit 30 µl Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate = SDS) versetzt und für 5 min auf 97 °C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Der Bradford-Assay wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Von den Proben wurden jeweils 25 µl Überstand in Triplikaten aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Proteingehalten (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mg/ml Bovines serumalbumin) pipettiert. Dazu wurden pro Standard-Proteingehalt vier Wells à 25 µl verwendet. Anschließend wurde in jedes Well jeweils 250 µl Bradford-Reagenz zugegeben. In Abhängigkeit vom Proteingehalt wies die Probe dann eine entsprechend intensive blaue Farbe auf. Die Absorption wurde mit einem Photometer (BioTek Instruments ELx800G) bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert und anhand der Kalibriergerade der Proteingehalt der Probe errechnet.

Zur Quantifizierung des Hsp70-Gehalts in den Proben wurde zunächst eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (30 % Acrylamid; 0,3 % Bisacrylamid) durchgeführt, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Pro Gel wurden zehn Proben sowie ein Standard (Ganzkörperhomogenat

Bachforelle) im Duplikat aufgetragen. Für jede Probe wurde das nach Bradford bestimmte Volumen der SDS-Proben-Mischung verwendet, welches einer Proteinmenge von 40 µg entspricht. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte bei 120 V innerhalb einer Stunde. Anschließend wurden die Proteine unter Anlegen einer Spannung von 90 mA pro Gel und nach Zugabe eines Transferpuffers von den Polyacrylamid-Gelen auf Nitrozellulose-Membranen gebロットet. Nachdem diese für 1,5 Stunden in einer Absättigungslösung waren, um noch freie unspezifische Bindungsstellen für Proteine auf der Membran zu belegen, wurden die Membranen mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gespült und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung mit einem ersten Antikörper (*mouse anti-human Hsp70*, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert, der spezifisch an Hsp70 band. Nach nochmaligem Spülen mit TBS wurden die Filter für weitere 2 Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur in einer Lösung mit einem zweiten Antikörper (*goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat*, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) inkubiert, der wiederum an den ersten Antikörper band. Dann wurden die Membranen abermals mit TBS gespült und in eine Färbelösung mit Chlor-naphthol gegeben, bis Hsp70-Proteinbanden sichtbar wurden. Schließlich wurde die optische Dichte (= Farbintensität x Fläche) der Banden mittels des Programms Image Studio Lite (Version 4.0.21, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) quantifiziert und in Relation zum Standard gesetzt.

#### **5.6.4. Nachweis von Lipidperoxiden / oxidativem Stress**

Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen freien Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species* = ROS) und antioxidativen Abwehrsystemen gestört ist (Winston und Di Giulio, 1991). Dies führt zu Kettenreaktionen von ROS mit mehrfach ungesättigten Lipiden und der Entstehung von Lipidperoxiden. ROS werden natürlicherweise bei Prozessen der aeroben Zellatmung gebildet (Winston und Di Giulio, 1991). Das Gleichgewicht kann aber durch verschiedene Stressoren wie beispielsweise Xenobiotika beeinflusst werden, welche durch verschiedene Prozesse ebenfalls zur ROS-Produktion beitragen (Valavanidis et al., 2006; Regoli und Giuliani, 2014). Diese ROS können zunächst von antioxidativen Enzymen wie Katalase, Superoxid-Dismutase oder Glutathion-Peroxidase abgefangen und unschädlich gemacht werden (Sies, 1997). Außerdem können nicht-enzymatische Systeme mit Stoffen wie Phenolen, Carotinoiden oder Ascorbinsäure die Kettenreaktionen unterbrechen (Sies, 1997). Wenn durch diese antioxidativen Systeme das Vorkommen der ROS nicht ausreichend begrenzt wird, kann es beispielsweise zu einer Peroxidation der Doppellipidschicht von Membranen kommen. Dies kann den Verlust der Membran-Fluidität, eine erhöhte Durchlässigkeit und letztendlich auch die Desintegration der Membran nach sich ziehen (Betteridge 2000).

Der Lipidperoxid-Level wurde mit Hilfe des FOX (*ferrous oxidation xylenol orange*)-Assays nach Hermes-Lima et al. (1995) und Monserrat et al. (2003) in der Sohle der Posthornschnellen und im Kopf der Bachforellenlarven bestimmt. Dabei wird zweiwertiges Eisen in saurem Milieu durch in der Probe enthaltene Lipidperoxide zu dreiwertigem Eisen oxidiert, welches mit dem Farbstoff Xylenolorange einen Komplex bildet und zu einem Farbumschlag führt. Die Proben wurden dazu zunächst mit Methanol 1:4 (Posthornschnellen) bzw. 1:7 (Bachforellenlarven) verdünnt, auf Eis homogenisiert und bei 4 °C mit 14 000 rpm für 5 min zentrifugiert. Für das Assay wurden 96-Well-Platten verwendet. Zunächst wurden pro Well in festgelegter Reihenfolge jeweils 50 µl FeSO<sub>4</sub>, 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 50 µl des Farbstoffs Xylenolorange sowie jeweils 25 µl Probe und 25 µl bidestilliertes Wasser (Posthornschnellen) bzw. 35 µl Probe und 15 µl bidestilliertes Wasser (Bachforellenlarven) aufgetragen, sodass pro Well ein Gesamtvolumen von 200 µl gegeben war. Jede Probe wurde dabei

im Triplikat getestet. Um das Hintergrundsignal durch endogenes Eisen in der Probe zu bestimmen, wurde zusätzlich noch ein Well pro Probe ohne FeSO<sub>4</sub> pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 75 min (Metformin/Posthornschncken), 65 min (Guanylharnstoff/Posthornschncken) bzw. 90 min (Guanylharnstoff/Bachforellenlarven) bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption mithilfe eines Plattenlesers bei 570 nm gemessen. Dann wurde pro Well 1 µl einer 1 mM Cumolhydroperoxid (CHP)-Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurde erneut die Absorption gemessen und die CHP-Äquivalente jeder Probe berechnet:

$$CHP_{\text{äquiv.}} = \frac{Abs_{570\text{vor CHP}}}{Abs_{570\text{nach CHP}}} * Volumen_{CHP} * \frac{Gesamtvolumen}{Probenvolumen} * Verdünnungsfaktor$$

mit  $Volumen_{CHP}=1 \mu\text{l}$ ;  $Gesamtvolumen=200 \mu\text{l}$ ;  $Probenvolumen=25 \mu\text{l}$  (Posthornschncken) bzw.  $35 \mu\text{l}$  (Bachforellenlarven);  $Verdünnungsfaktor=4$ .

### 5.6.5. Untersuchungen zum Schwimmverhalten

Chemikalien können nicht nur Einfluss auf das Überleben oder die Physiologie von Organismen nehmen, sondern auch physiologische Prozesse in Gang setzen, die das Verhalten der Organismen verändern (Scott und Sloman, 2004). Beispielsweise können Änderungen im Metabolismus und den Energiereserven die Schwimmaktivität von Fischen beeinflussen (Scott und Sloman, 2004; Vieira et al., 2009). Diese Verhaltensveränderungen könnten dann nicht nur für das einzelne Individuum, sondern auch für ganze Populationen von Bedeutung sein.

Das Schwimmverhalten der gegenüber Metformin exponierten Bachforellenlarven wurde nach 90 Tagen (11 °C) bzw. 102 Tagen (7 °C) im Experiment bestimmt. Dazu wurden fünf Individuen pro Aquarium (15 pro Expositionsgruppe) in kleinere, quadratische Aquarien (Kantenlänge 17 cm) mit 300 ml der entsprechenden Testlösung und Temperatur transferiert. Bei den juvenilen Bachforellen, die gegenüber Guanylharnstoff exponiert waren, wurden die Schwimmverhaltenstests zwei Tage nach dem eigentlichen Ende des Versuchs durchgeführt (07.09.17). Es wurden drei Individuen pro Aquarium (neun pro Expositionsgruppe) in die oben beschriebenen Test-Aquarien gesetzt, die 1,6 L des jeweiligen Testmediums enthielten. Die Tiere konnten sich für 2 min an die neuen Gegebenheiten akklimatisieren, dann wurde das Schwimmverhalten der Fische aus vier Testaquarien parallel für 18 min gefilmt. Mit der Software EthoVision 11.5 bzw. 12 (Noldus; Wageningen, Niederlande) wurde jedes Individuum getrackt und die zurückgelegte Distanz und mittlere Geschwindigkeit für jedes Individuum errechnet. Mögliche *Identity swaps*, also der unbeabsichtigte Austausch des Tracking Punkts zwischen zwei Individuen, wurden mit dem TrackEditor von EthoVision korrigiert.

### 5.5.6 Studien zum intestinalen Mikrobiom

Aufgrund der starken Korrelation zwischen der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms und dem Auftreten von Krankheiten kann die Untersuchung des Darmmikrobioms Informationen zum Gesundheitszustand des Wirts liefern (de Vos und de Vos, 2012; Marchesi et al., 2015; Wu et al., 2015; Janssens et al., 2018). Bei der Analyse des intestinalen Mikrobioms der gegenüber Metformin exponierten Bachforellenlarven wurde untersucht, welche Taxa an Bakterien zu welchen Anteilen im Darmmikrobiom vorkommen. Zudem wurde betrachtet, ob auch pathogene Bakterienstämme auftreten. Der Schwerpunkt lag hierbei auf dem autochthonen Mikrobiom in der Darmmukosa, da der Schleim aufgrund der dichten Assoziation an die Mikrovilli des Darmepithels von höherer Relevanz für die Wirt-Symbiont-Kommunikation ist als das allochthone Mikrobiom im Darminhalt.

Die Analysen wurden von einem Projektpartner im Effect-Net-Projekt durchgeführt (Eike Rogall, AG Schwartz, KIT; Andreas Dötsch & Dominic Stoll, Max-Rubner-Institut).

Zur Bestimmung der Art und Quantität der Bakterien in der Darmmukosa der Bachforellenlarven wurde zunächst der Darminhalt entfernt und anschließend die DNA durch enzymatische Lyse und ein QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und mit einem NanoDrop-Spektrophotometer quantifiziert. Die V1–V2 Region des 16S rRNA Gens, welches innerhalb der Bakterien stark konserviert ist, wurde amplifiziert. Dabei wurden Primer mit Barcode- und Linkersequenzen an diesen spezifischen DNA-Abschnitt angehängt, die zur Sequenzierung und Probenzuordnung dienten. Nach der Sequenzierung mittels eines Illumina MiSeq Systems wurden die Sequenzen gefiltert, um das durch fehlerhafte Sequenzen entstandene Rauschen zu entfernen. Ähnliche Sequenzen wurden dann zu einer Gruppe zusammengefasst und diese mit einer Datenbank abgeglichen, um sie zu einem Taxon zuzuordnen.

### **5.7. Statistik**

Die statistische Auswertung wurde mit JMP 13 von SAS (Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Daten wurden zunächst mit dem D'Agostino-Omnibus-Test und dem Levene's-Test auf Normalverteilung und Varianzhomogenität getestet und wenn nötig transformiert. Mortalitäts- und Schlupfdaten wurden mittels COX-Regression ausgewertet, für die histologischen Daten wurde ein Likelihood-Ratio-  $\chi^2$ - Test verwendet. Alle sonstigen Daten zu Gewicht, Länge, Stressproteinlevel, Lipidperoxid-Level und Schwimmverhalten wurden mit einer nested ANOVA mit dem Block als nesting Faktor und einem Dunnett's-Post hoc-Test ausgewertet. Wenn keine Varianzhomogenität durch Transformieren der Daten erreicht werden konnte, wurde eine Welch-ANOVA verwendet. Der  $\alpha$ -Level lag bei 0,05 (alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt) und wurde bei multiplen Vergleichen mit einer sequenziellen Bonferroni-Korrektur angepasst. Es wurde kein statistischer Vergleich zwischen den beiden getesteten Temperaturen im Versuch mit den gegenüber Metformin exponierten Bachforellenlarven durchgeführt, sondern lediglich eine qualitative Gegenüberstellung. Auch Unterschiede in Bezug auf die Effekten der beiden Testsubstanzen auf Bachforellenlarven und Posthornschncken wurden lediglich deskriptiv miteinander verglichen, da die Experimente mit dem jeweiligen Testorganismus nicht zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurden, und sich diese auch in weiteren Parametern unterschieden (z.B. Testdauer).

## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1. Kapitel I: Effekte von Metformin und Guanylharnstoff auf Posthornschncken

S. Jacob, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Zwiener, R. Triebkorn: Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*)

Frontiers in Environmental Science 2019, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00045>

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob das Antidiabetikum Metformin und sein Transformationsprodukt Guanylharnstoff den Gesundheitszustand von Posthornschncken (*Planorbarius corneus*) negativ beeinflussen. Die Schncken wurden hierzu gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Metformin (0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L) bzw. Guanylharnstoff (0; 0,1; 10; 100 mg/L) bei 11 °C für 35 Tage (Metformin) bzw. 21 Tage (Guanylharnstoff) exponiert. Untersucht wurden die Mortalität, das Gewicht sowie histopathologische Effekte und Stressproteine im Hepatopankreas. Als Marker für oxidativen Stress wurde darüber hinaus der Lipidperoxid-Level in der Sohle der Schncken bestimmt. Begleitend zu den Experimenten wurden die Realkonzentrationen der beiden Substanzen im Testmedium mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit einem Triple-Quadropol (QqQ)-Massenspektrometer analysiert (Selina Tisler, AG Zwiener, Universität Tübingen).

Die Mittelwerte der Wasserparameter, die zu Beginn und am Ende der Experimente gemessen wurden, lagen für Metformin bei  $10,3 \pm 0,1$  °C (Temperatur),  $10,03 \pm 0,27$  mg/L ( $O_2$ ),  $8,16 \pm 0,09$  (pH) und  $461 \pm 7$   $\mu$ S/cm (Leitfähigkeit) und für Guanylharnstoff bei  $10,6 \pm 0,2$  °C (Temperatur),  $10,58 \pm 0,17$  mg/L ( $O_2$ ),  $8,32 \pm 0,04$  (pH) und  $499 \pm 27$   $\mu$ S/cm (Leitfähigkeit). Die chemische Analyse der Realkonzentrationen von Metformin im Testmedium ergab eine gute Übereinstimmung mit den Nominalkonzentrationen. Im Experiment mit Guanylharnstoff kam es zu einer leichten Kontamination der Kontrolle, jedoch lag die gemessene Konzentration um einen Faktor 100 unter der niedrigsten getesteten Guanylharnstoffkonzentration von 0,1 mg/L und wurde somit noch als tolerabel angesehen.

Die beiden Substanzen hatten im getesteten Konzentrationsbereich keinen letalen Effekt auf die Posthornschncken. Die Mortalität lag zwischen 0,0 und 9,5 % in allen Treatments. Das Gewicht der Testorganismen wurde zwar nicht signifikant durch die beiden Substanzen verändert, dennoch gab es einen Trend zu einem verringerten Gewicht der Tiere im Vergleich zur Kontrolle bei 0,1–10 mg/L Metformin bzw. 10 und 100 mg/L Guanylharnstoff. Bereits während der Experimente war in den genannten Expositionsgruppen eine verringerte Fraßaktivität der Tiere zu beobachten, welche den Effekt erklären könnte. Im Menschen hat Metformin eine Appetit-reduzierende Wirkung und wird daher auch als Medikament zur Adipositas-Behandlung verschrieben (Malin und Kashyap, 2014). Es ist allerdings nicht bekannt, ob ein vergleichbarer Wirkmechanismus auch in den Schncken zu der leichten Gewichtsreduktion geführt haben könnte. Auf welche Art und Weise Guanylharnstoff das Gewicht verringern könnte, ist bislang ebenfalls nicht erforscht.

Die histologischen Untersuchungen des Hepatopankreas zeigten keine deutlichen Gewebeschäden. Bei allen Gruppen wurde der Gewebezustand in die Kategorien 1 bis 3 eingeordnet. Eine Destruktion des Gewebes konnte nicht beobachtet werden. Bei Metformin zeigte der Gewebezustand des Hepatopankreas keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen. Tendenziell wurde aber bei mit Metformin behandelten Tieren öfter mit der Kategorie 3 bewertet als bei Kontrollen. Am deutlichsten war dies in der Expositionsgruppe mit der höchsten

Metforminkonzentration (10 mg/L) zu sehen. Beobachtete Reaktionen im Gewebe waren ein erweitertes Lumen der Tubuli, Vakuolisierungen in den Kryptenzellen sowie eine Ausstülpung der Apizes der Resorptionszellen in das Tubuluslumen. In der Expositionsgruppe mit der höchsten Guanylharnstoffkonzentration (100 mg/L) waren deutlich stärkere Reaktionen im Hepatopankreas der Testorganismen zu sehen als in der Kontrolle, wie beispielsweise erweiterte Tubuluslumina, gestörte Kompartimentierungen der Resorptionszellen, deformierte Zellkerne sowie Hyperplasie, Hypertrophie und Vakuolisierung der Kryptenzellen. In den anderen beiden Guanylharnstoff-Expositionsgruppen mit 0,1 und 10 mg/L traten solche Reaktionen nicht auf. Der Vergleich mit Literaturdaten zu histopathologischen Reaktionen im Hepatopankreas von Schnecken ergab, dass die in dieser Studie gefundenen Symptome stressorunspezifisch waren und auch bei der Exposition gegenüber Hitze und verschiedenen Chemikalien auftreten können (Triebkorn, 1989; Cajaraville et al., 1990; Hamed et al., 2007; Zaldibar et al., 2007a; Dittbrenner et al., 2008; Osterauer et al., 2010; Garmendia et al., 2011).

Bei der Analyse der Stressproteine im Hepatopankreas war ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter Hsp70-Level in den Expositionsgruppen mit 0,1 mg/L Guanylharnstoff bzw. 1 mg/L Metformin zu verzeichnen. In den Expositionsgruppen mit 10 und 100 mg/L Guanylharnstoff bzw. in der Expositionsgruppe mit 10 mg/L Metformin sank der Hsp70-Level wieder ab. Dieser Verlauf des Hsp70-Levels über die getesteten Konzentrationen könnte den Verlauf einer Optimumskurve darstellen und somit möglicherweise ein Hinweis für einen prototoxischen Effekt sein. Piro et al. (2012) postulierten, dass eine Reduktion der Hsp70-Expression im Pankreas von Ratten nach Metforminexposition beobachtet wurde. Allerdings war die Hsp70-Expression in der Studie von Piro et al. durch einen weiteren Stressor bereits im Vorfeld deutlich erhöht. Über den Effekt von Metformin allein auf den Stressproteinlevel gibt es keine Studien. Zu möglichen Effekten von Guanylharnstoff auf das Stressprotein-System ist bislang ebenfalls nichts bekannt.

Die Untersuchung des zweiten biochemischen Stressmarkers ergab, dass sich der Lipidperoxid-Gehalt in der Sohle der Schnecken nicht zwischen den verschiedenen Expositionsgruppen und der Kontrolle unterschied. Metformin ist dafür bekannt, bei einem hohen oxidativen Stress-Niveau als Antioxidans wirken zu können (Dehkordi et al., 2018). Dabei soll es die Produktion von ROS verringern (Bonfont-Rousselot et al., 2003) und die Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Katalase erhöhen können (Buđak et al., 2014), sodass weniger Lipidperoxide entstehen (Anurag und Anuradha, 2002). Da in meinen Experimenten oxidativer Stress nicht über einen weiteren Stressor induziert wurde, waren vermutlich auch die antioxidative Wirkung von Metformin und eine Reduktion des Lipidperoxid-Levels nicht zu sehen. In Bezug auf den Einfluss des Antidiabetikums auf antioxidative Enzyme zeigten zwei Studien, dass Metformin alleine, ohne ein bereits im Vorfeld erhöhtes oxidatives Stress-Niveau, zu einer erhöhten Katalase-Aktivität führen kann (Dai et al., 2014; Lee et al., 2019). Aufgrund dessen wären weitere Untersuchungen der antioxidativen Enzyme im Hepatopankreas der Posthornsnecken wünschenswert. Über die Effekte von Guanylharnstoff auf oxidativen Stress und Lipidperoxide ist bis jetzt noch nichts bekannt.

## 6.2. Kapitel II: Effekte von Metformin auf Bachforellenlarven

S. Jacob, A. Dötsch, S. Knoll, H.-R. Köhler, E. Rogall, D. Stoll, S. Tisler, C. Huhn, T. Schwartz, C. Zwiener, R. Triebkorn: Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?

Environmental Science Europe 30 (48) 2018, doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0179-4>

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des Antidiabetikums Metformin auf die Entwicklung und den Gesundheitszustand von Bachforellenlarven zu untersuchen. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine erhöhte Temperatur und der dadurch bedingte höhere Metabolismus der Testorganismen bzw. die erhöhte Aufnahme der Testsubstanz in das Gewebe der Tiere möglicherweise zu stärkeren Effekten des Pharmazeutikums führen würde. Dazu wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium für 108 Tage bei 7 °C bzw. 97 Tage bei 11 °C gegenüber 0, 1, 10, 100 und 1000 µg/L Metformin exponiert. Untersucht wurden sowohl apikale Endpunkte wie Mortalität, Gewicht und Länge der Tiere ebenso wie der histopathologische Zustand und der Glykogengehalt der Leber, der Stressproteinlevel und das Schwimmverhalten. Außerdem wurde die bakterielle Zusammensetzung des Darmmikrobioms analysiert (Eike Rogall, AG Schwartz, KIT; Andreas Dötsch & Dominic Stoll, Max-Rubner-Institut). Begleitend zum Experiment wurden die Realkonzentrationen von Metformin im Testmedium mittels HPLC gekoppelt mit einem QqQ-Massenspektrometer bestimmt (Selina Tisler, AG Zwiener, Universität Tübingen). Der Metformingehalt im Gewebe der Testorganismen wurde mittels Kapillarelektrophorese gekoppelt mit einem Quadropol-time of flight (QTOF)-Massenspektrometer analysiert (Sarah Knoll, AG Huhn, Universität Tübingen). Das dabei untersuchte Gewebe umfasste das Stück des Fisches vom Kopf (ohne Kiemen) bis zur Schwanzflosse inklusive Niere und Muskel, aber ohne Leber und Darm.

Die Mittelwerte für Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Leitfähigkeit (gemessen zu Beginn und am Ende des Experimentes) lagen für die Exposition bei 7 °C bei  $7,2 \pm 0,3$  °C (Temperatur),  $8,05 \pm 0,33$  (pH),  $10,54 \pm 0,16$  mg/L (O<sub>2</sub>) und  $410 \pm 20$  µS/cm (Leitfähigkeit) und für die Exposition bei 11 °C im Mittel bei  $10,7 \pm 0,2$  °C (Temperatur),  $8,03 \pm 0,13$  (pH),  $9,75 \pm 0,15$  mg/L (O<sub>2</sub>) und  $431 \pm 9$  µS/cm (Leitfähigkeit). Die chemische Analytik zeigte, dass es nur leichte Abweichungen der Metformin-Realkonzentrationen im Testmedium von den Nominalkonzentrationen gab. Im Gewebe der Fische konnte das Antidiabetikum erst ab 10 µg/L Metformin im Testmedium nachgewiesen werden. Die Metforminkonzentrationen im Gewebe stiegen dabei mit zunehmender Konzentration des Pharmazeutikums im Expositionsmedium an. Dabei wurde im Gewebe der Bachforellen, die gegenüber 1000 µg/L Metformin exponiert waren, bei 11 °C mit 234 ng/g Nassgewicht eine circa viermal höhere Metforminkonzentration gemessen als bei 7 °C mit 56 ng/g Nassgewicht. Ursächlich hierfür könnte eine höhere Aufnahme von Metformin ins Gewebe bedingt durch den erhöhten Stoffwechsel bei 11 °C sein. Da bei Metformin die Aufnahme deutlich langsamer vonstattengeht als die Elimination (Pentikäinen et al., 1979) und somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, könnten die Auswirkungen einer Temperaturerhöhung mit der daraus resultierenden Beschleunigung der Prozesse wesentlich stärker bei der Aufnahme von Metformin in die Zellen zu spüren sein als bei der Elimination. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die deutlich höheren Metforminkonzentrationen im Gewebe der Forellen bei 11 °C im Vergleich zu 7 °C darstellen.

Die getesteten Metforminkonzentrationen führten zu keinen letalen oder embryotoxischen Effekten bei den Bachforellenlarven. Die Mortalität war insgesamt sehr gering und lag zwischen 0,67 und 4 %.

Die Exposition bei 11 °C führte, wie erwartet, zu einem schnelleren Schlupf und einer höheren Herzschlagrate als bei 7 °C. Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen gab es dabei allerdings nicht. Im Mittel schlüpften die Bachforellen bei 7 °C nach 7 Tagen im Experiment (54 Tage nach Befruchtung) und bei 11 °C nach 4 Tagen im Experiment (51 Tage nach Befruchtung). Insgesamt war die Schlupfrate in allen Expositionsgruppen 100 %. Die Herzschlagrate betrug im Mittel bei 7 °C 76 Schläge pro min und bei 11 °C 99 Schläge pro min. Auch andere Studien mit Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*), Medaka (*Oryzias latipes*) und Zebraäbrblingen (*Danio rerio*) konnten keine Hinweise auf eine erhöhte Mortalität oder Veränderungen in der Schlupf- oder Herzschlagrate durch Metformin finden (EMA, 2011; Mieck, 2016; Ussery et al., 2018; Caldwell et al., 2019; Lee et al., 2019).

Durch Exposition bei 11 °C wuchsen die Bachforellenlarven schneller, was sich durch ein höheres Gewicht und eine größere Körperlänge im Vergleich zu den Tieren der Exposition bei 7 °C äußerte. Dabei war das Gewicht der Larven in den Expositionsgruppen mit 10 und 100 µg/L Metformin bei 7°C bzw. 1 µg/L Metformin bei 11 °C signifikant reduziert im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Auch in Dickkopfelritzen und Medaka führte Metformin zu einer Gewichtsreduktion (Niemuth und Klaper, 2015; Ussery et al., 2018). Im Menschen verringert Metformin die AMPK-Aktivität im Hypothalamus, sodass der Appetit abgeschwächt wird (Malin und Kashyap, 2014). Aufgrund dieser Eigenschaft wird Metformin – wie bereits in Kapitel I beschrieben – auch als Medikament zur Adipositas-Behandlung eingesetzt. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die Gewichtsreduktion im Fisch sein. Die Körperlänge zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen. Grund hierfür ist vermutlich der generell schnellere Zuwachs an Körpermasse im Vergleich zur Körperlänge (Froese, 2006).

Der histopathologische Zustand der Leber der Bachforellenlarven war insgesamt gut. Die Proben wurden in die Kategorien 1 bis 3 eingeordnet, keine der untersuchten Lebern befand sich in einem Destruktionszustand. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen. Tendenziell war der Glykogengehalt in allen Lebern von Fischen, die gegenüber Metformin exponiert waren, erhöht. Am deutlichsten war dies in der Expositionsgruppe mit 1 µg/L Metformin zu sehen. Bei 1000 µg/L Metformin hingegen war die Variabilität hoch und es gab sehr starke Schwankungen im Glykogengehalt. Diese Trends wurden durch die biochemische Analyse des Glykogengehalts bestätigt. Die starke Zunahme von Glykogen in der Leber von Bachforellenlarven, die gegenüber 1 µg/L Metformin exponiert waren, war für die Exposition bei 11 °C signifikant (nested ANOVA:  $p=0,0085$ ; Dunnett's Test (0 µg/L|1 µg/L):  $p=0,0024$ ) im Vergleich zur Kontrolle, bei 7 °C tendenziell erkennbar aber knapp nicht signifikant (nested ANOVA:  $p=0,0620$ ). Diese Erhöhung des Glykogengehalts der Leber, die besonders prominent in den Fischen der Expositionsgruppe mit 1 µg/L Metformin war, könnte durch eine von Metformin verstärkte Insulin-induzierte Glykogen-Bildung erklärt werden (Detaile et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Polakof et al. (2011), dass der hepatische Glykogengehalt von Regenbogenforellen nach zweistündiger Exposition gegenüber 120 mg/kg Metformin reduziert war. Hierbei ist aber festzuhalten, dass die Expositionszeit dieses Tests sehr kurz war im Vergleich zum vorliegenden Experiment mit Bachforellenlarven, und ein direkter Vergleich deshalb schwer möglich ist. Des Weiteren wurde das Antidiabetikum den Tieren per Infusion verabreicht, was die verschiedenen Ergebnisse erklären kann. Unterschiede im hepatischen Glykogengehalt sowie eine Variabilität der Glykogen-Synthese konnten bereits in diversen Studien mit Metformin festgestellt werden. Laut Wiernsperger (1996), zitiert in Radziuk et al. (2003), hingen diese Effekte sowohl von der getesteten Metforminkonzentration als auch von weiteren Stoffwechselgegebenheiten der jeweiligen Studie ab. Obgleich verringerte



Glykogenlevel bei Tieren mit einem höheren Metabolismus, verursacht durch erhöhte Temperaturen, erwartet wurden, gab es keine Unterschiede im Glykogengehalt der Lebern der beiden Kontrollgruppen von 7 und 11 °C. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Bachforellen bereits seit dem Augenpunktstadium gegenüber 7 bzw. 11 °C exponiert und somit wahrscheinlich an die jeweilige Temperatur adaptiert waren. So bedeutet eine höhere Temperatur nicht nur einen größeren Energieverbrauch zur Aufrechterhaltung des Metabolismus, sondern auch eine erhöhte Aufnahme von Futter. Die aus dem Futter gewonnene Energie kann dann, neben der Aufrechterhaltung des Metabolismus, zur Speicherung in Energieressourcen wie Glykogen zur Verfügung stehen. Auch Barton und Schreck (1987) zeigten, dass der Glykogengehalt von juvenilen Königslachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*), die an verschiedene Temperaturen von 7,5 °C, 12,5 °C und 21 °C adaptiert waren, nach Behandlung mit einem Stressor zwar unterschiedlich stark absank, aber bei allen getesteten Temperaturen ein für alle Expositionsgruppen gleich hoher Glykogenlevel wieder erreicht werden konnte.

Bei der Untersuchung des intestinalen Mikrobioms konnten deutliche Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung in den Expositionsgruppen 1 und 10 µg/L Metformin bei 7 °C bzw. 100 µg/L Metformin bei 11 °C im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle festgestellt werden. In den genannten Expositionsgruppen war der Anteil an Proteobakterien stark erhöht und der Anteil an Firmicutes und Actinobakterien deutlich verringert im Vergleich zum Darmmikrobiom der Kontrolltiere. Auch im Menschen und in Mäusen wurden bereits Metformin-induzierte Verschiebungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms festgestellt (Lee und Ko, 2014; Shin et al., 2014; Forslund et al., 2015; Wu et al., 2017). Zudem gehört der Darm neben Niere und Leber zu den Organen, in denen die höchsten Metforminkonzentrationen im Körper nachgewiesen werden können (Wilcock und Bailey, 1994; Bailey et al., 2008; Graham et al., 2011). In Bezug auf die beiden getesteten Temperaturen konnte durch einen Vergleich der beiden Kontrollgruppen aus den Experimenten bei 7 und 11 °C gezeigt werden, dass die verschiedenen Bakteriengruppen offenbar unterschiedliche Temperaturpräferenzen hatten, da der Anteil an Firmicutes bei 11°C höher war als bei 7 °C, der Anteil an Proteobakterien und Actinobakterien war dagegen verringert.

Beim Stressproteingehalt, der im Kopf der Fische gemessen wurde, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen, auch die Temperatur hatte keinen Einfluss auf den Hsp70-Level. Vermutlich war der Grundlevel von Hsp70 in den Testorganismen aufgrund ihres jungen Alters und des daraus resultierenden starken Wachstums generell sehr hoch – wie auch Murtha und Keller (2003) für Zebrabärblinglarven zeigten, sodass mögliche Einflüsse der Temperatur und des Medikaments nicht zu sehen waren. Es ist aber auch möglich, dass Metformin bei Fischen keinen Einfluss auf Hsp70 nimmt.

Das Schwimmverhalten (gesamte zurückgelegte Distanz und mittlere Geschwindigkeit) waren durch das Pharmazeutikum nicht beeinflusst. Auch die Untersuchung von Godoy et al. (2018) zur Lokomotor-Aktivität von Zebrabärblingen zeigte keine Metformin-induzierten Veränderungen im Schwimmverhalten. Dahingegen zeigten MacLaren et al. (2018), dass Metformin das Aggressionsverhalten von Kampffischen (*Betta splendens*) abschwächen kann. Obwohl eine erhöhte Aktivität bei den Testorganismen erwartet wurde, die gegenüber der höheren Temperatur ausgesetzt waren, zeigten unsere Ergebnisse in die entgegengesetzte Richtung. Da die Aufzeichnung des Schwimmverhaltens aus technischen Gründen in der 11 °C-Klimakammer stattfand, könnte allerdings die Umgebungstemperatur von 11 °C während der Verhaltensexperimente zu einer Erwärmung des Expositionsmediums und somit einer erhöhten Schwimmaktivität der Bachforellen geführt haben, die bei 7 °C exponiert waren.

Die beobachteten Effekte von Metformin auf das Gewicht, den Glykogengehalt der Leber und das Mikrobiom der Bachforellenlarven traten alle im niedrigen  $\mu\text{g/L}$  Bereich auf, wiesen aber keine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung auf. Höhere Konzentrationen von Metformin im einstelligen  $\text{mg/L}$  Bereich riefen diese Effekte nicht hervor. Eine fundierte mechanistische Erklärung dazu ist momentan nicht möglich, da die exakte Wirkweise des Antidiabetikums noch diskutiert wird und derzeit nicht endgültig geklärt ist. Hinsichtlich der Effekte des Antidiabetikums im Niedrigkonzentrationsbereich ist zu bedenken, dass Metformin bereits bei geringen Konzentrationen therapeutisch wirken kann, wie in pharmakologischen Studien gezeigt wurde (Cao et al., 2014; He und Wondisford, 2015; An und He, 2016). Des Weiteren ist zu beachten, dass es interspezies-Unterschiede im Hinblick auf die Sensitivität der therapeutischen Wirkung von Metformin geben kann (Faure et al., 2018). Bei den Bachforellenlarven führten bereits Wasserkonzentrationen im niedrigen  $\mu\text{g/L}$  Bereich zu den oben genannten Effekten. Auch in den Studien von Niemuth und Klaper (2015) und Ussery et al. (2018) haben Metforminkonzentrationen im vergleichbaren Konzentrationsbereich Veränderungen im Gewicht und im endokrinen System der Fische verursacht. Um diese Niedrigkonzentrationseffekte im Fisch erklären zu können, wären weitere Informationen zur Aufnahme von Metformin in die Bachforelle wünschenswert. Die Abschätzung einer internen Dosis einer Substanz im Fisch wäre mit dem Fisch-Plasma-Modell nach Huggett et al. (2003) möglich. Dieses Modell errechnet aus der Plasmakonzentration eines Pharmazeutikums im Menschen eine Fischplasma steady-state Konzentration. Allerdings ist dieses Modell für sehr hydrophile Stoffe mit einem geringen  $\log K_{ow}$ -Wert wie Metformin mit einer sehr großen Unsicherheit behaftet und daher unrealistisch (Schreiber et al., 2011). Schließlich kann man sagen, dass sowohl weitere Analysen zur Aufnahme von Metformin in Leber, Gehirn und Darm der Bachforelle als auch die genaue Wirkweise des Antidiabetikums wichtige Grundlagen zur Komplementierung der hier beschriebenen Ergebnisse wären.

Eine mögliche Begründung für die fehlenden Effekte des Antidiabetikums auf die Bachforelle bei hohen Metforminkonzentrationen könnte die nicht-lineare Pharmakokinetik des Arzneimittels mit einer verringerten Bioverfügbarkeit bei hohen Metformindosen sein (Scheen, 1996; Graham et al., 2011). Proctor et al. (2008) demonstrierten in einem *in vitro* Versuch mit einer Darmzellschicht, dass es bei hohen Metformindosen zu einer Sättigung in der intestinalen Absorption des Antidiabetikums kommen kann. Auch Chung et al. (2018) zeigten, dass es keinen linearen Zusammenhang zwischen der Abnahme des Blutzuckerspiegels und einer steigenden Metforminkonzentration im Menschen gab, was auf eine verringerte Absorption der hohen Metformindosen zurückgeführt wurde.

Eine weitere Erklärung für die nur im Niedrigkonzentrationsbereich auftretenden Effekte könnten gegenläufige Wirkmechanismen des Antidiabetikums sein, welche durch unterschiedliche Konzentrationen aktiviert werden könnten. So stellten Xu et al. (2017) in ihrem Review zur Erklärung nicht-monotoner Dosis-Wirkungsbeziehungen von Xenoöstrogenen unter anderem eine sogenannte Balance-Hypothese auf, nach der bei geringen Konzentrationen eines bestimmten Stoffes nur ein Wirkmechanismus in Gang gesetzt wird, bei höheren Konzentrationen zwei verschiedene, gegenläufige Mechanismen aktiviert werden. Letztendlich wäre es notwendig, mehr Konzentrationen zu testen und den Abstandsfaktor zwischen den Expositionsguppen zu verringern, um mögliche konzentrationspezifische Effekte vom Metformin auf Fische genauer bestimmen zu können.

### 6.3. Kapitel III: Effekte von Guanylharnstoff auf larvale und juvenile Bachforellen

S. Jacob, S. Knoll, H.-R. Köhler, S. Tisler, C.Huhn, C. Zwiener, R. Triebkorn: Does guanylyurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, affect the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?

PeerJ 7:e7289 2019, doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.7289>

In der hier vorgestellten Studie wurden die Effekte des Transformationsprodukts Guanylharnstoff auf die Gesundheit zweier Lebensstadien der Bachforelle untersucht. Dazu wurden in einem Experiment circa neun Monate alte juvenile Bachforellen für 29 Tage gegenüber 0, 10, 100 und 1000 µg/L Guanylharnstoff exponiert. In einem weiteren Experiment wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium für 110 Tage bis zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Aufzehrung des Dottersacks gegenüber den gleichen Guanylharnstoffkonzentrationen exponiert. Dabei wurde der Einfluss des Transformationsprodukts auf die Entwicklung der Tiere (Schlupf und Herzschlagrate) betrachtet. Zur Untersuchung des Gesundheitszustands wurden in beiden Experimenten apikale Endpunkte wie Mortalität und Wachstum analysiert. Außerdem wurde die Leber als wichtigstes Stoffwechselorgan bei beiden Lebensstadien histopathologisch untersucht. Bei den juvenilen Bachforellen wurde zusätzlich auch die Niere histologisch betrachtet. Ergänzt wurden diese Auswertungen durch die Analyse biochemischer Stressmarker. Bei den Larven wurde hierzu der Lipidperoxid-Level als Maß für oxidativen Stress, bei den Juvenilen der Stressproteinlevel zur Identifikation proteotoxischer Effekte untersucht. Um mögliche Effekte auf das Verhalten der Tiere zu ermitteln, wurde das Schwimmverhalten der juvenilen Fische aufgezeichnet und ausgewertet. Die Untersuchung der Realkonzentrationen von Guanylharnstoff im Testmedium mittels HPLC gekoppelt mit einem QTOF-Massenspektrometer lief parallel zu den Experimenten (Selina Tisler, AG Zwiener, Universität Tübingen). Des Weiteren wurden die Guanylharnstoffkonzentrationen im Gewebe der Bachforellenlarven mittels Kapillarelektrophorese gekoppelt mit einem QTOF- Massenspektrometer bestimmt (Sarah Knoll, AG Huhn, Universität Tübingen).

Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Leitfähigkeit wurden zu Beginn und am Ende der Experimente gemessen, bei den Larven zusätzlich noch an Tag 55 der Exposition. Die Mittelwerte der Wasserparameter im Experiment mit den juvenilen Bachforellen lagen bei  $6,9 \pm 0,3$  °C (Temperatur),  $8,33 \pm 0,12$  (pH),  $11,42 \pm 0,15$  mg/L (O<sub>2</sub>),  $497 \pm 23$  µS/cm (Leitfähigkeit) und im Experiment mit den Bachforellenlarven bei  $7,3 \pm 0,2$  °C (Temperatur),  $8,33 \pm 0,05$  (pH),  $11,00 \pm 0,20$  mg/L (O<sub>2</sub>),  $483 \pm 15$  µS/cm (Leitfähigkeit).

Die gemessenen Realkonzentrationen von Guanylharnstoff im Testmedium lagen in beiden Experimenten nahe den Nominalkonzentrationen. Im Gewebe konnte Guanylharnstoff lediglich bei den Bachforellenlarven nachgewiesen werden, die gegenüber der höchsten Testkonzentration (1000 µg/L) exponiert waren. Dabei war die Gewebekonzentration des Transformationsprodukts mit 11 ng/g Nassgewicht um einen Faktor von 5 geringer als in Bachforellenlarven, die bei 7 °C gegenüber 1000 µg/L der Muttersubstanz Metformin exponiert waren (Kapitel II). Diese vergleichsweise geringen Gewebekonzentrationen der beiden Testsubstanzen lassen sich vermutlich durch die hohe Polarität und die positive Ladung der beiden Stoffe erklären.

Die Mortalität war in beiden Experimenten gering. Sie lag zwischen 2,2 und 6,7 % bei den Larven und zwischen 0 und 3,3 % bei den juvenilen Bachforellen. Somit hatte Guanylharnstoff im getesteten Konzentrationsbereich keine letale Wirkung auf die Fische. Auch die Entwicklungsparameter deuteten nicht auf eine embryotoxische Wirkung von Guanylharnstoff hin, so auch bei Versuchen mit Zebraabräblingen und Medaka (Mieck, 2016; Ussery, 2018). Die Herzschlagrate der Bachforellenlarven

lag im Mittel bei 59 Schlägen pro min, der Schlupfzeitpunkt bei 10 Tagen im Experiment (56 Tage nach Befruchtung) und der Schlupferfolg bei 100 %. Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen gab es dabei nicht.

Das Wachstum der Tiere wurde ebenfalls nicht durch das Transformationsprodukt von Metformin beeinflusst. Dahingegen zeigte Ussery (2018) in ihrer Studie eine signifikante Guanylharnstoff-induzierte Reduktion im Gewicht von Medakalarven bereits im ng/L-Bereich. Bei den adulten Tieren schien in Bezug auf das Gewicht eine Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere zu bestehen. Bei männlichen Medaka gab es hier ebenfalls einen Trend zu einem reduzierten Gewicht, was aber bei den Weibchen nicht so deutlich zu erkennen war.

Bei der Untersuchung der biochemischen Stressmarker zeigte sich, dass Guanylharnstoff den Stressproteinlevel der juvenilen Bachforellen nicht veränderte. Dagegen war bei den Posthornschncken eine Erhöhung des Hsp70-Levels nach Guanylharnstoffexposition zu sehen (Kapitel I). Der zur Muttersubstanz Metformin verwandte Stoff Phenformin hatte keinen Einfluss auf den Hsp70 Level in hippocampalen Neuronen (Lee et al., 2002). Metformin selbst kann dagegen bei vorliegendem proteotoxischen Stress zu einer Verringerung der Hsp70-Expression führen (Piro et al., 2012), wie bereits in Kapitel I und II beschrieben. Als alleiniger Stressor führte das Antidiabetikum bei den Posthornschncken zu einem Anstieg des Hsp70-Levels (Kapitel I), dagegen gab es bei den gegenüber Metformin exponierten Bachforellenlarven keine Veränderungen im Stressproteingehalt (Kapitel II). Der im Kopf der Bachforellenlarven gemessene biochemische Stressmarker, der Lipidperoxid-Level, unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Expositionsgruppen mit Guanylharnstoff und der Kontrollgruppe, wie auch im Versuch mit den Posthornschncken festgestellt wurde (Kapitel I). Dagegen kann der strukturell ähnliche Stoff Guanidin den ROS-Level absenken (Yildiz et al., 1998). Phenformin zeigte in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe unterschiedliche Effekte auf den ROS-Level (Anisimov et al., 2005). Wie bereits in Kapitel I beschrieben, kann Metformin einen hohen oxidativen Stresslevel verringern (Anurag und Anuradha, 2002; Bonnefont-Rousselot et al., 2003; Buđak et al., 2014; Dehkordi et al., 2018), aber auch ohne vorliegenden oxidativen Stress dazu führen, dass es zu einer Erhöhung der Katalase-Aktivität und des ROS-Levels kommen kann (Dai et al., 2014; Lee et al., 2019). Trotz der Informationen über strukturell ähnliche Stoffe gibt es momentan keinen weiteren Anhaltspunkt, dass Guanylharnstoff oxidative oder proteotoxische Effekte ausüben könnte.

## 7. Synthese

### 7.1. Tabellarische Zusammenfassung

Tabelle 4: Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (links) sowie Resultate von zusätzlich durchgeführten Experimenten (rechts) – Exposition von larvalen und juvenilen Bachforellen und Posthornschnegen gegenüber Metformin (rot unterlegt = Effekt, grün unterlegt = kein Effekt, dunkelgrau unterlegt = Parameter nicht untersucht)

| Metformin                          |                                 |                              |                                                  |                                  |                                                             |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|                                    | Larvale Bachforellen (7 °C)     | Larvale Bachforellen (11 °C) | Posthornschnegen (11 °)                          | Juvenile Bachforellen (7 °C)     | Posthornschnegen (7 °)                                      |
| Konzentrationen                    | 0; 1; 10; 100; 1000 µg/L        | 0; 1; 10; 100; 1000 µg/L     | 0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L                         | 0; 10; 1000 µg/L                 | 0; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L                                    |
| Endpunkte                          |                                 |                              |                                                  |                                  |                                                             |
| Mortalität                         | kein Effekt                     | kein Effekt                  | kein Effekt                                      | kein Effekt                      | kein Effekt                                                 |
| Länge                              | kein Effekt                     | kein Effekt                  |                                                  | kein Effekt                      |                                                             |
| Gewicht                            | verringert (bei 10 & 100 µg/L)  | verringert (bei 1 µg/L)      | tendenziell verringert (bei 0,1-10 mg/L)         | kein Effekt                      | kein Effekt, (insg. verringert im Vgl. zu 11 °C)            |
| Herzschlag                         | kein Effekt                     | kein Effekt                  |                                                  | kein Effekt                      |                                                             |
| Schlupf                            | kein Effekt                     | kein Effekt                  |                                                  | kein Effekt                      |                                                             |
| Histopathologie                    | kein Effekt                     | kein Effekt                  | tendenziell mehr Reaktionszustände (bei 10 mg/L) | kein Effekt                      | kein Effekt (insg. mehr Reaktionszustände im Vgl. zu 11 °C) |
| Glykogen                           | tendenziell erhöht (bei 1 µg/L) | erhöht (bei 1 µg/L)          |                                                  | tendenziell erhöht (bei 10 µg/L) |                                                             |
| Lipidperoxide                      |                                 |                              | kein Effekt                                      |                                  | kein Effekt                                                 |
| Stressproteine Hsp70               | kein Effekt                     | kein Effekt                  | erhöht (bei 1 mg/L)                              | kein Effekt                      | kein Effekt                                                 |
| Schwimmverhalten                   | kein Effekt                     | kein Effekt                  |                                                  | kein Effekt                      |                                                             |
| Zusammensetzung des Darmmikrobioms | verändert (bei 1 & 10 µg/L)     | verändert (bei 100 µg/L)     | noch in Arbeit                                   | verändert (bei 10 & 1000 µg/L)   | verändert (bei 0,01 & 1 mg/L)                               |

Tabelle 5: Zusammenfassung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (links) sowie Resultate von zusätzlich durchgeführten Experimenten (rechts) – Exposition von larvalen und juvenilen Bachforellen und Posthornschnecken gegenüber Guanylarnstoff (rot unterlegt = Effekt, grün unterlegt = kein Effekt, dunkelgrau unterlegt = Parameter nicht untersucht)

| Guanylarnstoff                     |                             |                              |                                            |                              |                                          |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|
|                                    | Larvale Bachforellen (7 °C) | Juvenile Bachforellen (7 °C) | Posthornschnecken (11 °C)                  | Larvale Bachforellen (11 °C) | Posthornschnecken (7 °C)                 |
| Konzentrationen                    | 0; 10; 100; 1000 µg/L       | 0; 10; 100; 1000 µg/L        | 0; 0,1; 10; 100 mg/L                       | 0; 10; 100; 1000 µg/L        | 0; 0,1; 10; 100 mg/L                     |
| Endpunkte                          |                             |                              |                                            |                              |                                          |
| Mortalität                         | kein Effekt                 | kein Effekt                  | kein Effekt                                | kein Effekt                  | erhöht (bei 100 mg/L)                    |
| Länge                              | kein Effekt                 | kein Effekt                  |                                            | kein Effekt                  |                                          |
| Gewicht                            | kein Effekt                 | kein Effekt                  | tendenziell verringert (bei 10 & 100 mg/L) | kein Effekt                  | verringert (bei 10 & 100 mg/L)           |
| Herzschlag                         | kein Effekt                 |                              |                                            | kein Effekt                  |                                          |
| Schlupf                            | kein Effekt                 |                              |                                            | kein Effekt                  |                                          |
| Histopathologie                    | kein Effekt                 | kein Effekt                  | mehr Reaktionszustände (bei 100 mg/L)      | kein Effekt                  | mehr Destruktionszustände (bei 100 mg/L) |
| Glykogen                           | kein Effekt                 | kein Effekt                  |                                            | kein Effekt                  |                                          |
| Lipidperoxide                      | kein Effekt                 |                              | kein Effekt                                | kein Effekt                  | kein Effekt                              |
| Stressproteine Hsp70               |                             | kein Effekt                  | erhöht (bei 0,1 mg/L)                      |                              | kein Effekt                              |
| Schwimmverhalten                   |                             | kein Effekt                  |                                            |                              |                                          |
| Zusammensetzung des Darmmikrobioms | noch in Arbeit              | noch in Arbeit               | noch in Arbeit                             | noch in Arbeit               | noch in Arbeit                           |

## 7.2. Beantwortung der übergeordneten Fragestellungen

Folgende Fragen zur Wirkung von Metformin und Guanylharnstoff sollen in der Arbeit beantwortet werden:

- I. Haben das Antidiabetikum Metformin und sein Transformationsprodukt Guanylharnstoff einen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Bachforellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf? Sind diese relevant für die aquatische Umwelt? Welches Lebensstadium der Bachforellen reagiert sensitiver auf die beiden Stoffe?
- II. Haben das Antidiabetikum Metformin und sein Transformationsprodukt Guanylharnstoff einen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Posthornschnellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf? Sind diese relevant für die aquatische Umwelt?
- III. Welcher der beiden Testorganismen reagiert sensitiver auf die beiden Stoffe?
- IV. Können Unterschiede in der Temperatur (7 °C bzw. 11 °C) auftretende Effekte in den Testorganismen modifizieren?

### I. Effekte der beiden Stoffe bei Bachforellen

#### Metformin:

Metformin hatte bei den getesteten Konzentrationen keine letalen oder entwicklungstoxischen Effekte bei Bachforellenlarven. Auch konnten keine Veränderungen des Schwimmverhaltens oder des Stressmarker-Levels festgestellt werden. Jedoch konnte das Pharmazeutikum das Gewicht, den Glykogengehalt in der Leber sowie das intestinale Mikrobiom der Fische im niedrigen µg/L-Bereich und somit bei umweltrelevanten Konzentrationen beeinflussen. Die durch das Pharmazeutikum verursachte Gewichtsreduktion kann als therapeutischer Effekt angesehen werden, da Metformin neben seiner Funktion als Antidiabetikum auch als Medikament zur Adipositas-Behandlung verwendet wird. Andere Studien mit Fischen wiesen ebenfalls darauf hin, dass Metformin in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich das Gewicht der Tiere reduziert (Niemuth und Klaper, 2015; Ussery et al., 2018). Dies lässt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in diesem Kontext plausibel erscheinen. Reduziertes Körpergewicht könnte im Freiland für Fische potentiell von Nachteil sein, da kleinere Fischlarven eher zur Beute von Fressfeinden werden als größere (Crowder et al., 1992) und auch die Fekundität bei größeren Weibchen höher ist als bei kleineren (Koops et al., 2004). Die Zunahme des Glykogengehalts der Leber könnte auf eine durch Metformin hervorgerufene Verstärkung der Insulin-induzierten Glykogen-Synthase-Aktivität zurückzuführen sein. In Studien mit Ratten wurde beobachtet, dass die Aktivität der Glykogen-Synthase durch Metformin deutlich erhöht wurde (Reddi und Jyothirmayi, 1992) und zu einer Glykogen-Zunahme in der Leber führen konnte (Rossetti et al., 1990). Inwieweit der hier unter Laborbedingungen gezeigte, durch Metformin erhöhte Glykogengehalt für aquatische Organismen im Freiland von Relevanz sein könnte, ist diskutabel. Da Glykogen als Energiespeicher dient und in Reaktion auf energie-erfordernde Stresssituationen, wie beispielsweise ein mangelndes Nahrungsangebot, die Bekämpfung von Krankheiten oder die Flucht vor Fressfeinden sehr schnell mobilisiert werden muss, könnten diese Prozesse einen wesentlich größeren Einfluss auf den Glykogengehalt haben als das Antidiabetikum.

Metformin-induzierte Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms, wie sie in dieser Arbeit bei Bachforellenlarven beobachtet wurden, konnten in anderen Studien mit Menschen und Nagetieren ebenfalls nachgewiesen werden (Lee und Ko, 2014; Shin et al., 2014; Forslund et al., 2015; Wu et al., 2017). Weitere Untersuchungen im Effect-Net-Projekt ergaben, dass der Anteil an fakultativ pathogenen Bakterienarten wie *Aeromonas hydrophila*, *Enterokokkus faecalis* und *Enterokokkus faecium* in Expositionsgruppen mit Metformin tendenziell erhöht war (Rogall et al., 2019). Außerdem wurde in Reinkulturen eine signifikant erhöhte Expression von Virulenzfaktoren dieser ausgewählten fakultativen Bakterien bei Metforminkonzentrationen von 1 und 10 µg/L für Aeromonaden und 10 und 100 µg/L für Enterokokken nachgewiesen. Das führt zu der Annahme, dass nach Metforminexposition vermehrt virulente Bakterien im Darmmikrobiom der Fische auftreten können. Dies kann wiederum zu einem indirekten negativen Einfluss auf das Immunsystem der Wirtsorganismen führen (Pollak, 2017).

Auch in dem Experiment mit juvenilen Bachforellen (Versuch 2, vgl. 5.3. und 7.1.) ergaben sich Hinweise auf einen erhöhten Glykogenlevel der Leber bei geringen Metforminkonzentrationen sowie Veränderungen im Darmmikrobiom. Andere Parameter, wie der Stressproteinlevel oder das Verhalten, waren wie bei den larvalen Bachforellen ebenfalls nicht von Metformin beeinflusst. Die Ergebnisse des Versuchs mit den älteren Forellen stützen somit die oben vorgestellten Ergebnisse der Studie mit den Larven. Ein Vergleich der beiden Lebensstadien der Bachforelle ist jedoch schwierig, da die juvenilen Tiere lediglich für drei Wochen exponiert wurden, was auch ein Grund für die schwächeren Reaktionen auf Metformin sein könnte.

**Zusammenfassend kann man sagen, dass Metformin in umweltrelevanten Konzentrationen Effekte bei Bachforellen hervorrufen kann. Diese betreffen sowohl den Kohlenhydratstoffwechsel und das Gewicht der Bachforellen als auch das Darmmikrobiom.**

#### Guanylharnstoff:

Guanylharnstoff, das Haupttransformationsprodukt von Metformin, hatte keine letalen Effekte auf die larvalen und juvenilen Bachforellen. Bei den Experimenten mit den Fischen waren inklusive der höchsten getesteten Konzentration von 1000 µg/L keine Effekte von Guanylharnstoff auf die Parameter zur Untersuchung des Gesundheitszustands (Wachstum, Histopathologie Leber / Niere, Hsp70- und Lipidperoxid-Level, Schwimmverhalten) oder der Entwicklung feststellbar.

**Guanylharnstoff hatte damit sowohl bei umweltrelevanten Konzentrationen als auch bei 100-fach höheren Konzentrationen keine Effekte auf die getesteten Parameter bei der Bachforelle.**

## **II. Effekte der beiden Stoffe bei Posthornschnecken**

#### Metformin:

Auch bei den Posthornschnecken gab es keine erhöhte Mortalität durch Metformin. Bereits in der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,01 mg/L konnte in einem parallel durchgeführten Versuch bei 7 °C ein Effekt des Antidiabetikums auf das intestinale Mikrobiom der Posthornschnecken festgestellt werden (vgl. 7.1.) (Rogall, 2019). Damit zeigte sich, dass Metformin sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten das Darmmikrobiom beeinflussen kann. Vergleichbare Ergebnisse liegen für die Posthornschnecken, die bei 11 °C exponiert wurden, nicht vor, da die Analyse noch in Arbeit ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Metformin in vergleichbar niedrigen Konzentrationen auch bei den Posthornschnecken der 11 °C-Exposition zu



einem Effekt auf das Darmmikrobiom führen könnte. In der Expositionsgruppe mit 1 mg/L Metformin kam es zu einem Anstieg des Stressproteinlevels der Schnecken, das in der Expositionsgruppe mit der höchsten Metforminkonzentration von 10 mg/L wieder abnahm. Dies könnte möglicherweise auf einen proteotoxischen Effekt von Metformin hindeuten. Zudem war in den Expositionsgruppen mit den drei höchsten getesteten Metforminkonzentrationen das Gewicht der Tiere tendenziell verringert und der Gewebezustand des Hepatopankreas in der Expositionsgruppe mit der höchsten Metforminkonzentration tendenziell schlechter im Vergleich zur Kontrolle, wobei diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren.

**Zusammenfassend kann man sagen, dass das Antidiabetikum bei umweltrelevanten Konzentrationen erste Effekte auf die Gesundheit der Posthornschnellen ausübten könnte, indem das intestinale Mikrobiom beeinflusst wird. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Annahme auf den Ergebnissen der parallel durchgeführten Exposition bei 7 °C beruht.**

#### Guanylharnstoff:

Guanylharnstoff hatte, wie die Muttersubstanz, keine letalen Effekte bei den Posthornschnellen. Der Hsp70-Level war bereits in der niedrigsten Guanylharnstoffkonzentration erhöht, bei den höheren Konzentrationen sank der Hsp70-Gehalt wieder auf den Level der Kontrolle ab, was auf einen proteotoxischen Effekt von Guanylharnstoff hindeuten könnte, wie bei den gegenüber der Muttersubstanz exponierten Schnecken. Die beobachteten Symptome im Hepatopankreas-Gewebe der Schnecken traten erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 mg/L Guanylharnstoff auf, welche weit über dem umweltrelevanten Konzentrationsbereich liegt. Da diese Symptome auch bei Exposition gegenüber verschiedensten Stressoren auftreten können, werden sie vermutlich durch unspezifische Wirkungen des Transformationsprodukts verursacht. Auch die Tendenz zu einem reduzierten Gewicht der Posthornschnellen war lediglich bei einer Exposition gegenüber den beiden höchsten getesteten Guanylharnstoffkonzentrationen zu erkennen.

**Insgesamt gab es in der durchgeführten Studie Effekte auf den Stressproteinlevel der Posthornschnellen, weitere adverse Effekte von Guanylharnstoff bei umweltrelevanten Konzentrationen konnten jedoch nicht festgestellt werden.**

### **III. Vergleich der beiden Testorganismen**

#### Metformin:

Metformin führte bei den Bachforellen bereits in Konzentrationen im umweltrelevanten Bereich zu Veränderungen im Gewicht und dem Glykogengehalt der Leber, wohingegen das Gewicht und der Gewebezustand des Hepatopankreas der Posthornschnellen erst bei deutlich höheren Metforminkonzentrationen beeinflusst wurden. Die bei 1 mg/L bei den Posthornschnellen auftretende Zunahme des Hsp70-Levels konnte bei den Bachforellen nicht beobachtet werden. Dies könnte, wie bereits in Kapitel II beschrieben, auf den generell hohen Hsp70-Level der sich in Entwicklung befindlichen Bachforellenlarven zurückzuführen sein, wodurch kleinere Schwankungen im Stressproteinlevel maskiert werden könnten. Bei der Untersuchung des intestinalen Mikrobioms zeigte sich, dass sowohl die bei 7 °C exponierten Posthornschnellen (vgl. 7.1.) als auch die Bachforellen bei Konzentrationen von 10 µg/L Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung aufwiesen. Beispielsweise konnte bei beiden Spezies in der Expositionsgruppe mit 10 µg/L Metformin eine Verringerung der Firmicutes beobachtet werden (Rogall, 2019). Ein Vergleich zwischen den bei 11 °C gehaltenen Schnecken und Bachforellen ist momentan nicht möglich, da die Analysen zum

Mikrobiom der Posthornschecken noch nicht abgeschlossen sind. Alles in allem konnten beide Spezies bereits durch geringe Metforminkonzentrationen beeinflusst werden und stellen damit sensitive Testorganismen für die Untersuchung von Metformin dar.

Im Hinblick auf mögliche Wirkweisen des Antidiabetikums stellt die AMP-Proteinkinase ein mögliches Ziel für Metformin dar. AMPK ist ein hoch konservierter Energiesensor in Eukaryoten (Mihaylova und Shaw, 2011) und sollte daher sowohl in Schnecken als auch in Fischen zu finden sein. Polakof et al. (2011) bestätigten, dass AMPK in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) vorkommt, durch Metformin aktiviert werden und auf mehrere Enzyme einwirken kann, die wichtige Funktionen im Glukose-Stoffwechsel der Leber haben. Bislang gibt es noch keine Informationen darüber, ob AMPK auch in Schnecken durch Metformin aktiviert wird, und ob dies zu ähnlichen Effekten wie im Fisch führen kann. Zudem wären durch Metformin in Gang gesetzte Insulin-induzierte Wirkungen, wie eine erhöhte Glukose-Aufnahme in Zellen oder gesteigerte Glykogen-Synthese in Fischen und Schnecken theoretisch möglich, da auch sie Insulin-Formen ähnlich denen des Menschen besitzen (Ebberink et al., 1989; Polakof et al., 2012). Da Metformin auf zentrale Systeme im Stoffwechsel einwirkt, die stark konserviert sind, ist es naheliegend, dass das Pharmazeutikum in Nichtzielorganismen wie Fischen, Schnecken, aber auch in anderen Spezies Effekte verursachen kann.

#### Guanylharnstoff:

In der Expositionsgruppe mit einer Konzentration von 100 µg/L Guanylharnstoff, die für beide Spezies getestet wurde, war bei den Posthornschnellen ein erhöhter Hsp70-Level feststellbar, bei den Bachforellen dagegen zeigten sich keine Effekte des Transformationsprodukts. Aufgrund des vermutlich generell höheren Proteinbedarfs und des in der Folge erhöhten Hsp70-Levels der im Wachstum befindlichen larvalen und juvenilen Fische könnten mögliche Veränderungen verursacht durch Guanylharnstoff maskiert worden sein. Damit gestaltet sich der Vergleich zwischen den beiden Testspezies schwierig. Weitere Effekte, wie Gewebeeränderungen im Hepatopankreas der Posthornschnellen, traten erst ab Expositionen gegenüber 100 mg/L Guanylharnstoff auf. Da die Fische nicht gegenüber einer so hohen Testkonzentration exponiert waren, kann man diese Effekte im Gewebe der Schnecken nicht mit Reaktionen im Lebergewebe der Bachforellen vergleichen.

Insgesamt haben die durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass Guanylharnstoff zu Effekten in Nichtzielorganismen führen kann. Über einen möglichen Wirkmechanismus von Guanylharnstoff ist in der Literatur bislang nichts bekannt, sodass weitere Untersuchungen dazu erforderlich wären.

## **IV. Vergleich der beiden getesteten Temperaturen**

#### Metformin:

Generell kann die Toxizität von Chemikalien mit steigender Temperatur zunehmen, bedingt durch einen erhöhten Metabolismus im Organismus, wodurch die Aufnahme, Biotransformation und Elimination beeinflusst werden können (Cairns et al., 1975; Lydy et al., 1999; Kim et al., 2010). So zeigten Lydy et al. (1999), dass Organophosphat-Insektizide mit erhöhter Temperatur eine zunehmend toxische Wirkung auf Zuckmückenlarven hatten. In der Studie von Kim et al. (2010) führten einige, jedoch nicht alle untersuchten Pharmazeutika zu einer zunehmenden Immobilisierung von *Daphnia magna* mit steigender Temperatur.

Ein direkter Vergleich der Effekte der beiden getesteten Temperaturen in den Experimenten mit den Bachforellenlarven ist schwierig, da man nicht nur die Temperatur allein betrachten kann, sondern miteinbeziehen muss, dass sich die bei 11 °C exponierten Testorganismen aufgrund ihres schnelleren

Wachstums (bedingt durch die höhere Temperatur) zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten in einem anderen Lebensstadium befanden als die Fische bei 7°C. Die höhere Temperatur konnte nicht als zusätzlicher Stressor angesehen werden, da sie für Bachforellenlarven noch sehr gut tolerierbar war. So zeigten sich beispielsweise weder im Glykogengehalt noch beim Hsp70-Level deutliche Temperatureffekte. Einzig in der bakteriellen Zusammensetzung des Darmmikrobioms konnte man leichte Temperaturpräferenzen der verschiedenen Bakteriengruppen erkennen. Der Anteil der Firmicutes war bei 11 °C höher als bei 7 °C, der Anteil der Proteobakterien und Actinobakterien war dagegen bei 11 °C verringert. Zu bedenken ist, dass sich die optimale Wassertemperatur für Bachforellen in Abhängigkeit von saisonalen Schwankungen verändert. Über das Jahr gemittelt werden 9 °C als die optimale Wassertemperatur im Fluss angegeben (Hari et al., 2006), sodass die getesteten Temperaturen von 7 und 11 °C noch keinen Temperaturstress darstellen dürften. Aufgrund der Tatsache, dass Bachforellen zumeist im Herbst bis Winter laichen (Klemetsen et al., 2003), ist zu beachten, dass die Temperatur im Freiland im Verlauf der Entwicklung der Eier und Larven zunimmt. Die in diesem Experiment verwendete Temperatur von 7 °C entspricht dabei den Wassertemperaturen in einem milden Winter, eine Wassertemperatur von 11 °C ist im Frühling zu erwarten. Somit stellen die beiden getesteten Temperaturen keine Extrema für den untersuchten Entwicklungszeitraum der Bachforellen dar. Um zu ermitteln, inwiefern Veränderungen in der Temperatur, im Hinblick auf die globale Erwärmung, die Wirkung von Metformin bei den Bachforellen modulieren können, müssten deutlich stärkere Temperaturextreme gewählt werden. Der Vergleich der getesteten Temperaturen kann auch für die Posthornschncken durchgeführt werden. Hierfür wird das in dieser Arbeit vorgestellte Experiment bei 11 °C mit dem gleichzeitig durchgeführten Experiment bei 7°C verglichen. Es zeigte sich, dass die geringere Temperatur den Zustand der Mitteldarmdrüse der Schncken negativ beeinflusste (vgl. 7.1.). Zudem waren die Tiere, die bei 7 °C exponiert waren, leichter als die bei 11 °C gehaltenen Schncken. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Schncken sich bei 7 °C verstärkt in ihr Gehäuse zurückzogen und somit weniger Nahrung aufnahmen als die Tiere bei 11 °C. Auch Costil (1994) und Costil und Bailey (1998) wiesen nach, dass das Wachstum und die Aktivitäten von Posthornschncken, ebenso wie die Nahrungsaufnahme, mit abnehmender Temperatur reduziert werden. Da die Stressproteininduktion energieintensiv ist, könnte der verschlechterte Ernährungszustand der bei 7 °C exponierten Schncken eine Erklärung dafür sein, dass der Hsp70-Level der Schncken bei 7 °C, im Gegensatz zu 11 °C, nicht durch Metformin beeinflusst wurde. So zeigten auch Jenö und Brokordt (2014), dass thermale Veränderungen bei hungernden Stachelschncken (*Concholepas concholepas*) keinen Einfluss auf die Hsp70-Synthese nahmen. Mortalität und Lipidperoxid-Level der Posthornschncken wurden durch die niedrigere Temperatur von 7 °C jedoch nicht beeinträchtigt. Ein Vergleich hinsichtlich der Effekte der Temperatur auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms der bei 7 und 11 °C exponierten Schncken kann nicht durchgeführt werden, da die Analyse für die bei 11 °C exponierten Tiere noch nicht abgeschlossen ist.

**Insgesamt weist dieser Vergleich darauf hin, dass eine niedrigere Temperatur die Posthornschncken negativ beeinflussen kann, allerdings wurden keine modulierenden Effekte in Bezug auf die Metformin-Behandlung beobachtet. Bei den Bachforellenlarven waren durch die unterschiedlichen Temperaturen keine negativen Auswirkungen feststellbar.**

#### Guanylharnstoff:

Auch für die Testsubstanz Guanylharnstoff wurden Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Parallel zu dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experiment mit Bachforellenlarven bei 7 °C wurden die Fische auch bei 11 °C exponiert (vgl. 7.1.). Aufgrund der

Tatsache, dass durch das Transformationsprodukt weder im Experiment bei 7 °C noch bei 11 °C Effekte bei den Bachforellenlarven hervorgerufen werden konnten, ist eine Aussage über die Modulationswirkung der Temperatur nicht möglich. Wie bereits für die Metformin-Experimente mit Bachforellenlarven ausgeführt, ist jedoch davon auszugehen, dass die gewählten Temperaturen von 7 und 11 °C für Bachforellen keine Extrema darstellen, die als zusätzlicher Stressor zu Effekten führen würden.

Auch Posthornschncken wurden gegenüber Guanylharnstoff nicht nur bei 11 °C, sondern auch bei 7 °C exponiert (vgl. 7.1.). Dabei war die Mortalität in der höchsten getesteten Guanylharnstoffkonzentration (100 mg/L) bei 7 °C deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle und zum Experiment bei 11 °C. Auch bei der histopathologischen Auswertung des Hepatopankreas war in dieser Expositionsgruppe bei 7 °C der Gewebezustand einiger Tiere im Destruktionszustand, was vermuten lässt, dass die Tiere bereits moribund waren. Im Gegensatz dazu konnte in der gleichen Expositionsgruppe bei 11 °C lediglich eine Reaktion des Hepatopankreas-Gewebes festgestellt werden. Des Weiteren gab es im Experiment bei 7 °C einen signifikanten Unterschied im Gewicht zwischen der Kontrolle und den Schnecken, die gegenüber 10 und 100 mg/L Guanylharnstoff exponiert waren, wohingegen im Experiment bei 11 °C lediglich eine Tendenz zu einem reduzierten Gewicht festgemacht werden konnte. Die Tatsache, dass der Hsp70-Level lediglich in der Exposition bei 11 °C durch Guanylharnstoff beeinflusst wurde, nicht aber bei 7 °C, lässt sich vermutlich, wie bereits für die gegenüber Metformin exponierten Posthornschncken dargelegt, durch den schlechteren Ernährungszustand und die geringeren, zur Verfügung stehenden Energieressourcen der bei 7 °C gehaltenen Tiere erklären. Der Lipidperoxid-Gehalt wurde nicht durch die Temperatur verändert, hier konnte auch bei 7 °C kein Effekt durch das Transformationsprodukt ausgemacht werden. Die Wirkungen von Guanylharnstoff auf Mortalität, Gewicht und Hepatopankreas-Gewebe der Posthornschncken lassen sich somit nicht durch proteotoxische oder oxidative Prozesse erklären, sondern müssen vermutlich anderen Ursprungs sein.

**Insgesamt zeigte sich hier deutlich, dass die Temperatur nicht nur insgesamt den Gesundheitszustand der Schnecken negativ beeinflusste, sondern auch die Effekte des Transformationsproduktes in hohen Testkonzentrationen modulieren bzw. verstärken konnte. Bei den Bachforellen führten weder die Temperatur noch die Testsubstanz Guanylharnstoff zu negativen Effekten.**

### 7.3. Einbettung der Ergebnisse in den Kontext des Effect-Net-Projekts

Im Effect-Net-Projekt sollen die Wirkungen von Metformin und Guanylharnstoff von der Molekülebene bis zur Populationsebene untersucht werden. In zellfreien Systemen wurde zunächst die Bindungsaffinität der beiden Stoffe an verschiedene Rezeptoren analysiert, die im Glukose-Stoffwechsel beteiligt sind. Es zeigte sich, dass sowohl das Antidiabetikum als auch sein Transformationsprodukt keine Agonisten des Peroxisom-Proliferator-aktivierten  $\gamma$ -Rezeptors sind (Hohmann, 2018), der zuständig für eine Verbesserung des Glukosestoffwechsels bzw. eine erhöhte Insulinsensitivität ist. Auch die Bindung der beiden Stoffe an den Glucocorticoid-Rezeptor wurde untersucht, da dieser unter anderem eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel spielt und die Glukoneogenese sowie die Glykogen-Synthese beeinflussen kann. In den zellfreien Systemen konnte ebenfalls keine Affinität von Metformin oder Guanylharnstoff zum Glucocorticoid-Rezeptor festgestellt werden, was zuvor durchgeführte *in silico* Modellierungen bestätigten (Hohmann, 2018). Die beiden Substanzen zeigten bei der Betrachtung des Rezeptor-vermittelten Glucocorticoid-

Signalweges in Zellsystemen mit Hilfe des *Glucocorticoid responsive in vivo zebrafish luciferase activity*-Assays (zellbasierter Teil des Assays) im aktivierenden Assay keine Wirkung (Dickmeis, 2018). Im inhibierenden Assay konnte für das Pharmazeutikum und sein Transformationsprodukt jedoch eine Hemmung des Signalwegs festgestellt werden, wie auch für die anderen getesteten Substanzen des Effect-Net-Projekts. Dagegen führte Metformin in Zebrafischembryonen zu einer geringen Aktivierung des Glucocorticoid-Signalwegs, jedoch erst im hohen mg/L Bereich (Dickmeis, 2018). Guanylharnstoff beeinflusste diesen Signalweg in den Zebrafischembryonen nicht. Eine direkte Wirkweise von Metformin oder Guanylharnstoff über den Glucocorticoid-Signalweg ist dadurch eher unwahrscheinlich. Des Weiteren wurde mit einem Fischzell-Reporterassay der Einfluss der beiden Stoffe auf den Mondo-Signalweg untersucht, der eine wichtige Funktion in der Regulation verschiedener Kohlenhydrat-abhängiger Pfade spielt. Hierbei konnte in den Zellen ab 40 mg/L Metformin eine schwache Aktivierung beobachtet werden, Guanylharnstoff hatte keinen Effekt (Dickmeis, 2018). Zudem wurde die Expression verschiedener, am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligter Gene, wie z.B. AMPK oder die für die Glukoneogenese wichtige Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, in Zebrafischembryonen untersucht, die gegenüber Metformin oder Guanylharnstoff exponiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Expressionsrate dieser Gene erst bei hohen Konzentrationen von Metformin und Guanylharnstoff im g/L Bereich deutlich anstieg, jedoch war nicht bei allen untersuchten Genen ein klarer Trend zur Hoch- oder Runterregulation zu erkennen (Mieck, 2019).

Um festzustellen, ob Metformin zu einer wie von Cao et al. (2014) beschriebenen ATP-Produktion oder zu einer wie von El-Mir et al. (2000) beschriebenen ATP-Reduktion führen kann, wurde das Antidiabetikum zu Leberzellen von Regenbogenforellen (RTL-W1-Zellen) gegeben. Dort führte es bei Konzentrationen im µg/L-Bereich zu einer signifikanten Erhöhung der ATP-Produktion; bei höheren Metforminkonzentrationen im mg/L- bis g/L-Bereich nahm der ATP-Level wieder ab (Mieck, 2018a). Wie bereits in der Literatur postuliert, deuten diese Effekte des Pharmazeutikums darauf hin, dass Metformin keine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufweist (He und Wondisford, 2015; An und He, 2016). Bei 4 g/L Metformin konnte dann ein im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduzierter ATP-Level ermittelt werden. Dieser Effekt war wahrscheinlich durch zytotoxische Effekte des Antidiabetikums bedingt, wie mithilfe eines Neutralrottests belegt wurde (Mieck, 2017). Das Transformationsprodukt Guanylharnstoff führte bereits bei sehr geringen Konzentrationen im pg/L- bis µg/L-Bereich zu einer deutlichen Reduzierung des ATP-Levels (Mieck, 2018a). Dieser Effekt war aber auch im g/L-Bereich zu sehen, einzig eine Konzentration von 31,25 mg/L Guanylharnstoff erhöhte den ATP-Level signifikant. Eine Erklärung hierfür ist momentan noch nicht möglich (Mieck, 2018a). Im Neutralrottest wies das Transformationsprodukt eine noch geringere Zytotoxizität als seine Muttersubstanz auf.

Auf organismischer Ebene waren die Effekte von Metformin sehr divers. Die Tests mit Zebrafischembryonen nach OECD 236 (*Fish Embryo Acute Toxicity Test*) deuteten auf eine geringe Sensitivität der Fische gegenüber Metformin hin. Apikale Endpunkte wie Mortalität oder Körperlänge wurden erst bei Metforminkonzentrationen im hohen g/L-Bereich beeinflusst (Mieck, 2018b). Die im gleichen Konzentrationsbereich ebenfalls auftretenden Veränderungen im Gewebe von Gehirn, Leber und Darm lassen sich vermutlich auf unspezifische, toxische Effekte von Metformin in diesen sehr hohen Konzentrationsbereichen zurückführen (Mieck, 2018b). Die Untersuchungen mit den Bachforellen zeigten ebenfalls, dass Metformin keine letale oder embryotoxische Wirkung hat. Veränderungen im Gewicht, im Glykogengehalt der Leber oder im Darmmikrobiom traten jedoch schon bei sehr geringen Metforminkonzentrationen von 1 µg/L auf. Ein direkter Vergleich der beiden Fischarten ist jedoch schwierig, da die Testorganismen nicht über den gleichen

Entwicklungszeitraum exponiert waren. Die Zebrabärblingsembryonen waren vom befruchteten Ei bis zur freischwimmenden Larven 120 Stunden nach Befruchtung exponiert, die Bachforellenlarven dagegen vom Ei im Augenpunktstadium bis zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Aufzehrung des Dottersacks. Somit haben die Bachforellen schon extern Futter aufgenommen, die Zebrabärblingsembryonen zehrten jedoch noch von ihrem Dottersack. Des Weiteren war die Expositionsdauer, bedingt durch die Unterschiede in der Entwicklungszeit, bei den Zebrabärblingen mit fünf Tagen deutlich kürzer im Vergleich zu den Bachforellen mit 95 Tagen bei 11 °C bzw. 108 Tagen bei 7 °C. Die Posthornschncken waren ebenfalls durch Metformin beeinflusst. Die Veränderungen des intestinalen Mikrobioms der Schncken waren bereits bei umweltrelevanten Konzentrationen von Metformin zu sehen. Im Kontext des Effect-Net-Projekts zeigte sich somit, dass die Durchführung von längerfristigen Tests mit einheimischen Organismen eine sinnvolle Ergänzung zu den anderen im Effect-Net-Projekt erfolgten Untersuchungen ist, da *in vitro* Tests oder akute *in vivo* Test mit einem Modellorganismus wie dem Zebrabärbling mögliche subletale Effekte von Stoffen bei geringen Konzentrationen oftmals nicht abbilden können. Auch die Untersuchung des intestinalen Mikrobioms war ein wichtiger Bestandteil dieser Studie, um Hinweise auf mögliche sekundäre Effekte von Metformin auf die Gesundheit des Wirtsorganismus, beispielsweise auf das Immunsystem, zu erhalten. Auch wäre von Interesse, ob gegebenenfalls Änderungen des Mikrobioms mechanistisch mit dem Wirkmechanismus von Metformin zusammenhängen könnten. Zukünftig sollte die Analyse des Darmmikrobioms und des Immunsystems auch Eingang in die Bewertung und Regulierung von Chemikalien finden, da die direkten Effekte eines Stoffes auf den Fisch allein ohne die Berücksichtigung möglicher sekundärer Effekte auf den Wirt über das Darmmikrobiom ein unvollständiges Bild der ökotoxikologischen Wirkung der Chemikalie liefern würden (Brown-Peterson et al., 2015).

Für Guanylarnstoff waren auf organismischer Ebene bei den Zebrabärblingsembryonen keine letalen oder teratogenen Effekte bis zu einer Konzentration von 10 g/L festzustellen (Mieck, 2016). Auch bei den Bachforellen zeigten sich keine Effekte von Guanylarnstoff bis zu einer Konzentration von 1000 µg/L, weder auf die Mortalität und das Wachstum noch auf den Stresslevel, den Gewebezustand oder das Schwimmverhalten. Die Untersuchungen zu Effekten von Guanylarnstoff auf das Mikrobiom waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Lediglich bei den Posthornschncken konnten Guanylarnstoffkonzentrationen im umweltrelevanten Bereich Veränderungen im Stressproteinlevel auslösen. Effekte auf andere untersuchte Parameter wie Gewicht oder Gewebezustand des Hepatopankreas der Posthornschncken waren jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen zu sehen. In den *in vitro* Tests mit Forellen-Leberzellen führte das Transformationsprodukt bereits bei Konzentrationen im ng/L- bis µg/L-Bereich zur Reduktion des ATP-Levels (Mieck, 2018a), sodass die Zellsysteme in diesem Fall sehr sensitiv reagierten. Da so niedrige Konzentrationen in den Experimenten mit Organismen im Effect-Net-Projekt noch nicht getestet wurden, wäre dies der nächste Schritt, um zu bestimmen, ob Guanylarnstoff nicht nur in Zellen, sondern auch auf höherer biologischer Ebene Effekte in diesem Konzentrationsbereich hervorrufen kann. In diesem Zusammenhang ist auch die Studie von Ussery et al. (2019) zu nennen, da hier bereits eine Guanylarnstoffkonzentration von 1 ng/L eine Gewichtsreduktion von Medakalarven hervorrief.

#### 7.4. Ableitung von *Predicted no effect concentrations* (PNEC) für die beiden Stoffe

Die Umweltrisikobewertung von Seiten der pharmazeutischen Industrie unter Berücksichtigung der klassischen, ökotoxikologischen Tests kommt zu dem Schluss, dass Metformin und Guanylarnstoff kein Risiko für die aquatische Umwelt darstellen (Caldwell et al., 2019; Straub et al., 2019).

Für Metformin wurde aus einem *Early-life-stage*-Test mit Dickkopfelritzen von einer Konzentration von 10 mg/L, bei der noch kein Effekt auftrat (no observed effect concentration = NOEC), unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 10 eine PNEC von 1 mg/L abgeleitet (Caldwell et al., 2019). Ein Sicherheitsfaktor von 10 kann laut Humanarzneimittel-Richtlinie zur PNEC-Ableitung verwendet werden, wenn ökotoxikologische Tests für Algen, Invertebraten und Fische vorliegen, wie es bei Metformin der Fall ist (EMA, 2006). Für Guanylarnstoff wurde mittels der NOEC von 8 mg/L aus einer Reproduktionsstudie mit der Daphnienart *Ceriodaphnia dubia* und unter Verwendung eines Sicherheitsfaktors von 50 eine PNEC von 0,16 mg/L abgeleitet (Caldwell et al., 2019). Der Sicherheitsfaktor wurde in diesem Fall auf 50 erhöht, da die PNEC für Guanylarnstoff lediglich auf ökotoxikologischen Tests mit Invertebraten und Algen beruht. Diese PNECs liegen deutlich über den in der Umwelt berechneten und gemessenen Konzentrationen der beiden Stoffe, sodass hier nicht von einem Umweltrisiko ausgegangen werden kann.

Jedoch mutet die PNEC von Metformin, unter der Berücksichtigung anderer Studien (Niemuth et al., 2015; Ussery et al., 2018) und der vorliegenden Arbeit, sehr hoch an, da die genannten Studien bereits in weitaus geringeren Konzentrationen Effekte von Metformin nachweisen konnten. Die Ableitung einer PNEC auf Basis der vorliegenden Arbeit ist jedoch nicht möglich, da bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 µg/L im Experiment mit Bachforellen Veränderungen im Gewicht, Glykogengehalt und in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms auftraten und somit keine Konzentration getestet wurde, bei der noch keine Effekte zu sehen waren. Daher wäre es erforderlich, weitere Tests mit noch geringeren Konzentrationen von Metformin durchzuführen, um eine NOEC bestimmen zu können. Auch in der Studie von Niemuth et al. (2015) konnte keine PNEC abgeleitet werden, da lediglich eine einzelne Metforminkonzentration getestet wurde. In dem von Ussery et al. (2018) durchgeführten *Early-life-stage*-Test mit Medaka war die Konzentration, bei der gerade noch kein Effekt auftrat (NOEC), 1 µg/L Metformin, sodass mit Hilfe eines Sicherheitsfaktors von 10 eine PNEC von 0,1 µg/L abgeleitet werden kann. Damit steht fest, dass sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den Studien von Niemuth et al. (2015) und Ussery et al. (2018) Effekte durch Metformin bei umweltrelevanten Konzentrationen auftreten können und somit ein Umweltrisiko besteht. Des Weiteren geben auch die potentiell hormon-ähnlichen Wirkungen von Metformin zu denken. Mehrere Studien lieferten Hinweise, dass das Antidiabetikum zu endokrinen Effekten bei Fischen führt. Niemuth und Klaper (2015; 2018) zeigten, dass 40 µg/L Metformin in adulten, männlichen Dickkopfelritzen mehrere Gene des Hormonsystems beeinflusst, zu Intersexualität führt und die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigt. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch dadurch limitiert, dass lediglich eine einzige Konzentration getestet wurde, wie bereits beschrieben. Zudem wurde die histologische Untersuchung der Gewebeproben nicht verblindet durchgeführt, was zu einem *Observer-Bias* führen könnte. Trotz dieser Limitationen gibt es weitere Studien, die ebenfalls Hinweise auf eine mögliche endokrine Wirkung von Metformin liefern. Lee et al. (2019) stellten fest, dass Metformin in weiblichen Medaka die Expression von Vitellogenin und des Östrogenrezeptors ER-β verringern und Intersexualität auslösen kann. Niemuth et al. (2015) zeigten in ihrer Studie, dass auch die mRNA-Expression von Vitellogenin in männlichen, adulten Dickkopfelritzen durch Metformin erhöht wurde, wohingegen Crago et al. (2016) nur in juvenilen Dickkopfelritzen eine höhere Vitellogenin-Expression fand. Ussery et al. (2018) wiesen bei adulten, weiblichen Medaka eine Zunahme der Ketotestosteron-Expression nach, die Östradiol-Produktion

war jedoch nicht beeinflusst. Aufgrund der vielfältigen Ergebnisse der oben genannten Literatur wären weitere Studien zum Potential von Metformin als endokriner Disruptor notwendig. Auch für Guanylharnstoff kann auf Basis der vorliegenden Arbeit keine PNEC abgeleitet werden, wenn dazu die Effekte auf den Stressproteinlevel der Posthornschnellen herangezogen werden sollen, da diese bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,1 mg/L auftraten. Da in der klassischen Umweltrisikobewertung bei der Ableitung der PNEC der Schwerpunkt auf apikalen Endpunkten wie Mortalität, Wachstum und Reproduktion liegt, könnten auch die Effekte auf das Gewicht der Posthornschnellen zur PNEC-Ableitung herangezogen werden. Hierbei kann eine NOEC von 0,1 mg/L bestimmt werden, da die Effekte erst bei einer Konzentration von 10 mg/L auftraten (lowest observed effect concentration = LOEC). Damit lässt sich mit einem Sicherheitsfaktor von 10 und unter Verwendung der NOEC von 0,1 mg/L eine PNEC von 0,01 mg/L ableiten. Dabei ist jedoch zu beachten, dass NOEC und LOEC um einen Faktor 100 auseinanderliegen. Weitere Untersuchungen mit einem geringeren Abstand zwischen den Testkonzentrationen könnten helfen, die PNEC noch genauer zu bestimmen. In der Arbeit von Ussery et al. (2019) konnten im *Early-life-stage*-Test mit Medaka bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 ng/L Guanylharnstoff (LOEC) Effekte auf das Gewicht der Fischlarven festgestellt werden. Folglich übersteigen die in den Oberflächengewässern errechneten und gemessenen Guanylharnstoffkonzentrationen die Konzentrationen, bei denen Effekte durch das Transformationsprodukt auftreten können, deutlich, sodass auch im Fall von Guanylharnstoff von einem Risiko für die Umwelt ausgegangen werden muss. Des Weiteren liefert die Arbeit von Ussery (2018) Hinweise auf eine potentiell endokrine Wirkung von Guanylharnstoff, da die Östradiol-Produktion in der Leber von adulten, männlichen Medaka durch umweltrelevante Konzentrationen des Transformationsprodukts signifikant erhöht wurde. Um mögliche endokrine Effekte von Guanylharnstoff genauer abschätzen zu können, wären ebenfalls weitere Studien notwendig. Die untersuchten Endpunkte der vorliegenden Arbeit können in dieser Hinsicht keine weiteren Erkenntnisse bezüglich potentiell endokriner Eigenschaften der beiden Stoffe liefern.

### **7.5. Bedeutung der vorliegenden Arbeit für die Umweltrisikobewertung von Arzneimitteln**

Um zu einer abschließenden Umweltrisikobewertung von Metformin zu kommen, sind unbedingt detailliertere Kenntnisse über die Wirkungsweise erforderlich. Zum einen wirkt Metformin auf grundlegende Elemente im Metabolismus wie die AMP-Proteinkinase oder die Atmungskette, welche sehr viele verschiedene Prozesse triggern können. Zum anderen ist aus der Literatur eindeutig zu entnehmen, dass es keinen alleinigen Wirkweg des Antidiabetikums gibt, sondern vermutlich das komplexe Zusammenspiel mehrere Pfade zu den beschriebenen Effekten führt. Insbesondere mögliche endokrine Effekte auf das Hormonsystem und die Fortpflanzungsfähigkeit von Nichtzielorganismen, Wirkungen im Niedrigkonzentrationsbereich sowie die Betrachtung von sekundären Effekten über das intestinale Mikrobiom sollten bei der Bewertung des Antidiabetikums nicht außer Acht gelassen werden. Damit ist Metformin ein Stoff, der nicht gut in das klassische Schema der Risikobewertung von Arzneimitteln passt. Eine maßgeschneiderte Risikobewertung, wie es die „Guideline zur Risikobewertung von Arzneimitteln für den Humangebrauch“ für Stoffe mit bestimmten Eigenschaften – vor allem für potentiell endokrin aktive Substanzen – vorsieht (EMA, 2016; 2018), würde das Risiko von Metformin für die aquatische Umwelt sehr viel besser abbilden können.



Bei der Umweltrisikobewertung des Transformationsprodukts von Metformin ist zu bedenken, dass es generell wenige Informationen zu ökotoxikologischen Effekten von Transformationsprodukten gibt. Dabei bildet Guanylharnstoff keine Ausnahme. Aufgrund der Tatsache, dass Guanylharnstoff in deutlich höheren Konzentrationen in der aquatischen Umwelt vorliegt als Metformin, sollten unbedingt noch weitere Daten zu den ökotoxikologischen und endokrinen Wirkungen des Stoffs gesammelt werden, um zu einer umfassenden Bewertung zu kommen.

#### **7.6. Generelle Schlussfolgerungen aus der Arbeit**

Durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien konnten weitere Erkenntnisse zu Effekten des weltweit in hohem Maße konsumierten Antidiabetikums Metformin und seines Transformationsprodukts Guanylharnstoff auf einheimische aquatische Arten gewonnen werden. Gleichzeitig zeigte die vorliegende Arbeit auf, dass unbedingt weitere Studien mit Metformin und Guanylharnstoff notwendig sind, um ein vollständigeres Bild über die ökotoxikologische Relevanz dieser Stoffe zu erhalten. Dies ist aufgrund der hohen Prävalenz von Diabetes Typ 2 sowie des Einsatzes von Metformin auch bei der Behandlung anderer Krankheiten und dem damit verbundenen Anstieg der Konzentrationen des Medikaments und seines Transformationsprodukts in Oberflächengewässern ein spannendes und wichtiges Thema.

## 8. Referenzen

- ADA (2017). *Standards of Medical Care in Diabetes*. Diabetes Care.
- Agüera, A., Bueno, M.J.M. und Fernández-Alba, A.R. (2013). New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environ Sci Poll Res* 20:6, 3496-3515.
- Al-Khalili, L., Forsgren, M., Kannisto, K., Zierath, J., Lönnqvist, F. und Krook, A. (2005). Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* 48:6, 1173-1179.
- Alyakrinskaya, I. (2002). Physiological and biochemical adaptations to respiration of hemoglobin-containing hydrobionts. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 29:3, 268-283.
- An, H. und He, L. (2016). Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J. Endocrinol.* 228:3, R97-R106.
- Anderson, B.G. und Loewen, R.D. (1975). Renal morphology of freshwater trout. *Am. J. Anat.* 143:1, 93-113.
- Anisimov, V.N., Ukraintseva, S.V., Anikin, I.V., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Bertsein, L.M., et al. (2005). Effects of phentermine and phenformin on biomarkers of aging in rats. *Gerontology* 51:1, 19-28.
- Anurag, P. und Anuradha, C. (2002). Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes. Metab.* 4:1, 36-42.
- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S. und Praveena, S.M. (2014). Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 69, 104-119.
- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., et al. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35:4, 823-835.
- Bailey, C., Mynett, K. und Page, T. (1994). Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br. J. Pharmacol.* 112:2, 671-675.
- Bailey, C., Wilcock, C. und Scarpello, J. (2008). Metformin and the intestine. *Diabetologia* 51:8, 1552.
- Barton, B.A. und Schreck, C.B. (1987). Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 62:3-4, 299-310.
- Barton, M. (2007). *Bond's Biology of Fishes*. Belmont: Thomson Brooks.
- Benson, D.G. (1966). Azure a-Schiff, Alcian Blue, HIO<sub>4</sub>-Schiff, Naphthol Yellow S—A Sequential Staining Method for Paraffin Sections. *Stain Technol.* 41:3, 155-158.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. und Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22:1, 25-34.
- Bickley, L.K., van Aerle, R., Brown, A.R., Hargreaves, A., Huby, R., Cammack, V., et al. (2017). Bioavailability and kidney responses to diclofenac in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 51:3, 1764-1774.
- Boer, H. und Kits, K. (1990). Histochemical and ultrastructural study of the alimentary tract of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Morphol.* 205:1, 97-111.
- Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., et al. (2003). An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 52:5, 586-589.
- Bost, F., Sahra, I.B., Le Marchand-Brustel, Y. und Tanti, J.-F. (2012). Metformin and cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 24:1, 103-108.
- Braunbeck, T., Storch, V. und Bresch, H. (1990). Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19:3, 405-418.
- Bravo Portela, I., Martinez-Zorzano, V., Molist-Perez, I. und Molist Garcia, P. (2012). Ultrastructure and glycoconjugate pattern of the foot epithelium of the abalone *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758)(Gastropoda, Haliotidae). *The Scientific World Journal* 2012.

- Brown-Peterson, N.J., Krasnec, M., Takeshita, R., Ryan, C.N., Griffitt, K.J., Lay, C., et al. (2015). A multiple endpoint analysis of the effects of chronic exposure to sediment contaminated with Deepwater Horizon oil on juvenile Southern flounder and their associated microbiomes. *Aquat. Toxicol.* 165, 197-209.
- Buddington, R.K. und Krogdahl, Å. (2004). Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* 139:3, 261-271.
- Bueno, M.M., Gomez, M., Herrera, S., Hernando, M., Agüera, A. und Fernández-Alba, A.J.E.P. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution* 164, 267-273.
- Buđak, Ł., Łabuzek, K., Buđak, R.J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., et al. (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol. Rep.* 66:3, 418-429.
- Cairns, J., Heath, A.G. und Parker, B.C. (1975). The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47:1, 135-171.
- Cajaraville, M.P., Diez, G., Marigómez, J. und Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Dis. Aquat. Org* 9, 221-228.
- Caldwell, D.J., D'Aco, V., Davidson, T., Kappler, K., Murray-Smith, R.J., Owen, S.F., et al. (2019). Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanyurea: II. Occurrence in surface waters of Europe and the United States and derivation of predicted no-effect concentrations. *Chemosphere* 216, 855-865.
- Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith-Fickas, K., Xiong, L., Cole, R.N., et al. (2014). Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* 289:30, 20435-20446.
- Casey, D.C. (2006). *Effects of the synthetic oestrogen ethinylestradiol on the pond snail Lymnaea stagnalis*. [dissertation]. [Cardiff]: Cardiff University.
- Chaparro, O., Bahamondes-Rojas, I., Vergara, A. und Rivera, A. (1998). Histological characteristics of the foot and locomotory activity of *Crepidula dilatata* Lamarck (Gastropoda: Calyptraeidae) in relation to sex changes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223:1, 77-91.
- Chung, H., Oh, J., Yoon, S.H., Yu, K.-S., Cho, J.-Y. und Chung, J.-Y. (2018). A non-linear pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of metformin in healthy volunteers: An open-label, parallel group, randomized clinical study. *PLoS One* 13:1, e0191258.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142:3, 185-194.
- CompTox Chemical Dashboard [Online]. [Accessed 22.05.2019]. Available: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID3043811#properties>.
- CompTox Chemicals Dashboard [Online]. [Accessed 22.05.2019]. Available: <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID2023270#properties>.
- Costil, K. (1994). Influence of temperature on survival and growth of two freshwater planorbid species, *Planorbium corneum* (L.) and *Planorbis planorbis* (L.). *J. Biol. Chem.* 60:3, 223-235.
- Costil, K. und Bailey, S. (1998). Influence of water temperature on the activity of *Planorbium corneum* (L.)(Pulmonata, Planorbidae). *Malacologia* 39:1-2, 141-150.
- Costil, K. und Daguzan, J. (1995). Comparative life-cycle and growth of 2 freshwater gastropod species, *Planorbium corneum* (L.) and *Planorbis planorbis* (L.) *Malacologia* 37:1, 53-68.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S. und Schlenk, D. (2016). Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 185-190.
- Crowder, L.B., Rice, J.A., Miller, T.J. und Marschall, E.A. (1992). *Empirical and theoretical approaches to size-based interactions and recruitment variability in fishes*. New York: Chapman and Hall.

- Dai, J., Liu, M., Ai, Q., Lin, L., Wu, K., Deng, X., et al. (2014). Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem.-Biol. Interact.* 216, 34-42.
- Dallinger, R. und Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. and Physiol. part C: Comp. Pharmacol.* 79:1, 117-124.
- Davies, M.S. und Hawkins, S. (1998). "Mucus from marine molluscs", In: *Advances in marine biology.* (Academic Press), 1-71.
- De La Cuesta-Zuluaga, J., Mueller, N.T., Corrales-Agudelo, V., Velásquez-Mejía, E.P., Carmona, J.A., Abad, J.M., et al. (2017). Metformin is associated with higher relative abundance of mucin-degrading *Akkermansia muciniphila* and several short-chain fatty acid-producing microbiota in the gut. *Diabetes Care* 40:1, 54-62.
- de Vos, W.M. und de Vos, E.A. (2012). Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr. Rev.* 70:suppl\_1, S45-S56.
- Dehkordi, A.H., Abbaszadeh, A., Mir, S. und Hasanvand, A. (2018). Metformin and its anti-inflammatory and anti-oxidative effects; new concepts. *Journal of Renal Injury Prevention* 8:1, 54-61.
- Detaille, D., Wiernsperger, N. und Devos, P. (1999). Cellular and molecular mechanisms involved in insulin's potentiation of glycogen synthase activity by metformin. *Biochem. Pharmacol.* 58:9, 1475-1486.
- Dickmeis, T. (2018). *Effect-Net Zwischenbericht 2018 im Rahmen des Förderprogramms "Forschernetzwerke Wasserforschung Baden-Württemberg"*.
- Dittbrenner, N., Lazzara, R., Köhler, H.-R., Mazzia, C., Capowiez, Y. und Triebkorn, R. (2008). Heat tolerance in Mediterranean land snails: histopathology after exposure to different temperature regimes. *J. Molluscan Stud.* 75:1, 9-18.
- Duca, F.A., Côté, C.D., Rasmussen, B.A., Zadeh-Tahmasebi, M., Rutter, G.A., Filippi, B.M., et al. (2015). Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat. Med.* 21:5, 506.
- Dußling, U. und Berg, R. (2001). *Fische in Baden-Württemberg*. Stuttgart: Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg.
- Ebberink, R., Smit, A. und Van Minnen, J. (1989). The insulin family: evolution of structure and function in vertebrates and invertebrates. *The Biological Bulletin* 177:2, 176-182.
- Ebert, I., Amato, R., Hein, A. und Konradi, S. (2014). "Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen", (ed.) Umweltbundesamt. (Dessau-Roßlau).
- El-Mir, M.-Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M. und Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275:1, 223-228.
- EMA (2006). *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*. London: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use.
- EMA (2011). "Assessment report - Jentaduo". (London: European Medicines Agency).
- EMA (2016). *Questions and answers on 'Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use'*. London: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human use.
- EMA (2018). *Draft - Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*. London: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use.
- Engelhardt, W. und Martin, P. (2008). *Was lebt in Tümpel, Bach und Weiher?: Pflanzen und Tiere unserer Gewässer;[über 400 Arten]*. Kosmos.
- Escher, B.I. und Fenner, K. (2011). Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environ. Sci. Technol.* 45:9, 3835-3847.
- EU (2000). *Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates*.
- EU (2006). *Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals* [Online]. [Accessed 19.09.2018]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/>

LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:328:0014:0056:en:PDF%20.

EU (2013). *Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates.*

EU (2018). *Durchführungsbeschluss 2018/840 der Kommission zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates.*

Fatta-Kassinou, D., Vasquez, M. und Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes—degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere* 85:5, 693-709.

Faure, M., Bertoldo, M.J., Khoueiry, R., Bongrani, A., Brion, F., Giulivi, C., et al. (2018). Metformin in reproductive biology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9.

Fischer, K., Fries, E., Körner, W., Schmalz, C. und Zwiener, C. (2012). New developments in the trace analysis of organic water pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1, 11-28.

fishbase.org. [Accessed 31.01.2019]. <https://www.fishbase.de/summary/Salmo-trutta.html>.

Ford, R.J., Fullerton, M.D., Pinkosky, S.L., Day, E.A., Scott, J.W., Oakhill, J.S., et al. (2015). Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *Biochem. J.* 468:1, 125-132.

Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. und Viollet, B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 20:6, 953-966.

Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., et al. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* 120:7, 2355-2369.

Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., et al. (2015). Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528:7581, 262-266.

Franchini, A. und Ottaviani, E. (1992). Intestinal cell types in the freshwater snail *Planorbarius corneus*: histochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations. *Tissue Cell* 24:3, 387-396.

Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22:4, 241-253.

Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., et al. (2013). Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat. Med.* 19:12, 1649.

Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P. und Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J. Environ. Monit.* 13:4, 915-932.

Genten, F. (2009). *Atlas of fish histology*. CRC Press.

Giannarelli, R., Aragona, M., Coppelli, A. und Del Prato, S. (2003). Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* 29:4, 6S28-26S35.

Glöer, P. (2002). Die Süßwassergastropoden Nord-und Mitteleuropas—Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands, 73. Teil. *ConchBooks. Hackenheim*.

Godoy, A.A., Domingues, I., Nogueira, A.J.A. und Kummrow, F. (2018). Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environ. Pollut.* 243, 534-542.

Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J., et al. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* 50:2, 81-98.

Grosell, M., Farrell, A.P. und Brauner, C.J. (2010). *Fish physiology: the multifunctional gut of fish*. Academic Press.

Hamed, S.S., Abdelmeguid, N.E., Essawy, A.E., Radwan, M.A. und Hegazy, A.E. (2007). Histological and ultrastructural changes induced by two carbamate molluscicides on the digestive gland of *Eobania vermiculata*. *J. Biol. Sci.* 7, 1017-1037.

- Hampton, J.A., Clark Lantz, R., Goldblatt, P.J., Lauren, D.J. und Hinton, D.E. (1988). Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: II. The biliary system. *The Anatomical Record* 221:2, 619-634.
- Hampton, J.A., McCuskey, P.A., McCuskey, R.S. und Hinton, D.E. (1985). Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *Anat. Rec.* 213:2, 166-175.
- Hari, R.E., Livingstone, D.M., Siber, R., Burkhardt-Holm, P. und Guettinger, H. (2006). Consequences of climatic change for water temperature and brown trout populations in Alpine rivers and streams. *Global Change Biol.* 12:1, 10-26.
- Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., et al. (2010). Use of cells expressing  $\gamma$  subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11:6, 554-565.
- He, L., Sabet, A., Djedjos, S., Miller, R., Sun, X., Hussain, M.A., et al. (2009). Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell* 137:4, 635-646.
- He, L. und Wondisford, F.E. (2015). Metformin action: concentrations matter. *Cell metabolism* 21:2, 159-162.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G. und Storey, K.B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biol. Med.* 19:3, 271-280.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R. und Barceló, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69:2, 334-342.
- Hickman, C. und Trump, B. (1969). "The kidney", In: *Fish Physiology*, eds. W. Hoar & D. Randall. (New York: Academic Press).
- Hohmann, S. (2018). *Effect-Net Zwischenbericht 2018 im Rahmen des Förderprogramms "Forschernetzwerke Wasserforschung Baden-Württemberg"*. AG Brenner-Weiß.
- Holst, J.J. (1994). Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* 107:6, 1848-1855.
- Huggett, D., Cook, J., Ericson, J. und Williams, R. (2003). A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 9:7, 1789-1799.
- IDF (2017). "IDF Diabetes Atlas", (ed.) I.D. Federation. (Brussels, Belgium).
- IMS Health (2019), [Dataset].
- Iwai, T. (1968). Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 91:3, 366-379.
- Janssens, Y., Nielandt, J., Bronselaer, A., Debunne, N., Verbeke, F., Wynendaele, E., et al. (2018). Disbiome database: linking the microbiome to disease. *BMC Microbiol.* 18:1, 50.
- Jeno, K. und Brokordt, K. (2014). Nutritional status affects the capacity of the snail *Concholepas concholepas* to synthesize Hsp70 when exposed to stressors associated with tidal regimes in the intertidal zone. *Mar. Biol.* 161:5, 1039-1049.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., et al. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 65:2, 205-220.
- Johnson, L.L., Stehr, C.M., Olson, O.P., Myers, M.S., Pierce, S.M., Wigren, C.A., et al. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environ. Sci. Technol.* 27:13, 2759-2771.
- Jung, G.K., Park, J.J., Lee, J.W. und Lee, J.S. (2006). Microscopic anatomy of foot of the spiny top shell, *Batillus cornutus* (lightfoot, 1786)(Gastropoda: Turbinidae). *J. Shellfish Res.* 25:3, 1071-1078.
- Kasznicki, J., Sliwinska, A. und Drzewoski, J. (2014). Metformin in cancer prevention and therapy. *Annals of translational medicine* 2:6.

- Khojasteh, S.B., Sheikhzadeh, F., Mohammadnejad, D. und Azami, A. (2009). Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Applied Sciences Journal* 6:11, 1525-1531.
- Killeen, J., McLay, H. und Johnston, I. (1999). Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons. *J. Fish Biol.* 55:2, 382-404.
- Kim, J., Park, J., Kim, P.-G., Lee, C., Choi, K. und Choi, K. (2010). Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 19:4, 662-669.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Dempson, J., Jonsson, B., Jonsson, N., O'connell, M., et al. (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecol. Freshwat. Fish* 12:1, 1-59.
- Köhler, H.R. und Triebkorn, R. (2004). Stress im Boden: Früherkennung ökotoxikologischer Effekte durch Biomarker. *Biologie in unserer Zeit* 34:4, 240-248.
- Koops, M.A., Hutchings, J.A. und McIntyre, T.M. (2004). Testing hypotheses about fecundity, body size and maternal condition in fishes. *Fish Fish.* 5:2, 120-130.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A. und Albanis, T.A. (2015). Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea in Greek wastewaters. *Water Res.* 70, 436-448.
- Kotrschal, K., Van Staaden, M. und Huber, R. (1998). Fish brains: Evolution and environmental relationships. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8:4, 373-408.
- Lee, H. und Ko, G. (2014). Effect of metformin on metabolic improvement and the gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM. 01357-01314.
- Lee, J., Chan, S.L., Lu, C., Lane, M.A. und Mattson, M.P. (2002). Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *Exp. Neurol.* 175:1, 161-167.
- Lee, J.W., Shin, Y.-J., Kim, H., Kim, H., Kim, J., Min, S.-A., et al. (2019). Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. *J. Hazard. Mater.* 367, 171-181.
- Lobo-da-Cunha, A. (2000). The digestive cells of the hepatopancreas in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): ultrastructural and cytochemical study. *Tissue Cell* 32:1, 49-57.
- Lobo-da-Cunha, A. und Batista-Pinto, C. (2007). Ultrastructural, histochemical and cytochemical characterization of intestinal epithelial cells in *Aplysia depilans* (Gastropoda, Opisthobranchia). *Acta Zoologica* 88:3, 211-221.
- Loos, R., Marinov, D., Sanseverino, I., Napierska, D. und Lettieri, T. (2018). Review of the 1 st Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2 nd Watch List. *Publ. Off. Eur. Union*, 1-267.
- Lord, J.M., Flight, I.H. und Norman, R.J. (2003). Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327:7421, 951.
- Lydy, M.J., Belden, J. und Ternes, M. (1999). Effects of temperature on the toxicity of M-parathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37:4, 542-547.
- MacCrimmon, H.R., Marshall, T.L. und Gots, B.L. (1970). World distribution of brown trout, *Salmo trutta*: further observations. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 27:4, 811-818.
- MacLaren, R.D., Wisniewski, K. und MacLaren, C. (2018). Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *PLoS One* 13:5, e0197259.
- Malin, S.K. und Kashyap, S.R. (2014). Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 21:5, 323-329.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D., Hirschfield, G.M., Hold, G., et al. (2015). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 2015-309990.

- Martin-Castillo, B., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C. und Menendez, J.A. (2010). Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell cycle* 9:6, 1057-1064.
- Mieck, S. (2016). *Effect-Net Zwischenbericht 2016 im Rahmen des Förderprogramms "Forschernetzwerke Wasserforschung Baden-Württemberg"*. AG Braunbeck.
- Mieck, S. (2017). *Effect-Net Zwischenbericht 2017 im Rahmen des Förderprogramms "Forschernetzwerke Wasserforschung Baden-Württemberg"*. AG Braunbeck.
- Mieck, S. (2018a). *Effect-Net Zwischenbericht 2018 im Rahmen des Förderprogramms "Forschernetzwerke Wasserforschung Baden-Württemberg"*. AG Braunbeck.
- Mieck, S. (2018b). *Poster "Der toxische Effekt von Metformin"*. Stuttgart: Statuskolloquium Wassernetzwerk
- Mieck, S. (2019). *Präsentation*. Heidelberg: 10.Effect-Net Treffen.
- Mihaylova, M.M. und Shaw, R.J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13:9, 1016.
- Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B. und Birnbaum, M.J. (2013). Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494:7436, 256.
- Mithieux, G., Guignot, L., Bordet, J.-C. und Wiernsperger, N.F. (2002). Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 51:1, 139-143.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L., Pinho, G.L.L., Vinagre, T., Faleiros, M., Alciati, J.C., et al. (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:2, 177-183.
- Murtha, J.M. und Keller, E.T. (2003). Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 38:6, 683-691.
- Näslund, J., Fick, J., Asker, N., Ekman, E., Larsson, D.J. und Norrgren, L. (2017). Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. *Aquat. Toxicol.* 189, 87-96.
- Neamtu, M., Grandjean, D., Sienkiewicz, A., Le Faucheur, S., Slaveykova, V., Colmenares, J.J.V., et al. (2014). Degradation of eight relevant micropollutants in different water matrices by neutral photo-Fenton process under UV254 and simulated solar light irradiation—A comparative study. *Applied Catalysis B: Environmental* 158, 30-37.
- Niemuth, N.J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R. und Klaper, R.D. (2015). Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34:2, 291-296.
- Niemuth, N.J. und Klaper, R.D. (2015). Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135, 38-45.
- Niemuth, N.J. und Klaper, R.D. (2018). Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquat. Toxicol.* 195, 33-40.
- OECD (2002). *OECD Guideline for the testing of chemicals (308) Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems* [Online]. [Accessed 08.02.2019]. Available: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-308-aerobic-and-anaerobic-transformation-in-aquatic-sediment-systems\\_9789264070523-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-308-aerobic-and-anaerobic-transformation-in-aquatic-sediment-systems_9789264070523-en).
- OGewV (2016). "Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung - OGewV)".
- Oosterhuis, M., Sacher, F. und ter Laak, T.L. (2013). Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci. Total Environ.* 442, 380-388.
- Osterauer, R., Köhler, H.-R. und Triebkorn, R. (2010). Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl<sub>2</sub>. *Aquat. Toxicol.* 99:1, 100-107.



- Owen, G. (1970). The fine structure of the digestive tubules of the marine bivalve *Cardium edule*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 258:822, 245-260.
- Palace, V.P., Evans, R.E., Wautier, K., Baron, C., Vandenbyllardt, L., Vandersteen, W., et al. (2002). Induction of vitellogenin and histological effects in wild fathead minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethynylestradiol. *Water Qual. Res. J. Can.* 37:3, 637-650.
- Palace, V.P., Wautier, K.G., Evans, R.E., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Chalanchuk, S.M., et al. (2006). Biochemical and histopathological effects in pearl dace (*Margariscus margarita*) chronically exposed to a synthetic estrogen in a whole lake experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 25:4, 1114-1125.
- Pentikäinen, P., Neuvonen, P. und Penttilä, A. (1979). Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16:3, 195-202.
- Pernicova, I. und Korbonits, M. (2014). Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology* 10:3, 143.
- Piro, S., Rabuazzo, A., Renis, M. und Purrello, F. (2012). Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *J. Endocrinol. Invest.* 35:5, 504-510.
- Polakof, S., Panserat, S., Craig, P.M., Martyres, D.J., Plagnes-Juan, E., Savari, S., et al. (2011). The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout. *PLoS One* 6:5, e20228.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L. und Moon, T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol [B]* 182:8, 1015-1045.
- Pollak, M. (2017). The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia* 60:9, 1662-1667.
- Porcel, D., Bueno, J. und Almendros, A. (1996). Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 115:1, 11-17.
- Proctor, W.R., Bourdet, D.L. und Thakker, D.R. (2008). Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab. Disposition* 36:8, 1650-1658.
- Purrello, F., Gullo, D., Buscema, M., Pezzino, V., Vigner, R. und Goldfine, I. (1988). Metformin enhances certain insulin actions in cultured rat hepatoma cells. *Diabetologia* 31:6, 385-389.
- Radziuk, J., Bailey, C.J., Wiernsperger, N.F. und Yudkin, J.S. (2003). Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine Metabolic Disorders* 3:2, 151-169.
- Reddi, A. und Jyothirmayi, G. (1992). Effect of chronic metformin treatment on hepatic and muscle glycogen metabolism in KK mice. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 47:2, 124-132.
- Regoli, F. und Giuliani, M.E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106-117.
- Rena, G., Hardie, D.G. und Pearson, E.R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60:9, 1577-1585.
- Rodrigues, E.d.L. und Fanta, E. (1998). Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. *Rev. Bras. Zool.* 15:2, 441-450.
- Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M.J.L. und Barceló, D. (2004). Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1045:1-2, 85-92.
- Rogall, E.T. (2019). *Einfluss von Wohlstandschemikalien auf das Mikrobiom von Fischen mit Auswirkungen auf deren Vitalität*. Heidelberg: 10. Effect-Net-Treffen.
- Rogall, E.T., Jacob, S., Triebkorn, R. und Schwartz, T. (2019). The Impact of the Anti-diabetic Drug Metformin on the Intestinal Microbiome of Larval Brown Trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Microbiome*, submitted.

- Rossetti, L., DeFronzo, R.A., Gherzi, R., Stein, P., Andraghetti, G., Falzetti, G., et al. (1990). Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. *Metabolism* 39:4, 425-435.
- Röszer, T. (2014). The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res.* 358:3, 685-695.
- Sahra, I.B., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.-F. und Bost, F. (2010). Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Molecular cancer therapeutics* 9:5, 1092-1099.
- Sanders, B.M. (1993). Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23:1, 49-75.
- Scheen, A.J. (1996). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* 30:5, 359-371.
- Scheurer, M., Brauch, H.-J. und Lange, F.T.J.A. (2009a). Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem.* 394:6, 1585-1594.
- Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H.-J., Ruck, W. und Sacher, F. (2012). Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res.* 46:15, 4790-4802.
- Scheurer, M., Sacher, F. und Brauch, H.-J. (2009b). Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *J. Environ. Monit.* 11:9, 1608-1613.
- Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. und Aigner, T. (2010). Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* 18, S113-S116.
- Schramm, M., Müller, E. und Triebkorn, R. (1998). Brown trout *Salmo trutta* f. *fario* liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. *Biomarkers* 3:2, 93-108.
- Schreiber, R., Gündel, U., Franz, S., Küster, A., Rechenberg, B. und Altenburger, R. (2011). Using the fish plasma model for comparative hazard identification for pharmaceuticals in the environment by extrapolation from human therapeutic data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 61:3, 261-275.
- Schwaiger, J. (2001). Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress Recovery* 8:3-4, 231-240.
- Schwaiger, J., Bucher, F., Ferling, H., Kalbfus, W. und Negele, R.-D. (1992). A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 23:1, 31-48.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. und Negele, R. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68:2, 141-150.
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R. und Triebkorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Sci. Total Environ.* 607, 1026-1036.
- Scott, G.R. und Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68:4, 369-392.
- Seifarth, C., Schehler, B. und Schneider, H. (2013). Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp. Clin. Endocrinol.* 121:01, 27-31.
- Shin, N.-R., Lee, J.-C., Lee, H.-Y., Kim, M.-S., Whon, T.W., Lee, M.-S., et al. (2014). An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 63:5, 727-735.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration* 82:2, 291-295.
- Sigma-Aldrich (2015). *Glycogen Assay Kit - Technical Bulletin* [Online]. [Accessed 05.03.2019]. St. Louis, MO, USA. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak016bul.pdf>.

- Soldatnko, E. und Petrov, A. (2013). Mating and morphology of the copulatory apparatus in *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758)(Gastropoda: Pulmonata). *ZOOSYSTEMATICA ROSSICA* 22:2, 153-164.
- Straub, J.O., Caldwell, D.J., Davidson, T., D'Aco, V., Kappler, K., Robinson, P.F., et al. (2019). Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanylurea. I. Environmental fate. *Chemosphere* 216, 844-854.
- Sumner, A. (1965). The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*. *J. Cell Sci.* 3:74, 173-192.
- Takashima, F. und Hibiya, T. (1995). *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. Tokyo: Kodansha LTD.
- Tampi, P. (1959). On the renal unit in some common teleosts. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B* 50:2, 88-104.
- Taylor, D. und Senac, T. (2014). Human pharmaceutical products in the environment–The “problem” in perspective. *Chemosphere* 115, 95-99.
- Tisler, S. und Zwiener, C. (2018). Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Sci. Total Environ.* 628, 1121-1129.
- Tisler, S. und Zwiener, C. (2019). Aerobic and anaerobic formation and biodegradation of guanyl urea and other transformation products of metformin. *Water Res.* 149, 130-135.
- Tonar, Z. und Markoš, A. (2004). Microscopy and morphometry of integument of the foot of pulmonate gastropods *Arion rufus* and *Helix pomatia*. *Acta Veterinaria Brunensis* 73:1, 3-8.
- Trautwein, C., Berset, J.-D., Wolschke, H. und Kümmerer, K. (2014). Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environ. Int.* 70, 203-212.
- Trautwein, C. und Kümmerer, K. (2011). Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* 85:5, 765-773.
- Triebskorn, R. (1989). Ultrastructural changes in the digestive tract of *Deroceras reticulatum* (Müller) induced by a carbamate molluscicides and by metaldehyde. *Malacologia* 31:1, 141-156.
- Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R. und Schwaiger, J. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 68:2, 151-166.
- Triebskorn, R., Casper, H., Scheil, V. und Schwaiger, J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Anal. Bioanal. Chem.* 387:4, 1405-1416.
- Triebskorn, R., Christensen, K. und Heim, I. (1998). Effects of orally and dermally applied metaldehyde on mucus cells of slugs (*Deroceras reticulatum*) depending on temperature and duration of exposure. *J. Molluscan Stud.* 64:4, 467-487.
- Triebskorn, R. und Ebert, D. (1989). "The importance of mucus production in slugs' reaction to molluscicides and the impact of molluscicides on the mucus producing system", In: *Slugs and snails in world agriculture*, ed. I.F. Henderson. (British Crop Protection Council Monograph).
- Triebskorn, R., Henderson, I., Martin, A. und Köhler, H. (1996). "Slugs as target or non-target organisms for environmental chemicals", In: *Slug and Snail Pests in Agriculture*, ed. I.F. Henderson. (Brit. Crop. Prot. Counc.).
- Triebskorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M. und Müller, E.F. (1997). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6:1, 57-73.
- Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., et al. (2008). Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environ. Monit. Assess.* 141:1-3, 177-188.

- Ussery, E. (2018). *The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanylurea, on Japanese medaka (Oryzias latipes)*. [dissertation]. [Ontario]: University of Ontario.
- Ussery, E., Bridges, K.N., Pandelides, Z., Kirkwood, A.E., Bonetta, D., Venables, B.J., et al. (2018). Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 205, 58-65.
- Ussery, E., Bridges, K.N., Pandelides, Z., Kirkwood, A.E., Guchardi, J. und Holdway, D. (2019). Developmental and full-life cycle exposures to guanylurea, and guanylurea-metformin mixtures results in adverse effects on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 38:5, 1023-1028.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. und Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:2, 178-189.
- Vieira, L., Gravato, C., Soares, A., Morgado, F. und Guilhermino, L. (2009). Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76:10, 1416-1427.
- Vilcinskas, A. (2004). *Fische - Mitteleuropäische Süßwasserarten und Meeresfische der Nord- und Ostsee*. München: BLV Verlagsgesellschaft mbH.
- WFD (2011a). "Alpha-ethinylestradiol EQS dossier". (Working Group E of the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive: Sub-Group on Review of the Priority Substances List).
- WFD (2011b). "Diclofenac EQS dossier". (Working Group E of the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive: Sub-Group on Review of the Priority Substances List).
- WHO (2014). "Global status report on noncommunicable diseases 2014". (World Health Organization).
- WHO (2018). *ATC/DDD Index* [Online]. [Accessed 21.05.2019]. Available: [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=A10BA02](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=A10BA02).
- Wiernsperger, N. (1996). "Preclinical pharmacology of biguanides", In: *Oral antidiabetics*. Springer, 305-358.
- Wilcock, C. und Bailey, C. (1994). Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* 24:1, 49-57.
- Winston, G.W. und Di Giulio, R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19:2, 137-161.
- Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M.T., Caesar, R., Mannerås-Holm, L., et al. (2017). Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat. Med.*
- Wu, H., Tremaroli, V. und Bäckhed, F. (2015). Linking microbiota to human diseases: a systems biology perspective. *Trends Endocrinol. Metab.* 26:12, 758-770.
- Xu, Z., Liu, J., Wu, X., Huang, B. und Pan, X. (2017). Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: a review. *Environ. Res.* 155, 199-207.
- Yamabayashi, S. (1987). Periodic acid—Schiff—Alcian Blue: A method for the differential staining of glycoproteins. *The Histochemical Journal* 19:10-11, 565-571.
- Yamamoto, N. (2009). Studies on the teleost brain morphology in search of the origin of cognition. *J. Psych. Res.* 51:3, 154-167.
- Yildiz, G., Demiryürek, A.T., Sahin-Erdemli, I. und Kanzik, I. (1998). Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br. J. Pharmacol.* 124:5, 905-910.
- Zaldibar, B., Cancio, I. und Marigomez, I. (2007a). Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* 81:2, 183-196.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Soto, M. und Marigómez, I. (2007b). Digestive cell turnover in digestive gland epithelium of slugs experimentally exposed to a mixture of cadmium and kerosene. *Chemosphere* 70:1, 144-154.

- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation* 108:8, 1167-1174.
- Zwiener, C. und Frimmel, F.H. (2004). LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology—a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 378:4, 862-874.

## **Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten**

### **Publikation 1: Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*)**

S. Jacob, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Zwiener, R. Triebkorn

Frontiers in Environmental Science 2019, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00045>

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 90 % der Versuchsdurchführung
- 40 % der histologischen und biochemischen Analysen
- 90 % der statistischen Auswertung
- 80 % des finalen Manuskripts

### **Publikation 2: Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?**

S. Jacob, A. Dötsch, S. Knoll, H.-R. Köhler, E. Rogall, D. Stoll, S. Tisler, C. Huhn, T. Schwartz, C. Zwiener, R. Triebkorn

Environmental Science Europe 30 (48) 2018, doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0179-4>

- 80 % der Planung und des experimentellen Designs
- 90 % der Versuchsdurchführung
- 100 % der histologischen und biochemischen Analysen
- 75 % der Verhaltensanalysen
- 90 % der statistischen Auswertung
- 80 % des finalen Manuskripts

### **Publikation 3: Does guanylurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, affect the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?**

S. Jacob, S. Knoll, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Huhn, C. Zwiener, R. Triebkorn

PeerJ 7:e7289 2019, doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.7289>

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 90 % der Versuchsdurchführung
- 40 % der biochemischen Analysen
- 100 % der histologischen Analysen
- 100 % der Verhaltensanalysen
- 90 % der statistischen Auswertung
- 80 % des finalen Manuskripts

Rita Triebkorn formulierte den Projektantrag, betreute alle durchgeführten Arbeiten und überarbeitete die Erstversionen der Publikationen. Heinz R. Köhler betreute die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Analysen und half ebenfalls bei der Fertigstellung der Publikationen. Selina Tisler führte unter Betreuung von Christian Zwiener die chemische Analytik zur Bestimmung der Metformin- und von Guanylharnstoffkonzentrationen im Testmedium durch. Sarah Knoll führte unter Betreuung von Carolin Huhn die chemische Analytik zur Bestimmung der Metformin- und von Guanylharnstoffkonzentrationen im Gewebe der Bachforellen durch. Eike Rogall führte unter Betreuung von Thomas Schwartz die Analysen des Darmmikrobioms der gegenüber Metformin exponierten Bachforellen durch. Andreas Dötsch und Dominic Stoll halfen bei der Analyse des Darmmikrobioms. Im Rahmen ihrer Abschlussarbeit führten Joanna Probst, Jochen Schwantzer und Melanie Biecker große Teile der histologischen und biochemischen Analysen der Proben aus den Experimenten mit den Posthornschnucken durch. Eileen Pfitzer analysierte den Lipidperoxid-Level im Experiment mit den gegenüber Guanylharnstoff exponierten larvalen Bachforellen. Lone Kundy analysierte den Hsp70-Level im Experiment mit den gegenüber Metformin exponierten juvenilen Bachforellen.

## Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten

### Kapitel I: Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanyurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*)

Stefanie Jacob<sup>1\*</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Selina Tisler<sup>2</sup>, Christian Zwiener<sup>2</sup>, Rita Triebkorn<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Animal Physiological Ecology, Institute for Evolution and Ecology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Environmental Analytical Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

<sup>3</sup>Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Rottenburg, Germany.

\*Correspondence: Stefanie Jacob

stefanie.jacob@uni-tuebingen.de

#### Abstract

Pharmaceuticals can enter surface waters via sewage treatment plants. In the environment, the substances and their transformation products, formed by the degradation of the parent compounds, can affect aquatic wildlife, including freshwater invertebrates. However, research on pharmaceutical-induced effects in wild freshwater organisms other than fish is still scarce. In our study, we investigated the impact of the highly consumed antidiabetic drug metformin and its main transformation product, guanyurea, on the health of a freshwater gastropod – the big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*) by analysing its biochemical and cellular stress responses and apical parameters.

The snails were exposed to different concentrations of the drug (0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L) and its transformation product (0, 0.1, 10, 100 mg/L). The examined parameters were mortality, weight, tissue integrity of the hepatopancreas, and the levels of stress proteins and lipid peroxides. Mortality and the levels of stress proteins and lipid peroxides were not influenced by the two substances. In response to the highest concentrations of both chemicals, the weight of the snails was slightly but not significantly reduced. The histopathological investigation of the hepatopancreas revealed a significant effect of guanyurea at a concentration of 100 mg/L with an increased number of symptoms of cellular responses in the tissue (e.g. dilated lumen, disturbed compartmentation of the digestive cells, nucleus deformation, hyperplasia, and hypertrophy of crypt cells). For the parent compound, a similar trend was also observed for the highest concentration.

Overall, the observed effects did not occur at environmentally relevant concentrations, but at concentrations which were 10,000 times higher than these. Thus, the results did not give rise to a major concern that metformin and guanyurea could pose a risk to the big ramshorn snail in the environment.

**Keywords** gastropod, pharmaceutical, transformation product, histology, stress proteins, lipid peroxides



## Introduction

The antidiabetic drug metformin, which is used to treat type 2 diabetes, is one of most prescribed pharmaceuticals worldwide (Gong et al., 2012; Scheurer et al., 2012). Its pharmaceutical effect is related to a reduction in blood glucose level due to a reduction in gluconeogenesis and glycogenolysis, and an increase in glucose uptake into cells (Hundal et al., 1992; Wiernsperger and Bailey, 1999; Natali and Ferrannini, 2006; An and He, 2016). The hepatic metabolism of metformin is negligible (Scheen, 1996) and approximately 52 % of the drug is excreted in the urine after 48 h in humans (Pentikäinen et al., 1979). Consequently, it can enter sewage treatment plants at concentrations of 101–129 µg/L (Scheurer et al., 2009). During wastewater treatment, approximately 90 % of the drug is removed from the treated sewage and microbially transformed into guanylurea (Scheurer et al., 2012; Oosterhuis et al., 2013; Tisler and Zwiener, 2018; 2019). In surface waters, Scheurer et al. (2012) measured metformin and its transformation product at concentrations of up to 3 µg/L and up to 28 µg/L, respectively. Several studies have addressed possible metformin-induced effects in fish (Niemuth et al., 2015; Niemuth and Klaper, 2015; Crago et al., 2016; Jacob et al., 2018; Niemuth and Klaper, 2018; Ussery, 2018), however, to the best of our knowledge, only a single study has reported the negative effects of guanylurea on fish (Ussery, 2018). Furthermore, data on the effects of metformin and its transformation product on invertebrates are scarce. In two studies, the acute toxicity of metformin and guanylurea was determined by means of the acute *Daphnia magna* immobilisation test, resulting in EC<sub>50</sub> (effective concentration)-values of 64 mg/L for metformin (Cleuvers, 2003) and of 40 mg/L for guanylurea (Markiewicz et al., 2017) after 48 h. Caldwell et al. (2019) showed that the geometric average of the no observed effect concentrations (NOEC) of five OECD 211 chronic reproduction tests with *Daphnia magna* was 45.2 mg/L for metformin. In a chronic reproduction study with *Ceriodaphnia dubia* according to the ISO 30665, a NOEC of 8 mg/L was determined for guanylurea (Caldwell et al., 2019). García-García et al. (2017) showed that the population increase of two rotifers was affected by metformin at a concentration of 25 µg/L, however, the effects of guanylurea have not been investigated. To the best of our knowledge, no study so far has focussed on the effects of metformin and guanylurea on freshwater gastropods. We chose the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*) as a representative gastropod since it is a widespread and has a relevant function in freshwater ecosystems serving as prey for fish and birds (Costil and Bailey, 1998). Thus, the aim of our study was to investigate whether the two substances can influence the health of the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*) by: (1) investigating mortality and body weight, (2) analysing stress proteins in the hepatopancreas and the lipid peroxide level in the foot, and (3) examining the histopathological effects in the hepatopancreas.

The levels of heat shock proteins with an approximate weight of 70 kDa were measured in the hepatopancreas of the test organisms. These proteins belong to the Hsp70 stress protein family and are highly conserved across a wide range of taxa (Margulis et al., 1989). They serve to fold unfolded proteins and to re-fold partially damaged proteins. Analysis of the level of stress proteins is a general, unspecific marker for all kinds of proteotoxic stressors (Köhler and Triebkorn, 2004). Piro et al. (2012) showed that expression of Hsp70 in the pancreas of rats exposed to high free fatty acids levels can be reduced by metformin. Thus, we wanted to investigate whether metformin might exert similar effects on the Hsp70 level in an aquatic non-target organism. To our knowledge, no data is available on possible influences of guanylurea on stress proteins.

To verify oxidative damage, the lipid peroxide level was analysed in the foot of the snails, which is an organ in direct contact with the test medium containing metformin or guanylurea. Lipid peroxides

result from reaction of reactive oxygen species (ROS) with polyunsaturated lipids (Monserrat et al., 2003). These ROS are produced by a variety of biochemical processes, such as aerobic respiration or the metabolism of xenobiotics (Betteridge, 2000; Valavanidis et al., 2006). Whenever the balance between the generation of ROS and the anti-oxidative defence system is disturbed, oxidative stress arises (Betteridge, 2000). Under oxidative stress conditions, lipid peroxides might lead to a loss of essential cellular functions (Hermes-Lima et al., 1995). For example, the membrane fluidity of mitochondria can be altered (Chen and Yu, 1994) resulting in an impaired function of the respiration chain and cellular energetics (Bindoli, 1988). Metformin is known to reduce oxidative stress and to attenuate lipid peroxidation *in vitro* in human leukocytes and *in vivo* in rodents and humans (Tessier et al., 1999; Anurag and Anuradha, 2002; Bonnefont-Rousselot et al., 2003; Martin-Montalvo et al., 2013). It is not known, whether metformin exerts similar effects in non-target organisms such as the big ramshorn snail. Furthermore, there is no information about the effects of guanyldurea on oxidative stress.

The hepatopancreas (syn. midgut gland, digestive gland) is the main metabolic organ in molluscs. Its functions include the digestion and absorption of nutrients, as well as the detoxification and immobilisation of xenobiotics (Dallinger and Wieser, 1984; Rószler, 2014). Several studies have shown that chemicals and other stressors can affect the hepatopancreas of snails both structurally and biochemically (Klobučar et al., 1997; Otludil et al., 2004; Zaldibar et al., 2007; Dittbrenner et al., 2008; Osterauer et al., 2010), thus, histopathological investigations are a suitable tool to evaluate the health status of stress-exposed gastropods.

Overall, we assessed the effects of metformin and guanyldurea in the big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*), focusing on biochemical and histological analyses as well as apical parameters.

## **Material and methods**

### Test organism

The big ramshorn snail (*Planorbarius corneus*) is a freshwater pulmonate that belongs to the Planorbidae family. This hermaphroditic snail lives in stagnant or slowly moving waters in Europe (Glöer, 2002). The individuals used for the present study were the progeny of snails obtained from the pet shop Kölle Zoo (Stuttgart, Germany) and the shipping company Bachflohkrebs.de (Stuttgart, Germany). The big ramshorn snail is a good model organism since it is easy to handle in the laboratory and has a rather short generation time (Costil and Daguzan, 1995). Moreover, it is an important representative of non-target freshwater gastropods and is sensitive to pollutants (Otludil et al., 2004).

### Test substances

Metformin hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (CAS number: 1115-70-4; Batch number: BCBP0558V; purity 99.9 %; St. Louis, MO, USA). It was readily soluble in water with a water solubility of 16.56 g/L (TOCRIS, 2017). The concentrations of metformin investigated in the present study refer to the metformin free base (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>) without the anion.

Guanyldurea sulphate was purchased from Tokyo Chemical Industry (CAS number: 591-01-5; Lot: WIA7F and AKJLG; purity 98 %; Tokyo, Japan). With a solubility in water of 50 g/L (ChemIDplus), the

substance was readily soluble in water. The concentrations of guanyurea applied in the present study were based on the pure ingredient (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O) without the anion.

### Exposure experiments

The snails were exposed to different nominal water concentrations of metformin (0, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/L) and guanyurea (0, 0.1, 10, 100 mg/L) at 11 °C in a climate chamber with three replicates per concentration. This temperature was chosen to simulate spring conditions. The experiment with metformin lasted 35 d (11.11.2016–16.12.2016), the test with guanyurea 21 d (02.06.2017–23.06.2017). The exposure took place in a semi-static system in glass aquaria containing 10 L medium and 7 snails each. Once a week, 50 % of the medium was replaced with freshly prepared medium using aerated, filtered tap water (iron filter, active charcoal filter, particle filter). The snails were fed every second day with commercial algae tablets (NovoPleco, JBL, Neuhofen, Germany). Excess food or faeces were removed during the water exchange process. The illumination conditions were set to a 10 h light/14 h dark-cycle to account for the mean day length under spring conditions. Water temperature, oxygen content, conductivity, and pH were measured at the beginning and end of the experiments. At the end of the experiments, the snails were weighed and their shells were removed. For 15 snails per treatment (5 individuals per replicate aquarium), the anterior part of the hepatopancreas was chemically fixed with glutardialdehyde for histological examinations, and the posterior part was frozen in liquid nitrogen for stress protein analyses. Moreover, from every dissected individual, samples of the foot were frozen in liquid nitrogen for lipid peroxide analysis.

### Chemical analyses

For the quantification of metformin and guanyurea in the respective aquaria, water samples were taken at the beginning and end of the experiments as well as before and after a water exchange at days 7 and 21 for the experiment with metformin, and at days 6 and 12 for the experiment with guanyurea (see Supplement, Paragraph 1, Table S.4 and S.5). The samples were stored at -20 °C until processing. The determination of the actual water concentrations was performed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) using a 1260 Infinity high pressure liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a triple quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS 6490, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For the separation, a Phenomenex LUNA 5 u HILIC 200 A column (150 × 3 mm; 5 µm particle size) with a flow rate of 0.5 mL/min at 40 °C was used. A gradient elution was performed with eluent A (aqueous buffer with 15 mM ammonium formate and 0.1 % formic acid) and eluent B (acetonitrile with 0.1 % formic acid) (all chemicals purchased from Fisher Scientific, Schwerte, Germany). For 0–4 min, 95 % of eluent B was used, decreased to 50 % within 4 min and held for 6 min. After switching back to the starting conditions, post time was 8 min.

Samples (composed of 90 % acetonitrile and 10 % H<sub>2</sub>O due to dilution) were kept in the autosampler at 10 °C and the injection volume was 10 µL. A calibration was typically performed between 0.1 µg/L and 10 µg/L in 90 % acetonitrile and 10 % H<sub>2</sub>O with metformin-D6 as an internal standard. The concentration of metformin-D6 was 1 µg/L in the diluted samples and calibration standards. The ionisation of substances was performed in the positive ionisation mode. Further details of the operating parameters of the electrospray ionisation source and the Agilent Jet Stream technology are provided in the Supplement (paragraph 1, Table S.1). The acquired data were processed using the

software Mass Hunter (Agilent Technologies). For quantification and confirmation, mass transitions were monitored for each analyte in the dynamic multiple reaction monitoring mode. Details are given in the Supplement (paragraph 1, Table S.2). The limit of quantification (LoQ) was 1 ng/L for metformin and 10 ng/L for guanylurea. Intra- and inter-day variations in the analytical method are given in the Supplement (paragraph 1, Table S.3).

#### Stress protein analyses

To quantify Hsp70 in the hepatopancreas of the snails, samples were homogenised with a mixture of 98 % extraction buffer and 2 % protease inhibitor (3 ml mixture/g sample) according to the protocol described by Dieterich et al. (2015). The total protein content was determined according to Bradford (1976). The proteins were separated according to their weight using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A standardised amount of 40 µg total protein was analysed per sample. After semi-dry blotting onto a nitrocellulose membrane, a primary antibody (monoclonal α-Hsp70 IgG; Dianova, Hamburg, Germany) was used to specifically detect all isoforms of the Hsp70 protein family, followed by the binding of a secondary antibody (peroxidase-coupled α-IgG; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) to the primary antibody. Membranes were stained with 4-chloro-1-naphthol, scanned, and the optical volume (band area × average grey scale value) of the samples was quantified using the image processing program ImageJ in relation to an internal standard (brown trout whole body homogenate).

#### Lipid peroxide analyses

The level of lipid peroxides in the foot of the snails was determined using the FOX (ferrous oxidation xylenol orange)-assay according to a modified version of the protocol from Hermes-Lima et al. (1995) and Monserrat et al. (2003). Foot samples were diluted 1:4 in HPLC-grade methanol, homogenised, and centrifuged at 4 °C at 14 000 rpm for 5 min. In each well, 50 µl each of FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and xylenol orange, 25 µl sample supernatant and 25 µl bi-distilled water were added resulting in a total volume of 200 µl. Each sample was tested in triplicate and also as sample blank without FeSO<sub>4</sub> to account for endogenous ferrous in the foot sample. Subsequently, the samples were incubated for 75 min (for the metformin experiment) and for 65 min (for the guanylurea experiment) at room temperature. Then, the absorbance was measured at 570 nm using an automated microplate reader (Bio-Tek Instruments; Winooski, VT, USA) and 1 µl of 1 mM cumene hydroperoxide (CHP) solution was added per well. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured again and cumene hydroperoxide equivalents (CHPequiv.) were calculated according to the following equation:

$$CHPequiv. = \frac{Abs_{570} \text{ before CHP}}{Abs_{570} \text{ after CHP}} * volume_{CHP} * \frac{total \ volume}{sample \ volume} * dilution \ factor$$

where volume<sub>CHP</sub>=1 µl; total volume=200 µl; sample volume=25 µl; and dilution factor=4.

#### Histopathological investigations

The samples were fixed in 2 % glutardialdehyde (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) diluted with a cacodylate-sodium buffer (0.01 M, pH 7.4; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) for at least two weeks. After washing with the buffer, the samples were dehydrated with a graded ethanol series and decalcified with a 1:2 mixture of formic acid and 70 % ethanol. Then, the samples were infiltrated with paraffin wax (Parablast, Leica, Wetzlar, Germany) in a tissue processor (TP 1020, Leica).

Subsequently, the samples were cut into 3  $\mu\text{m}$  slices with a microtome (SM 2000 R, Leica) and stained with haematoxylin-eosin in an automatic slide stainer (Varistain 24-4, Thermo Scientific, Germany; protocol in the Supplement, paragraph 2). The investigation of the hepatopancreas was conducted using a light microscope (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Germany) in three steps: first, the status of the tissue was qualitatively described, second, the samples were classified in a semi-quantitative manner into one of five categories (1: control, 2: slight reaction, 3: medium reaction, 4: strong reaction, 5: destruction) according to the classification scheme of Osterauer et al. (2010). In the third step, the samples were categorised again in a blinded and randomised manner to avoid observer bias in the final evaluation. Two people each performed the histological examination for one experiment and both analyses were verified by the first author.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using JMP 13 from SAS (Cary, NC, USA). Upon necessity to achieve normal distribution and homoscedasticity, data were transformed with square root (body weight data of metformin) or natural log (body weight data of guanylurea) functions. Mortality data were analysed using a COX-regression. For weight, stress protein and lipid peroxide analyses, a nested ANOVA using the replicate as a nesting factor, followed by a Dunnett's post-hoc test was performed. For the histopathological investigation, a likelihood-ratio- $\chi^2$ -test was used to detect significant differences between the exposure groups. The statistical tests used and the corresponding p-values are provided in the "Results" section. Further information (degrees of freedom, number of individuals investigated,  $\chi^2$ - and F-values) is provided in the Supplement (paragraph 3). The  $\alpha$ -level was set to 0.05; in the case of multiple comparisons, the  $\alpha$ -level was adjusted with a sequential Bonferroni correction. A statistical comparison of the results of the experiment with metformin with those of the experiment with guanylurea was not possible since the experiments were not conducted at the same time and the exposure time was different. Consequently, we only compared the data from the two experiments in a qualitative way.

### Credibility of data

Details about the fulfilment of the criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data (CRED) according to Moermond et al. (2016) are given in the Supplement (paragraph 4).

## **Results**

### Water quality parameters

Temperature, oxygen concentration, pH, and conductivity were measured at the beginning and end of the experiments (metformin: temperature=  $10.30 \pm 0.13$  °C; oxygen concentration=  $10.03 \pm 0.27$  mg/L; pH= $8.16 \pm 0.09$ ; conductivity= $460.73 \pm 6.60$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; guanylurea: temperature= $10.55 \pm 0.23$  °C; oxygen concentration=  $10.58 \pm 0.17$  mg/L; pH= $8.32 \pm 0.04$ ; conductivity= $499.42 \pm 26.93$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Further details regarding these measurements are given in the Supplement (paragraph 5).

### Chemical analysis

The measured water concentrations in the test aquaria were in good accordance with the nominal water concentrations of metformin and guanylurea (Tables 1 and 2). In the experiment with guanylurea, a slight contamination in the control medium was detected, however, the contamination

was a factor of 100 less than the lowest guanylyurea concentration, therefore, we assumed the guanylyurea test concentrations to be high enough to tolerate the traces of guanylyurea in the control.

#### Mortality and body weight

The mortality varied between 0.0 and 9.5 % in all treatments and was insignificantly increased by metformin or guanylyurea (COX-regression: metformin:  $p=1$ ; guanylyurea:  $p=1$ ) (Tables 1 and 2). There was a trend of reduced body weight in the exposure groups with 0.1–10 mg/L metformin and 10 and 100 mg/L guanylyurea. However, the body weight of the snails did not differ significantly among the exposure groups in both experiments (nested ANOVA: metformin:  $p=0.7719$ ; guanylyurea:  $p=0.0172$ ; with Dunnett's test: all  $p$ -values  $> 0.05$ ) (Tables 1 and 2).

#### Biochemical markers

The Hsp70 level was slightly enhanced in the exposure group with 0.1 mg/L guanylyurea and 1 mg/L metformin compared to the respective controls (nested ANOVA: metformin:  $p=0.0050$  with Dunnett's test: (0 mg/L and 1 mg/L):  $p=0.0075$ ; guanylyurea:  $p=0.0091$ ; with Dunnett's test: all  $p$ -values  $> 0.05$ ) (Tables 1 and 2). The lipid peroxide level analysis did not reveal any differences among the groups exposed to metformin or guanylyurea (nested ANOVA: metformin:  $p=0.1264$ ; guanylyurea:  $p=0.6889$ ) (Tables 1 and 2).

Table 1: Summary of measured metformin water concentrations as well as data on mortality, weight, stress proteins and lipid peroxides measured in big ramshorn snails exposed to metformin. All parameters are provided as arithmetic mean  $\pm$  standard deviation. LoQ means 'limit of quantification'.

Metformin

| <b>Nominal concentration</b>                           | <b>water</b> | 0 mg/L           | 0.01 mg/L         | 0.1 mg/L         | 1 mg/L           | 10 mg/L          |
|--------------------------------------------------------|--------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Measured (real) water concentration [mg/L]</b>      |              | <LoQ             | 0.010 $\pm$ 0.001 | 0.98 $\pm$ 0.21  | 1.07 $\pm$ 0.11  | 10.96 $\pm$ 0.99 |
| <b>Mortality [%]</b>                                   |              | 0 $\pm$ 0        | 0 $\pm$ 0         | 0 $\pm$ 0        | 4.8 $\pm$ 6.7    | 9.5 $\pm$ 6.7    |
| <b>Weight [g]</b>                                      |              | 4.20 $\pm$ 1.61  | 4.12 $\pm$ 1.57   | 3.75 $\pm$ 1.80  | 3.86 $\pm$ 1.62  | 3.65 $\pm$ 1.30  |
| <b>Relative Hsp70 level [rel. grey value]</b>          |              | 0.99 $\pm$ 0.30  | 0.86 $\pm$ 0.18   | 0.97 $\pm$ 0.22  | 1.18 $\pm$ 0.34  | 0.82 $\pm$ 0.24  |
| <b>Lipid peroxide level [CHP-equiv./mg wet weight]</b> |              | 12.53 $\pm$ 2.28 | 13.13 $\pm$ 1.59  | 12.92 $\pm$ 2.14 | 13.00 $\pm$ 2.93 | 13.11 $\pm$ 1.81 |

Table 2: Summary of measured guanyurea water concentrations as well as data on mortality, weight, stress proteins and lipid peroxides measured in big ramshorn snails exposed to guanyurea. All parameters are provided as arithmetic mean  $\pm$  standard deviation.

Guanyurea

| <b>Nominal concentration</b>                           | <b>water</b> | 0 mg/L            | 0.1 mg/L         | 10 mg/L          | 100 mg/L         |
|--------------------------------------------------------|--------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Measured (real) water concentration [mg/L]</b>      |              | 0.001 $\pm$ 0.001 | 0.10 $\pm$ 0.01  | 11.04 $\pm$ 1.19 | 118.8 $\pm$ 11.4 |
| <b>Mortality [%]</b>                                   |              | 0 $\pm$ 0         | 0 $\pm$ 0        | 0 $\pm$ 0        | 4.8 $\pm$ 6.7    |
| <b>Weight [g]</b>                                      |              | 2.28 $\pm$ 0.60   | 2.42 $\pm$ 0.81  | 1.85 $\pm$ 0.62  | 1.90 $\pm$ 0.79  |
| <b>Relative Hsp70 level [rel. grey value]</b>          |              | 0.95 $\pm$ 0.17   | 1.11 $\pm$ 0.29  | 0.95 $\pm$ 0.18  | 0.81 $\pm$ 0.22  |
| <b>Lipid peroxide level [CHP-equiv./mg wet weight]</b> |              | 14.26 $\pm$ 3.24  | 13.79 $\pm$ 5.06 | 15.06 $\pm$ 2.80 | 13.37 $\pm$ 3.73 |

## Histopathology

The hepatopancreas of gastropods consists of numerous tubules surrounded by connective and muscle tissue and haemolymph spaces. Each tubule consists of three main cell types: (a) digestive cells with a columnar shape and vacuoles that increase in size towards the cell base (Figure 1A), (b) crypt cells (syn. basophilic or calcium cells) with a conic shape and a big, centrally located nucleus (Figure 1A), and (c) excretory cells with large vacuoles containing cellular debris prior to excretion (Triebkorn, 1989). Possible pathological alterations include: (1) dilation of the tubule's lumen, (2) the protrusion of the apices, irregular compartmentation, and an increase in the number and size of the vacuoles in the digestive cells, and (3) alterations and deformations of the nuclei, hyperplasia, and hypertrophy, as well as increase in vacuoles' size and number in the cytoplasm of the crypt cells (Osterauer et al., 2010).

In the semi-quantitative assessment, the samples were solely classified into categories 1, 2 or 3. Destruction of the tissue and, thus, a classification into categories 4 and 5, did not occur. The hepatopancreas of snails exposed to metformin did not significantly differ to that of controls (Likelihood-ratio- $\chi^2$ -test:  $p=0.5159$ ). However, in metformin-exposed individuals, tissues were more often classified into category 3 (reactions), particularly for the exposure group with the highest metformin concentration (Figure 2). In these animals, reactions such as dilation of the lumen, vacuolisation in crypt cells, and protrusion of the apex in digestive cells (Figure 1C) were observed with a tendentially higher frequency than in controls.

The hepatopancreas of snails exposed to the highest guanylyurea concentration (100 mg/L) significantly differed from that of the controls (Likelihood-ratio- $\chi^2$ -test:  $p<0.0001$ ; pairwise comparison: (0 mg/L and 100 mg/L):  $p=0.0018$ ) (Figure 2). The lumen of the tubules was enlarged (Figure 1B), compartmentation in the digestive cells was disturbed (Figure 1D), nuclei were deformed (Figure 1E), and hyperplasia, hypertrophia, and vacuolisation of crypt cells became evident (Figure 1F). No such effects were observed in snails exposed to 0.1 and 10 mg/L guanylyurea.



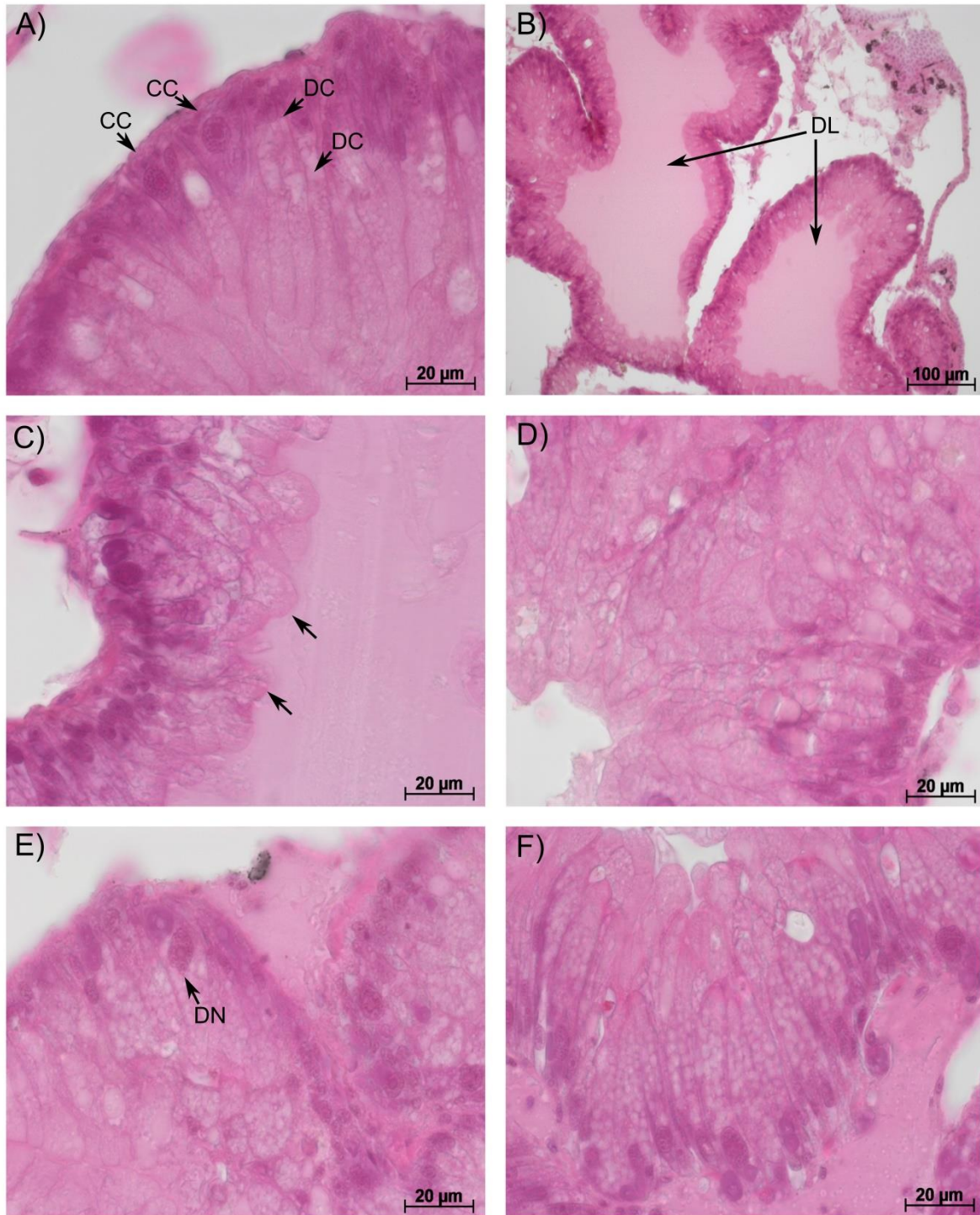


Figure 1: Representative sections of the hepatopancreas in big ramshorn snails. (A): control snails showed conically shaped crypt cells [CC] with a large nucleus and column-shaped digestive cells [DC] with vacuoles increasing in size from the apex to the base; (B): snails exposed to 100 mg/L guanylurea showed a dilated lumen [DL] of the tubules; (C): in snails exposed to 10 mg/L metformin, the apex of the digestive cells was irregularly shaped and protruded into the lumen [arrow]; Snails exposed to 100 mg/L guanylurea displayed (D) irregularly shaped digestive cells with an affected cell compartmentation, (E) deformation of crypt cell nuclei [DN] and (F) a severe vacuolisation of the hypertrophic crypt cells. In this exposure group almost all crypt cells were hypertrophic and increased in number. All sections were stained with haematoxylin-eosin.

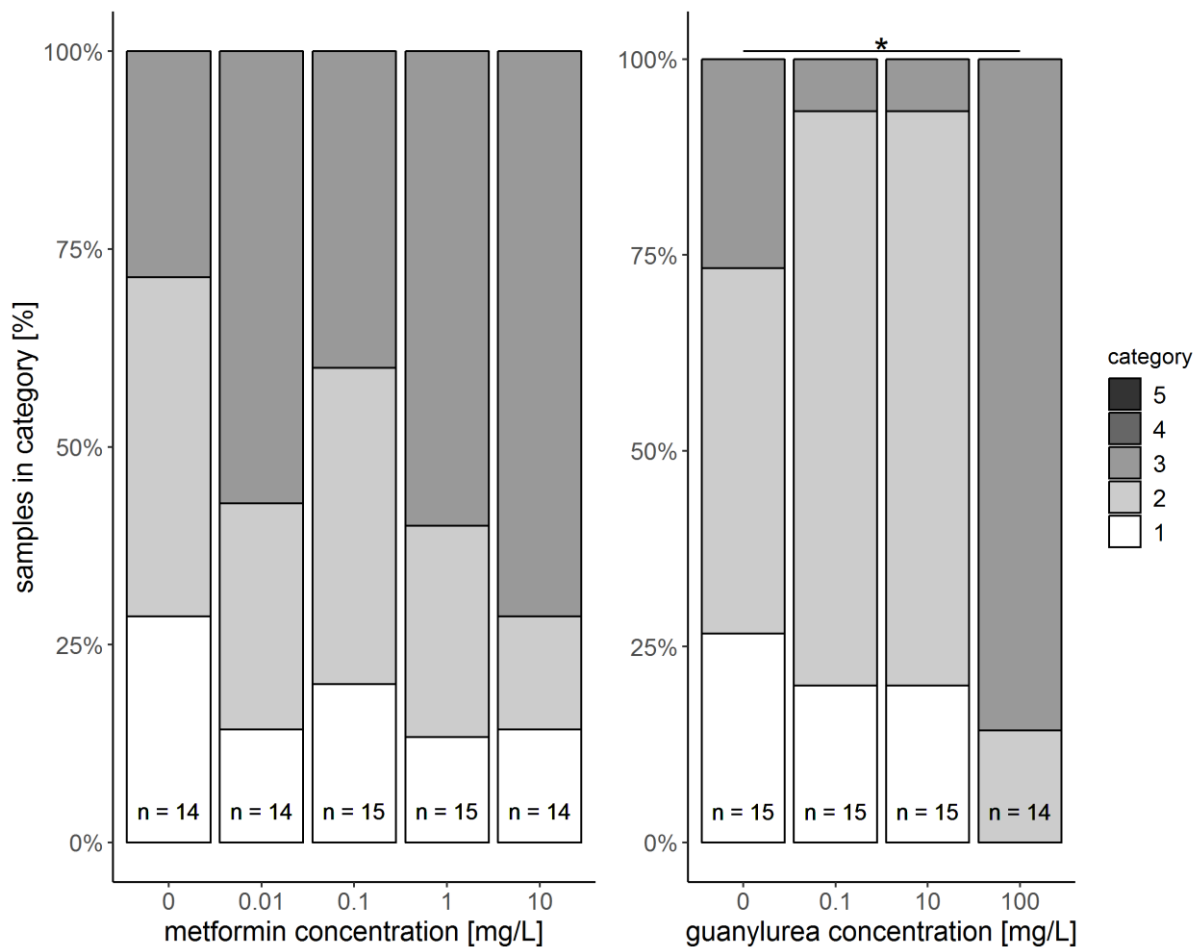


Figure 2: Semi-quantitative assessment of histopathological symptoms in the hepatopancreas of big ramshorn snails exposed to metformin and guanyurea. Samples were classified in category 1 to 5. Categories 4 and 5 were not allocated to any of the samples. The number n of examined individuals is given at the bases of the bars. The asterisk indicates a significant difference compared to the respective control at the  $\alpha=0.05$  level.

## Discussion

The survival of the snails was not affected by the antidiabetic drug or its transformation product. A trend to a reduction in the weight of the snails exposed to the medium and high concentrations of each substance was observed, however, there was a high variability in weight within the groups, which may have contributed to these differences lacking statistical significance. Moreover, a decreased food uptake was observed during the experiments for the above mentioned exposure groups. Unfortunately, this was not quantifiable. Nevertheless, the observed trend to weight reduction is in accordance with other studies with metformin-exposed fish (Niemuth and Klaper, 2015; Jacob et al., 2018; Ussery, 2018) and with the application of metformin as weight loss drug in humans (Seifarth et al., 2013; Malin and Kashyap, 2014). Upon administration of metformin in humans, appetite is downregulated by attenuating the activity of the adenosine monophosphate-activated kinase, which is a main sensor for cellular energy homeostasis (Malin and Kashyap, 2014; Jeon, 2016). It is not known how guanyurea could have influenced food uptake in the snails.

The analyses of the stress proteins revealed a significantly enhanced Hsp70 level in the group treated with 1 mg/L metformin, and a tendentially increased value for the exposure group with 0.1 mg/L guanylurea. This might be ascribed to the higher variability in these two exposure groups. However, an increased induction of Hsp70 caused by the tested substances is unlikely since the histopathological examinations do not show any reactions in these exposure groups (see below). Furthermore, a decrease in the Hsp70 base level caused by metformin as shown by Piro et al. (2012) was not observed. We assume, therefore, that metformin could not exert its stress protein lowering effect in the big ramshorn snail, since the Hsp70 level was not elevated prior to metformin treatment, as in the study by Piro et al. (2012) which used a Hsp70 overexpression model. For guanylurea, a comparison of our results with the literature is not possible, since other studies dealing with the effects of guanylurea on stress proteins are – to our knowledge – lacking.

An effect of metformin or its transformation product on the lipid peroxide level in the foot of *Planorbarius corneus* could not be found. Since the oxidative stress level is enhanced in type 2 diabetic patients (Ceriello et al., 1997), metformin has been shown to act as an antioxidant and to reduce oxidative stress and lipid peroxidation in these patients (Tessier et al., 1999) and high fructose-fed rats with insulin resistance (Anurag and Anuradha, 2002). Thus, an explanation for the absence of a lipid peroxide level-reducing effect of metformin in *Planorbarius corneus* could be that the oxidative stress level in the snails was not enhanced before metformin treatment. However, it is also possible that the activity of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase, or catalase, was enhanced by metformin when an external oxidative stress inducer was present, as it has been shown for all three enzymes in human macrophages (Bułdak et al., 2014) and for catalase in mouse livers (Dai et al., 2014), prior to the effects of the drug on lipid peroxidation. To prove that metformin leads to an elevated activity of these three antioxidant enzymes in *Planorbarius corneus*, further measurements would be necessary. However, this was not possible in the present study due to the restrictions of tissue availability for the different analyses. Furthermore, data in the literature regarding guanylurea and its effect on lipid peroxides is lacking.

The histopathological examination revealed significantly stronger reactions in snails exposed to 100 mg/L guanylurea than the controls. For metformin, a similar trend was found, particularly for the highest concentration. The observed reaction pattern was characterised by a dilation of the tubule lumen and a disturbed compartmentation of the digestive cells. These reactions have also been observed in other studies with snails exposed to copper, lithium (Sawasdee et al., 2011) or platinum (Osterauer et al., 2010). Furthermore, protrusions of the apices of the digestive cells into the lumen occurred. This symptom has also been reported in a study of Dittbrenner et al. (2008) on snails exposed to heat stress. The observed hyperplasia of the crypt cells has been described as a very common response to all types of stressors (Cajaraville et al., 1990; Garmendia et al., 2011). Possible explanations for the increase in cell number and the vacuolisation of the crypt cells could be an enhanced demand of enzymes to support affected digestive cells in their function (Cajaraville et al., 1990) or increasing detoxification processes (Zaldibar et al., 2007). Another finding was the deformation of cell nuclei, which has also been observed in other studies on the hepatopancreas of snails during exposure to molluscicides (Triebkorn, 1989; Hamed et al., 2007) or to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Zhu et al., 2011). Generally, the histopathological findings in our study indicate that metformin and guanylurea lead to unspecific pathological symptoms in the hepatopancreas of the exposed snails.

However, it is important to emphasise that all of our observed histological reactions only occurred at concentrations which are 10 000 times higher than those in the aquatic environment. In addition, even at these high concentrations, only moderate reactions, if any, and never destruction of the tissue became evident. From this point of view, metformin and guanylurea seem not to pose a risk to aquatic gastropods (represented by the big ramshorn snail in this study). However, due to the lack of studies with other invertebrates we cannot exclude the possibility that metformin and its transformation product can affect other species that were not tested. Recent studies by Niemuth et al. (2015), Niemuth and Klaper (2015; 2018), and Crago et al. (2016) showed that metformin can affect the hormonal system of the fathead minnow at environmentally relevant concentrations. This result is in line with metformin acting on the hormonal system in humans, which explains its application as a drug for the treatment of polycystic ovary syndrome (Lord et al., 2003). Since in our study endocrine effects were not investigated, we cannot comment on any potential effects of metformin or its transformation product on the hormonal system in the big ramshorn snail. Thus, further studies are necessary that focus on the possible hormonal-like effects of metformin and guanylurea in snails.

Finally, it is important to stress that there is a general dearth of studies dealing with ecotoxicological effects of guanylurea in aquatic organisms. Only two such studies on invertebrates exist to date. To assess the risk of this transformation product on a more solid basis, further investigations on the ecotoxicological effects of guanylurea in invertebrates are thus highly needed.

## **Conclusion**

Our study showed that metformin and guanylurea did not produce lethal effects in exposed *Planorbis corneus*. Furthermore, the biochemical stress markers (Hsp70 and lipid peroxide level) were not influenced by the antidiabetic drug or its transformation product. The histopathological investigation revealed an increase in unspecific reactions in the hepatopancreas of the snails, but only at concentrations 10 000 times higher than the concentrations measured in the environment. In addition, the weight of the snails tended to be reduced, but also not at environmentally relevant concentrations.

Generally, studies focussing on the effects of pharmaceuticals and their transformation products in gastropods and other invertebrates are scarce, and metformin and its transformation product guanylurea do not constitute an exception. Thus, a final risk assessment of the investigated substances for freshwater invertebrates is not yet possible.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Authors Contributions**

ST analysed the water samples during the experiment. CZ supervised the chemical analyses of the water samples. SJ performed the exposure experiment, conducted the lipid peroxide analysis, was involved in the stress proteins analysis, examination of the hepatopancreas tissue, and the corresponding statistical analyses. RT supervised the histological examinations and designed the

study. HK supervised the biochemical analyses. All authors critically revised and approved the final manuscript.

### Data Availability Statement

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

### Funding

The study was funded by the Wassernetzwerk Baden-Württemberg framework of the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg (Grant No. 33-5733-25-11t32/2).

### Acknowledgements

This study is part of the project Effect-Net (Effect Network in Water Research) funded within the Wassernetzwerk Baden-Württemberg framework by the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg. Particular thanks go to Thomas Braunbeck for the coordination of this project. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Open Access Publishing Fund of the University of Tübingen. We are grateful to Melanie Biecker, Joanna Probst, and Jochen Schwantzer for the histological examination and the analysis of stress proteins which were conducted in the context of their bachelor and master theses. Furthermore, we thank Andreas Dieterich, Helene Eckstein, Stefanie Kraus, Katharina Peschke, Carla Lorenz, Hannah Schmiege, Simon Schwarz, Sabrina Wilhelm, and Michael Ziegler for technical support and assistance in the lab.

### References

- An, H., and He, L. (2016). Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J. Endocrinol.* 228:3, R97-R106. doi: <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0447>.
- Anurag, P., and Anuradha, C. (2002). Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes. Metab.* 4:1, 36-42. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2002.00178.x>
- Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49:2, 3-8. doi: [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)
- Bindoli, A. (1988). Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 5:4, 247-261. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90018-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90018-4)
- Bonnefont-Rousselot, D., Raji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., et al. (2003). An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 52:5, 586-589. doi: <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50093>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:1, 248-254. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Buđak, Ł., Łabuzek, K., Buđak, R.J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., et al. (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent

- manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol. Rep.* 66:3, 418-429. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008>
- Cajaraville, M.P., Diez, G., Marigómez, J., and Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Dis. Aquat. Org* 9, 221-228. doi: <https://doi.org/10.3354/dao009221>
- Caldwell, D.J., D'Aco, V., Davidson, T., Kappler, K., Murray-Smith, R.J., Owen, S.F., et al. (2019). Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanylurea: II. Occurrence in surface waters of Europe and the United States and derivation of predicted no-effect concentrations. *Chemosphere* 216, 855-865. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.038>
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Falletti, E., Taboga, C., Tonutti, L., Crescentini, A., et al. (1997). Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 20:2, 194-197. doi: <https://doi.org/10.2337/diacare.20.2.194>
- ChemIDplus <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/guanylurea> [Online]. TOXNET Toxicology Data Network. [Accessed 16.08.2018].
- Chen, J.J., and Yu, B.P. (1994). Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biol. Med.* 17:5, 411-418. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90167-8)
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142:3, 185-194. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7).
- Costil, K., and Bailey, S. (1998). Influence of water temperature on the activity of *Planorbarius corneus* (L.)(Pulmonata, Planorbidae). *Malacologia* 39:1-2, 141-150. doi: <https://doi.org/10.1093/mollus/60.3.223>
- Costil, K., and Daguzan, J. (1995). Comparative life-cycle and growth of 2 freshwater gastropod species, *Planorbarius corneus* (L.) and *Planorbis planorbis* (L.) *Malacologia* 37:1, 53-68.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., and Schlenk, D. (2016). Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 232, 185-190. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.030>.
- Dai, J., Liu, M., Ai, Q., Lin, L., Wu, K., Deng, X., et al. (2014). Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem.-Biol. Interact.* 216, 34-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.013>
- Dallinger, R., and Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. and Physiol. part C: Comp. Pharmacol.* 79:1, 117-124. doi: [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(84\)90173-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(84)90173-7)
- Dieterich, A., Troschinski, S., Schwarz, S., Di Lellis, M.A., Henneberg, A., Fischbach, U., et al. (2015). Hsp70 and lipid peroxide levels following heat stress in *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836) (Gastropoda, Pulmonata) with regard to different colour morphs. *Cell Stress Chaperones* 20:1, 159-168. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-014-0534-3>.
- Dittbrenner, N., Lazzara, R., Köhler, H.-R., Mazzia, C., Capowiez, Y., and Triebkorn, R. (2008). Heat tolerance in Mediterranean land snails: histopathology after exposure to different temperature regimes. *J. Molluscan Stud.* 75:1, 9-18. doi: <https://doi.org/10.1093/mollus/eyn033>

- García-García, G., Reyes-Carrillo, G., Sarma, S., and Nandini, S. (2017). Population level responses of rotifers (*Brachionus calyciflorus* and *Platyonus patulus*) to the anti-diabetic drug, metformin. *J. Environ. Biol.* 38:6, 1213-1219.
- Garmendia, L., Soto, M., Vicario, U., Kim, Y., Cajaraville, M.P., and Marigómez, I. (2011). Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology. *J. Environ. Monit.* 13:4, 915-932. doi: <https://doi.org/10.1039/c0em00704h>
- Glöer, P. (2002). Die Süßwassergastropoden Nord-und Mitteleuropas–Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands, 73. Teil. *ConchBooks. Hackenheim.*
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K.M., Altman, R.B., and Klein, T.E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* 22:11, 820. doi: <https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e3283559b22>
- Hamed, S.S., Abdelmeguid, N.E., Essawy, A.E., Radwan, M.A., and Hegazy, A.E. (2007). Histological and ultrastructural changes induced by two carbamate molluscicides on the digestive gland of *Eobania vermiculata*. *J. Biol. Sci.* 7, 1017-1037. doi: <https://doi.org/10.3923/jbs.2007.1017.1037>
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., and Storey, K.B. (1995). Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biol. Med.* 19:3, 271-280. doi: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-x](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-x)
- Hundal, H., Ramlal, T., Reyes, R., Leiter, L., and Klip, A. (1992). Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* 131:3, 1165-1173. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.131.3.1505458>.
- Jacob, S., Dötsch, A., Knoll, S., Köhler, H.-R., Rogall, E., Stoll, D., et al. (2018). Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? *Environ. Sci. Eur.* 30:1, 48. doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0179-4>
- Jeon, S.-M. (2016). Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* 48:7, e245. doi: <https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>
- Klobučar, G., Lajtner, J., and Erben, R. (1997). Lipid peroxidation and histopathological changes in the digestive gland of a freshwater snail *Planorbarius corneus* L.(Gastropoda, Pulmonata) exposed to chronic and sub-chronic concentrations of PCP. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:1, 128-134. doi: <https://doi.org/10.1007/s001289900310>
- Köhler, H.R., and Triebkorn, R. (2004). Stress im Boden: Früherkennung ökotoxikologischer Effekte durch Biomarker. *Biologie in unserer Zeit* 34:4, 240-248.
- Lord, J.M., Flight, I.H., and Norman, R.J. (2003). Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327:7421, 951. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.327.7421.951>.
- Malin, S.K., and Kashyap, S.R. (2014). Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 21:5, 323-329. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MED.0000000000000095>.
- Margulis, B., Antropova, O., and Kharazova, A. (1989). 70 kDa heat shock proteins from mollusc and human cells have common structural and functional domains. *Comp. Biochem. Physiol. part B: Comp. Biochem.* 94:4, 621-623.

- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Białk-Bielińska, A., Kumirska, J., and Mroziak, W. (2017). Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *J. Hazard. Mater.* 333, 154-161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.030>
- Martin-Montalvo, A., Mercken, E.M., Mitchell, S.J., Palacios, H.H., Mote, P.L., Scheibye-Knudsen, M., et al. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.* 4, 2192. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>
- Moermond, C.T., Kase, R., Korkaric, M., and Ågerstrand, M. (2016). CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 35:5, 1297-1309. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3259>.
- Monserrat, J.M., Geracitano, L., Pinho, G.L.L., Vinagre, T., Faleiros, M., Alciati, J.C., et al. (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:2, 177-183. doi: <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0073-x>
- Natali, A., and Ferrannini, E. (2006). Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* 49:3, 434-441. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0141-7>.
- Niemuth, N.J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., and Klaper, R.D. (2015). Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 34:2, 291-296. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2793>.
- Niemuth, N.J., and Klaper, R.D. (2015). Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135, 38-45. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.060>.
- Niemuth, N.J., and Klaper, R.D. (2018). Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquat. Toxicol.* 195, 33-40. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.003>.
- Oosterhuis, M., Sacher, F., and ter Laak, T.L. (2013). Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci. Total Environ.* 442, 380-388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.046>
- Osterauer, R., Köhler, H.-R., and Triebkorn, R. (2010). Histopathological alterations and induction of hsp70 in ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to PtCl<sub>2</sub>. *Aquat. Toxicol.* 99:1, 100-107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.001>
- Otludil, B., Cengiz, E.I., Yildirim, M.Z., Ünver, Ö., and Ünlü, E. (2004). The effects of endosulfan on the great ramshorn snail *Planorbis corneus* (Gastropoda, Pulmonata): a histopathological study. *Chemosphere* 56:7, 707-716. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.027>
- Pentikäinen, P., Neuvonen, P., and Penttilä, A. (1979). Pharmacokinetics of metformin after intravenous and oral administration to man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16:3, 195-202. doi: <https://doi.org/10.1007/bf00562061>
- Piro, S., Rabuazzo, A., Renis, M., and Purrello, F. (2012). Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *J. Endocrinol. Invest.* 35:5, 504-510.
- Röszer, T. (2014). The invertebrate midintestinal gland ("hepatopancreas") is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res.* 358:3, 685-695. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1985-7>



- Sawasdee, B., Köhler, H.-R., and Triebkorn, R. (2011). Histopathological effects of copper and lithium in the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia). *Chemosphere* 85:6, 1033-1039. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.030>
- Scheen, A.J. (1996). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* 30:5, 359-371. doi: <https://dx.doi.org/10.2165/00003088-199630050-00003>
- Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H.-J., Ruck, W., and Sacher, F. (2012). Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res.* 46:15, 4790-4802. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019>
- Scheurer, M., Sacher, F., and Brauch, H.-J. (2009). Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *J. Environ. Monit.* 11:9, 1608-1613. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/b909311g>.
- Seifarth, C., Schehler, B., and Schneider, H. (2013). Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp. Clin. Endocrinol.* 121:01, 27-31. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1327734>.
- Tessier, D., Maheux, P., Khalil, A., and Fülöp, T. (1999). Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metabolism* 48:7, 897-903. doi: [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(99\)90226-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(99)90226-3)
- Tisler, S., and Zwiener, C. (2018). Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Sci. Total Environ.* 628, 1121-1129. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.105>.
- Tisler, S., and Zwiener, C. (2019). Aerobic and anaerobic formation and biodegradation of guanyl urea and other transformation products of metformin. *Water Res.* 149, 130-135. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.001>
- TOCRIS (2017). *Safety data sheet of metformin hydrochloride* [Online]. [https://documents.tocris.com/pdfs/tocris\\_msds/2864\\_sds.pdf?1542620235](https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_msds/2864_sds.pdf?1542620235). [Accessed 09.01.2019].
- Triebkorn, R. (1989). Ultrastructural changes in the digestive tract of *Deroceras reticulatum* (Müller) induced by a carbamate molluscicides and by metaldehyde. *Malacologia* 31:1, 141-156.
- Ussery, E. (2018). *The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanylurea, on Japanese medaka (Oryzias latipes)*. [dissertation]. [Ontario]: University of Ontario.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., and Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64:2, 178-189. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Wiernsperger, N.F., and Bailey, C.J. (1999). The antihyperglycaemic effect of metformin. *Drugs* 58:1, 31-39. doi: <https://dx.doi.org/10.2165/00003495-199958001-00009>
- Zaldibar, B., Cancio, I., and Marigomez, I. (2007). Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquat. Toxicol.* 81:2, 183-196. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.007>
- Zhu, J., Lu, K., Zhang, C., Liang, J., and Hu, Z. (2011). Biochemical and ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Bellamyia aeruginosa* (Gastropoda) fed with toxic cyanobacteria. *Scientific World Journal* 11, 2091-2105. doi: <https://doi.org/10.1100/2011/402326>

## Kapitel II: Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?

Stefanie Jacob<sup>1\*</sup>, Andreas Dötsch<sup>2,5</sup>, Sarah Knoll<sup>4</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Eike Rogall<sup>5</sup>, Dominic Stoll<sup>3</sup>, Selina Tisler<sup>6</sup>, Carolin Huhn<sup>4</sup>, Thomas Schwartz<sup>5</sup>, Christian Zwiener<sup>6</sup>, Rita Triebkorn<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Max Rubner-Institut, Haid-und-Neu-Straße 9, D-76131 Karlsruhe, Germany

<sup>3</sup>Department of Safety and Quality of Fruit and Vegetables, Max Rubner-Institut, Haid-und-Neu-Straße 9, D-76131 Karlsruhe, Germany

<sup>4</sup>Effect-based Environmental Analysis, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>5</sup>Interface Microbiology, Karlsruhe Institute of Technology, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Germany

<sup>6</sup>Environmental Analytical Chemistry, University of Tübingen, Hölderlinstr.12, D-72074 Tübingen, Germany

<sup>7</sup>Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany.

\*correspondence: stefanie.jacob@uni-tuebingen.de

### Abstract

Due to the rising number of type 2 diabetes patients, the antidiabetic drug, metformin is currently among those pharmaceuticals with the highest consumption rates worldwide. Via sewage treatments plants, metformin enters surface waters where it is frequently detected in low concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ). Since possible adverse effects of this substance in aquatic organisms have been insufficiently explored to date, the aim of this study was to investigate the impact of metformin on health and development in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) and its microbiome.

Brown trout embryos were exposed from 48 days post fertilisation (dpf) to 0, 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g/L}$  metformin until eight weeks post-yolk-sac consumption at 7 °C (156 dpf) and 11 °C (143 dpf). Chemical analyses in tissues of exposed fish showed a concentration-dependent presence of metformin in the larvae. Mortality, embryonic development, body length, liver tissue integrity, stress protein levels and swimming behaviour were not influenced. However, compared to the controls, the amount of hepatic glycogen was higher in larvae exposed to metformin, especially in fish exposed to the lowest metformin concentration of 1  $\mu\text{g/L}$ , which is environmentally relevant. At higher metformin concentrations, the glycogen content in the liver showed a high variability, especially for larvae exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  metformin. Furthermore, the body weight of fish exposed to 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  metformin at 7 °C and to 1  $\mu\text{g/L}$  metformin at 11 °C was decreased compared to the respective controls. The results of the microbiome analyses indicated a shift in the bacteria distribution in fish exposed to 1 and 10  $\mu\text{g/L}$  metformin at 7 °C and to 100  $\mu\text{g/L}$  metformin at 11 °C, leading to an increase in Proteobacteria and a reduction of Firmicutes and Actinobacteria.

Overall, weight reduction and an increased glycogen content belong to the described pharmaceutical effects of the drug in humans, but this study showed that they also occur in brown trout larvae. The impact of a shift in the intestinal microbiome caused by metformin on the immune system and vitality of the host organism should be the subject of further research before assessing the environmental relevance of the pharmaceutical.

**Keywords** pharmaceutical, salmonid, glycogen, body weight, microbiome

## Introduction

In recent decades, the rising number of micropollutants like industrial chemicals, pharmaceuticals, personal care products and pesticides detected in the water cycle has become a topic of interest in the public and the scientific community (Kasprzyk-Hordern et al. 2008; Schwarzenbach et al. 2006; Weber et al. 2016). At the same time, the analytical instruments and methods were improved, which made the detection of these substances in the picogram to microgram per litre range possible (Agüera et al. 2013; Aus der Beek et al. 2016). In particular, human pharmaceuticals are constantly discharged into water bodies, leading to the continuous exposure of aquatic organisms. Since they have a specific mode of action and are made to exert an effect in humans, it is likely that they have an effect in aquatic non-target organisms (Cleuvers 2003; Daughton and Ternes 1999). The antidiabetic drug metformin belongs to the group of most frequently prescribed pharmaceuticals worldwide (Ghoshdastidar et al. 2015; Jones et al. 2002; Khan and Ongerth 2002; Trautwein and Kümmerer 2011). In 2015, 590 million defined daily doses (DDD) of this drug were prescribed in Germany (Schwabe and Paffrath 2016), which resulted in a total prescribed amount of 1180 t, assuming a DDD of 2 g. The human body excretes the pharmaceutical without any metabolism (Bailey 1993; Scheen 1996). Although the elimination rates of metformin are > 90 % in sewage treatment plants, mostly due to microbial action, this compound occurs in surface waters at concentrations up to 3 µg/L (Scheurer et al. 2012).

The therapeutic action of metformin in type 2 diabetes patients is the reduction of blood glucose levels by (1) the inhibition of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis and (2) the activation of glucose uptake into cells (An and He 2016; Hundal et al. 1992; Natali and Ferrannini 2006; Wiernsperger and Bailey 1999). Despite the fact that numerous studies have addressed the mechanism of action of this drug, it is not fully understood to date. Gluconeogenesis – a very energy-demanding process – is probably reduced by the inhibition of the mitochondrial respiration, which leads to a decrease in the ATP/ADP ratio (El-Mir et al. 2000; Foretz et al. 2014; Foretz et al. 2010; Hawley et al. 2010). The improved glucose uptake in cells is most likely caused by an enhanced glucose transporter capacity and the translocation of these transporters into the cell membrane (Giannarelli et al. 2003; Hundal et al. 1992; Matthaei et al. 1993; Wiernsperger and Bailey 1999). Although it is not known whether the same mechanisms could be found in fish, it is likely that metformin could exert the same effects in their mitochondria (Godoy et al. 2018).

In addition to interactions with carbohydrate metabolism, an indirect impact on other metabolic pathways is probable and still under investigation. In this context, it should be taken into account that, apart from its application as an antidiabetic, metformin is also used as a weight loss drug (Seifarth et al. 2013), for the treatment of the polycystic ovary syndrome, a disease which inhibits ovulation and evokes high levels of androgens (Lord et al. 2003; Nestler 2008), and as an anti-cancer drug (Martin-Castillo et al. 2010).

It has been demonstrated that metformin exerts similar therapeutic effects on non-target organisms. For example, Crago et al. (2016) detected an increase of vitellogenin mRNA in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed for 7 d to 1, 10 and 100 µg/L metformin. Niemuth and Klaper (2015; 2018) showed 40 µg/L metformin to affect several endocrine-related genes and to evoke intersexuality and a reduced size in adult male fathead minnows and the reduced fecundity of mating pairs which had been exposed from the fry stage to adulthood for about one year. In a further study, Niemuth et al. (2015) demonstrated that a concentration of 40 µg/L metformin

increased the vitellogenin mRNA in adult fathead minnow exposed for 28 d. Ussery (2018) showed that metformin reduced the growth of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 1-100 µg/L metformin for 28 d. In contrast, in a report (EMA 2011) cited by Moermond and Smit (2016), a NOEC  $\geq 10$  mg/L metformin was derived for hatching rate, time to hatch, survival, length and weight in an early life stage toxicity test with zebrafish (*Danio rerio*). Furthermore, several studies showed that metformin changed the composition of the intestinal microbiome in humans and mice (Forslund et al. 2015; Lee and Ko 2014; Shin et al. 2014; Wu et al. 2017). This is especially important, since studies found a strong correlation between the composition of the gut microbiome and the occurrence of diseases (de Vos and de Vos 2012; Janssens et al. 2018; Marchesi et al. 2015; Wu et al. 2015). Moreover, Piro et al. (2012) demonstrated that metformin leads to a reduction of enhanced stress protein levels caused by exposure to high levels of free fatty acids in the pancreatic islets of rats.

In our study, we investigated the impact of metformin on the embryonic development and different health indicators of brown trout larvae. Possible embryotoxic effects of the drug were investigated with a modified fish early life stage test with investigative endpoints including mortality, time to hatch, heart rate and growth. Further biomarkers concerning the health of brown trout larvae were the histopathology of the liver, analyses of hepatic glycogen content, stress protein levels, swimming behaviour and the intestinal microbiome. With the aim of revealing the impact of temperature on potential metformin effects, fish were exposed to four concentrations of the antidiabetic drug plus a negative control at two different temperatures (7 °C and 11 °C). Since the mean annual optimal river water temperature for brown trout has been determined to be 9 °C (Hari et al. 2006), we selected two temperatures, one lower (7 °C) and one higher (11 °C), in order to take the change of seasons into account. The exposure experiment was controlled by chemical analysis of the metformin concentration in the exposure medium. The uptake of metformin into test organisms was also characterised.

In the liver of larvae, alterations in tissue integrity were examined by histopathological studies. We also determined the glycogen content in the liver as an important parameter for the energetic status of fish, both by biochemical and histological analyses. Several studies showed that chemicals, including pharmaceuticals, can lead to the depletion of hepatic glycogen in trout as a result of increased energy demand for biotransformation (Braunbeck et al. 1990; Schramm et al. 1998; Triebkorn et al. 2004).

As a general stress marker, the level of heat shock proteins with a weight of 70 kDa (Hsp70) was examined in the heads of fish to investigate whether metformin can change the Hsp70-level of brown trout. Hsp70 proteins belong to the stress protein family and support the folding of unfolded and the refolding of damaged proteins.

As mentioned above, the effects of metformin on the intestinal microbiome are a topic of current interest (Forslund et al. 2015; Wu et al. 2017). Therefore, we studied the microbiome composition in the gut of metformin-exposed brown trout.

In addition, the swimming behaviour of fish (total distance moved and mean velocity) was quantified because changes in the energy supply may also manifest in behavioural alterations.

Overall, our study aimed to investigate whether metformin negatively influences the vitality of brown trout and, if so, whether such health loss is related to changes in the gut microbiome or in carbohydrate metabolism.

## Material and Methods

### Test organisms

For the present study, eggs of brown trout in the eyed-ova stage (48 dpf) were obtained from a commercial fish breeder (trout breeding Lohmühle, D- 72275 Alpirsbach-Ehlenbogen) whose fish breeding is listed as category I (disease-free) according to the EC Council Directive (2006).

### Test substance

Metformin hydrochloride (CAS number: 1115 – 70 – 4) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany; purity 99.9 %; Batch number: BCBP0558V). The substance was readily soluble in water with a water solubility of 16.56 g/L (TOCRIS 2017). The concentrations of metformin investigated in the present study refer to metformin free base ( $C_4H_{11}N_5$ ) and not the hydrochloride.

### Exposure experiments and sampling

Eyed eggs of brown trout (48 dpf, incubation temperature 8 °C) were exposed directly after purchase to five different nominal concentrations of metformin (0, 1, 10, 100, 1000 µg/L) in triplicate at 7 °C and 11 °C in climate chambers. The exposure was conducted in a semi-static system using glass aquaria with 28 test organisms per 10 L aquarium. Thus, in total, 840 individuals were investigated for their development and health. After 57 d (for larvae exposed to 11 °C) and 73 d (for larvae exposed to 7 °C), depending on the developmental status of the brown trout, half of the fish were sampled. These samplings were performed three weeks post-yolk sac consumption. The other half of the fish was sampled after 95 d for brown trout exposed to 11°C and 108 d for those at 7 °C. These samplings took place eight weeks after yolk sac consumption of the larvae.

Twice a week, 50 % of the exposure medium was exchanged for freshly prepared medium. For the preparation of the medium, aerated, filtered tap water (iron filter, active charcoal filter, particle filter) was used. The medium in the aquaria was aerated with air stones (JBL Pro Silent Aeras Micro S2). The light/dark conditions were kept constant during the test with a 10 h/14 h – light/dark cycle. Additionally, the aquaria were shaded from direct light with black plastic foil.

During the experiment, the time to hatch and mortality were recorded every day. The heart rate of fifteen larvae from both the control and the treatment with the highest metformin concentration (1000 µg/L metformin) was counted for 20 s after 21 d of exposure for fish at 11 °C and after 37 d of exposure for fish at 7 °C, when the brown trout were in the finfold resorption phase (step 38/39 according to Killeen et al. (1999)). Therefore, the brown trout larvae were transferred to vessels containing the respective test medium at the respective temperature. For the last eight weeks of exposure, the larvae were fed every day with commercial trout food (INICIO plus from Biomar, Denmark) since their yolk sacs had already been consumed. The defined amount of food was constantly adapted according to the developmental status of the brown trout. Excess food and faeces were removed during the water exchange. Temperature, pH, oxygen content and conductivity were monitored at the beginning and end of the experiment in all treatments as well as at days 21 (11 °C) and 37 (7 °C) of the experiment for the controls and the highest concentration (details in the result chapter and the Supplement, paragraph 3). At the end of the experiment, the fish were euthanised with an overdose of MS 222 (1 g/L tricaine methanesulphonate buffered by  $NaHCO_3$ ) and subsequent severance of the spine. The length and weight of fish as well as possible abnormalities or

injuries were recorded. Due to the small size of the test organisms, the fish were separated into two groups (details in the Supplement, paragraph 10, Fig. S. 3). From the first group, samples for histopathology (liver) and chemical tissue analysis (kidney, muscle, head without gills) were obtained. The second group provided samples for the analyses of hepatic glycogen content (liver), stress protein levels (head) and the intestinal microbiome (gut). Samples for histological analyses were chemically fixed with glutardialdehyde. All other samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

### Chemical analyses

During the experiments, water samples were taken to determine the real metformin concentrations in the test aquaria. Water samples were taken at the beginning (05.01.16) and end of the experiment (11 °C: 08.04.16, after 97 d; and 7 °C: 21.04.16, after 108 d), as well as at different time points (after 10, 41, 63 and 79 d; details in Supplement, paragraph 4, Tab. S. 9 and Tab. S. 10) before and after the water exchanges and stored at -20 °C until processing. At the end of the experiment, tissue samples of muscle, kidney and head without gills were investigated to determine the internal metformin concentration in the fish.

### Analysis of water concentrations by LC-MS

Quantitative measurements of the water samples were performed by LC-MS using a 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a triple quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS: 6490 Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). A Phenomenex LUNA 5 u HILIC 200 A column (150 x 3 mm; 5 µm particle size) was used for separation at a flow rate of 0.5 mL/min and 40 °C. Eluent A was an aqueous buffer with 15 mM ammonium formate and 0.1 % formic acid (FA), while eluent B was acetonitrile (AcN) with 0.1 % FA (all chemicals were purchased from Fisher Scientific, Schwerte, Germany). A gradient elution was performed: using 0-4 min 95 % eluent B, decreasing to 50 % eluent B within 4 min, and then being held for 6 min at 50 % eluent B. After switching back to the starting conditions, the post time was 8 min. The standard metformin hydrochloride (>98 %) was purchased from Tokyo Chemical Industry (TCI, Tokyo, Japan). Individual stock solutions with a concentration of 1 g/L were prepared in a mixture of AcN and water (1:1). All working solutions of the standard for direct injection were prepared in AcN and ultrapure water (10:1). Stock and working solutions were stored in the freezer at -20 °C, except for the aqueous isotopically-labelled metformin-d6 solution (from Toronto Research Chemicals) which was stored at +4 °C.

Samples were kept in the autosampler at 10 °C and the injection volume was 10 µl. All samples had a composition of 90 % AcN and 10 % H<sub>2</sub>O due to dilution (dilution factor between 10 and 500). Calibration was performed between 0.1 µg/L and 10 µg/L in 90 % AcN and 10 % H<sub>2</sub>O with metformin-D6 as an internal standard. The concentration of the internal standard was 1 µg/L in all diluted samples and calibration standards. Quantification of metformin was achieved after LC separation with a 6490 triple quadrupole mass spectrometer using the positive ionisation mode. The electrospray ionisation source with an Agilent Jet Stream technology was operated under the conditions given in Supplement (Tab. S. 1). The recorded data were processed with the software Mass Hunter (Agilent Technologies). For quantification and confirmation, two multiple reaction monitoring (MRM) transitions were monitored for each analyte in the dynamic MRM mode. Details

are given in the Supplement (Tab. S. 2). The limit of quantification was 1 ng/L for metformin. Figures of merit for the analysis method are given in the Supplement (paragraph 1, Tab. S. 3).

#### Metformin analysis in tissue of brown trout larvae by CE-MS

The metformin concentration in the tissue of brown trout fry was determined by capillary electrophoresis – mass spectrometry (CE-MS). Fish samples (from the head (without the gills) to the tail fin, including the kidney and muscle, but not the liver or intestine) originating from all exposure concentrations were analysed. For each exposure group, tissue samples of 21 individuals per treatment were pooled to reach the required detection limits. After the generation of two subsamples per treatment, these were measured to determine methodological precision. For sample preparation, frozen (-20 °C) samples were first homogenised by grinding with a mortar and pestle under liquid nitrogen. A total of 100 mg of the homogenised sample was transferred to an Eppendorf tube; metformin-d6 as an internal standard and methanol as the extraction solvent were added to a final concentration of 291 nmol/L. The tube was vortexed for 30 s and the analytes were extracted under sonication for 15 min. Subsequently, the sample was centrifuged at 13000 g for 15 min. After filtration with a 45 µm PTFE filter (pore size 0.45 µm, Chromafil, Macherey-Nagel, Germany) the samples were directly analysed by CE-MS. Quantification was based on the deuterated internal standard metformin-D6 with a detection limit of 0.6 µg/L. Further details can be found in the Supplement (paragraph 1).

All analyses were performed using an Agilent CE 7100 interfaced to an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany and Santa Clara, CA, USA) with an electrospray ionisation source assisted by the sheath liquid interface. The CE separations were carried out with an uncoated fused-silica capillary (length 80 cm, i.d. 50 µm). The background electrolyte was a mixture of 100 mM ammonium acetate and 3 % glacial acetic acid in methanol. Samples were injected hydrodynamically by applying a pressure of 100 mbar for 10 s. The CE capillary was kept at 25 °C during CE runs and a voltage of +30 kV was applied. Details on the CE-MS method are given in the Supplement (paragraph 1).

#### Histopathological investigation

Liver samples for histological analyses (21 per treatment) were fixed in 2 % glutardialdehyde (25 % solution in water; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) diluted with a cacodylate-sodium buffer (0.1 M, pH 7.6; AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) for at least two weeks. Each liver sample was the whole organ of an individual due to the small size of the fish. For histopathological analyses, fixed liver samples were washed three times for 10 min with the same buffer, dehydrated in a graded series of ethanol and infiltrated with paraffin wax (Parablast, Leica, Wetzlar, Germany) in a tissue processor (TP 1020, Leica). After paraffin embedding, samples were cut into 3 µm slices with a Leica SM 2000 R microtome. There were eight slices per slide from four different planes of the organ. One portion of the slices was stained with hematoxylin-eosin (to visualise the nuclei, cytoplasm, connective tissue and muscles), and the other with alcian blue-PAS (to visualise mucus and glycogen; technical details in the Supplement, paragraph 2). Analyses were conducted with a microscope (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Germany). Slides were first examined qualitatively to gain an overview and identify pathologies. In a second step, the observed pathologies were semi-quantitatively assessed and classified into one of five different categories (1: control, 2: slight reaction, 3: medium reaction, 4: strong reaction, and 5: destruction) according to the criteria

published by Triebkorn et al. (2008). In a further step, all samples were analysed a second time after being blinded and randomised to avoid an observer bias. In addition, all sections were categorised according to their glycogen content (high, medium and low), again in a blinded and randomised manner. A high glycogen content was described by the dark-red staining of glycogen which can be found evenly in the whole liver. A bright-red stain and a partial spread of glycogen in the liver indicated a medium glycogen content. If almost no glycogen was visible, the sample was classified as low glycogen amount.

#### Stress protein analysis

To determine the level of the 70 kD stress protein family (Hsp70) in the fish heads (21 per treatment), the samples were homogenised with a mixture of 98 % extraction buffer and 2 % protease inhibitor (3 ml mixture /g sample) as described by Dieterich et al. (2015). Subsequently, the total protein content in the samples was quantified according to Bradford (1976). To assess the level of Hsp70 proteins, a standardised amount of 40 µg total protein per sample was used for analysis. Using minigel SDS-PAGE, the proteins were separated according to their weight. Subsequently, the proteins were semi-dry blotted onto a nitrocellulose membrane. A primary antibody (monoclonal α-Hsp70 IgG; Dianova Hamburg, Germany), binding specifically to Hsp70 protein, was transferred to the membrane, followed by a second antibody (peroxidase-coupled α-IgG; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) binding to the first. Finally, the membranes were stained with 4-chloro-1-naphthol, and the optical volume (=band area x average grey scale value) was quantified relative to an internal standard (brown trout whole body homogenate).

#### Glycogen analysis

For quantification of the glycogen content, the glycogen assay from Sigma-Aldrich (MAK016; Steinheim, Germany) was used. Liver samples (number of individuals per treatment in Fig. 4) were homogenised with bi-distilled water (10 µl/mg tissue) on ice. Then, the samples were heated to 97 °C for 5 min to inactivate enzymes and centrifuged (Eppendorf 5424R) for 5 min at 13000 g at 4 °C. Before conducting the assay, the supernatants of the samples were diluted 1:15 with bi-distilled water. For the assay, 96-well plates were used. Glycogen standards (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 1.8, 2.0 µg/well) and liver samples were tested in duplicate. Then, 2 µl of a hydrolysis enzyme mix was added per well. In addition to the duplicates per sample, each sample was also pipetted without the hydrolysis enzyme mix (sample blank) to determine the background signal caused by glucose in the sample. The plate was incubated for 30 min at room temperature on a shaker. After adding 50 µl of the master reaction mix (containing 46 µl development buffer, 2 µl development enzyme mix and 2 µl fluorescent peroxidase substrate) per well, the plate was covered in aluminium foil and incubated for 30 min on a shaker at room temperature. Measurements were then conducted in a photometer (BioTek Instruments ELx800G, USA) at 570 nm.

#### Analyses of swimming behaviour

The swimming behaviour of the test organisms was assessed after 90 d of exposure at 11 °C and after 102 d of exposure at 7 °C. Therefore, five individuals per replicate (15 individuals per treatment) were transferred into smaller square aquaria (17 cm edge length) containing 300 ml of the respective test medium with the respective temperature. The fish tracking system was placed in the 11 °C climate chamber and the cameras were adjusted for this set up. Therefore, brown trout larvae were recorded in the 11 °C climate chamber when exposed previously to either 11 °C or 7 °C. From each



replicate of the five exposure groups, five larvae were kept in one aquarium. After acclimation for 2 min, the swimming behaviour of fish was recorded for 18 min with a digital camera (Basler acA1300-60gm camera, 1.3 MP resolution, Basler AG, Ahrensburg, Germany). The swimming behaviour was recorded in four aquaria simultaneously and analysed with respect to the total distance moved as well as the mean velocity of each individual using EthoVision 11.5 (Noldus, Wageningen, Netherlands) software. Therefore, the centre-point of the fish was tracked. After acquisition of the data, a correction of identity swaps between the tracked fish was accomplished with the Track Editor of EthoVision.

### Intestinal microbiome

For investigations of the intestinal microbiome of the test organisms, DNA was extracted from gut mucus samples and analysed via 16S amplicon-sequencing. Prior to the preparation of DNA extraction, the guts of the fish were squeezed out and washed with 50 µl sterile water to ensure that the gut content were completely removed. This step was necessary because the mucus is closely associated with microvilli in the gut (Ringø et al. 2001) and therefore more relevant for the host-symbiont-relationship and -communication than the allochthonous microbiome in the gut content. Due to the young age of the fish, the guts were too small to rinse with peptone water to extract the adherent bacteria of the mucus; therefore, the whole gut was used for analysis (Ringø 1999). The limited lab capacity only allowed us to analyse two pooled samples per treatment (each pooled sample contained three guts) for the exposure at 11 °C and a single pooled sample per treatment for the exposure at 7 °C. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The DNA was eluted in 50 µl of DNase-free water solution (MP Biomedicals Germany GmbH; Eschwege, Germany) and quantified via NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The V1-V2 region of the 16S rRNA gene was amplified using 27F and 338R primers as described previously by Camarinha-Silva et al. (2014). The forward primer contains a 6-nt barcode and a 2-nt CA-linker. Both primers comprised sequences complementary to the Illumina-specific adaptors to the 5'-ends. Amplification was performed in a total volume of 50 µl with 10x polymerase chain reaction (PCR) buffer, each containing dNTPs at a concentration of 10 mM, primers at a concentration of 0.4 µM, 1 µl of template DNA, and 0.25 µl HotStarTaq Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). An initial denaturation step at 96 °C for 3 min was followed by 15 cycles of the following procedure: denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 45 s. One microlitre of this reaction mixture served as the template for a second PCR, which was performed with the conditions described above, but with 20 cycles, using primers designed to integrate the Illumina-multiplexing sequences and indices. Non-template controls were used. All were free of any amplification products after both PCRs. PCR amplicons were verified by agarose gel electrophoresis and quantified with the Qubit fluorometric quantitation assay (Invitrogen, Carlsbad, USA). Sequencing was carried out on the Illumina MiSeq system using v3 chemistry with 2x301 cycles. Sequences were demultiplexed using a custom Perl script and processed with the Mothur platform (Schloss et al. 2009) according to the MiSeq SOP published by Kozich et al. (2013). Briefly, sequences were filtered by removing sequences with ambiguous base calls and homopolymers longer than 12 nt and aligned with the Silva database v128 (Quast et al. 2012). Chimeric sequences were removed using the VSEARCH algorithm (Rognes et al. 2016) and sequences were pre-clustered allowing for 3 mismatches. Finally, sequences were classified using Silva v128 taxonomy and operational taxonomic units (OTU) were picked at a 97 % identity level. Low-abundance OTU were removed to reduce the number of spurious OTU.

## Statistical analysis

Statistics were analysed with JMP 12 from SAS (Cary, NC, USA). If necessary, data were squared to achieve normal distribution and homoscedasticity. This transformation was done for the data of the biochemical glycogen analysis and the stress protein analysis at 11 °C. The analyses of survival time and time to hatch were conducted with COX-regression. The data of the semi-quantitative histological examination of the tissue and the glycogen content were checked for significance with the likelihood ratio test. All other parameters were analysed with a nested ANOVA using the replicate aquaria as a nesting factor, followed by Dunnett's post-hoc test. For the statistical analysis of the stress protein level, the total distance moved and the mean swimming velocity at 11 °C, a Welch-ANOVA was performed since the data could not be transformed to reach homoscedasticity. In the results section, the statistical test used and the p-value are shown. Further information (e.g. degrees of freedom and F-value) is given in the Supplement (paragraph 11, Tab. S. 15). The  $\alpha$ -level was set to 0.05. Because we had no replicate climate chambers for 7 °C and 11 °, we refrained from statistically comparing the results obtained at the two temperatures to avoid the problem of pseudoreplication. Because of the limited number of examined replicates, data obtained for the intestinal microbiome were not statistically checked for significance. In both cases, we restricted comparisons to qualitative aspects.

## Credibility of data

Details about the fulfilment of the criteria for reporting and evaluation of ecotoxicity data (CRED) according to Moermond et al. (2016) are given in the supplementary material (paragraph 9, Tab. S. 13). CRED helps to improve the reproducibility, consistency and transparency of reliability and relevance criteria of ecotoxicity studies (Moermond et al. 2016).

## **Results**

### Water Quality Parameters

Temperature, pH, oxygen content and conductivity were measured at the beginning and end of the experiments (for 7 °C: mean temp.=7.16 ± 0.30 °C, mean pH=8.05 ± 0.33, mean oxygen=10.54 ± 0.16 mg/L, mean conduct.=410.43 ± 20.29 µS/cm; for 11 °C: mean temp.=10.74 ± 0.23 °C, mean pH=8.03 ± 0.13, mean oxygen=9.75 ± 0.15 mg/L, mean conduct.=431.03 ± 8.51 µS/cm). Further details of the water quality parameters are given in the Supplement (paragraph 3).

### Exposure conditions

The quantification of metformin in the test medium revealed a good accordance between the nominal and the measured metformin concentrations in our experiment; the recovery was above 80 %. Therefore, we refer to the nominal concentrations throughout the entire study. The real concentrations were shown to be slightly lower than the nominal concentrations (Table 1).

In Figure 1, the tissue concentrations of metformin in brown trout larvae are plotted against the measured exposure concentrations (for data, also see Table 1). Internal metformin concentrations were in the ng/g range. At nominal concentrations of the exposure medium below 10 µg/L, tissue metformin concentrations were below the limit of detection. The measured metformin tissue concentrations of brown trout larvae exposed to 1000 µg/L were higher at 11 °C compared to 7 °C.

For the test organisms exposed to 10 and 100 µg/L, the metformin tissue concentrations did not differ between the temperatures in the respective exposure groups.

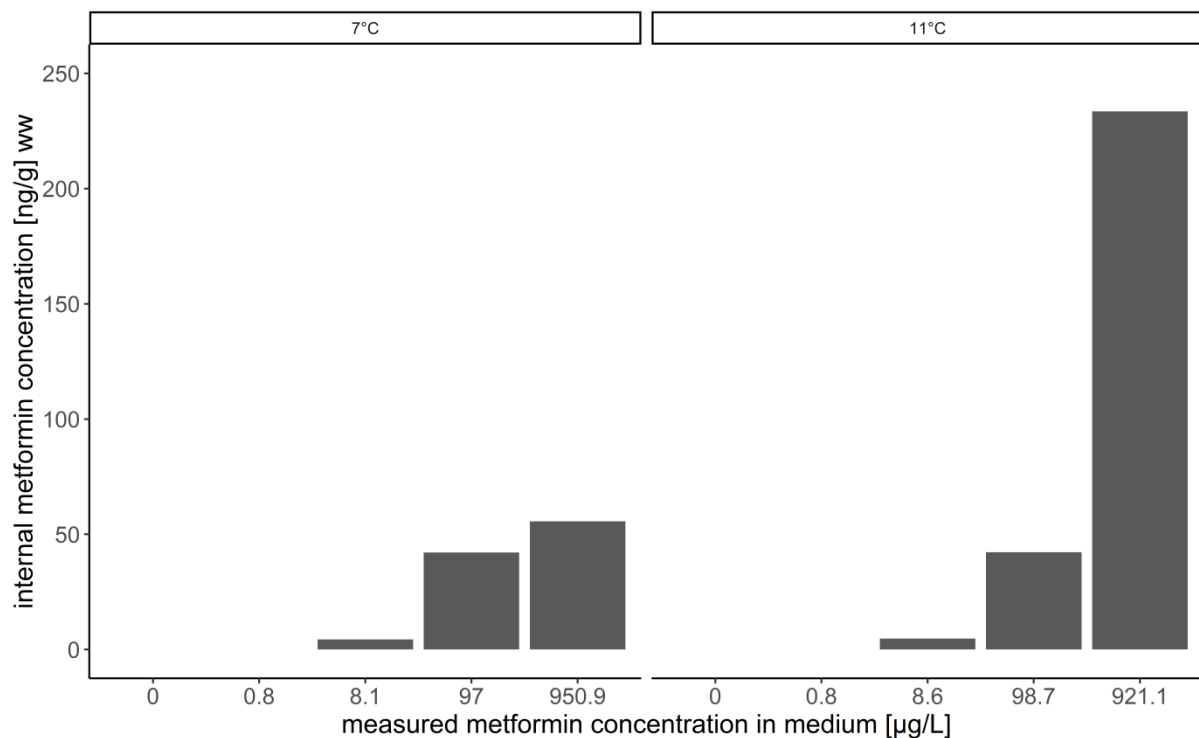


Figure 1: Internal metformin concentration in brown trout larvae after 95 d of exposure at 11 °C and 108 d at 7 °C [ng/g] wet weight vs. measured concentration in water [µg/L]. At nominal water concentrations of 0 and 1 µg/L metformin, the internal metformin concentrations were below the limit of detection.

#### Investigated developmental and health parameters

In all exposure groups, mortality was between 0.67 % and 4.0 % (Table 1) (COX-regression: 7 °C:  $p=1$ ; 11 °C:  $p=1$ ). Mean time to hatch did not differ between the exposure groups, at either 7 °C or 11 °C (COX-regression: 7 °C:  $p=0.4966$ ; 11 °C:  $p=0.5853$ ). Concerning the temperature, the mean time until hatching was about four days earlier at 11 °C compared to 7 °C for controls. The heart rate did not reveal any differences between the negative control and the highest metformin concentration (nested ANOVA: 7 °C:  $p=0.1590$ ; 11 °C:  $p=0.5905$ ) at both temperatures. However, the heart rate of control fish at 11 °C was about 21 beats per minute higher than that in control fish at 7 °C.

#### Body length and weight

For body weight, the statistical analysis revealed a difference between treatments at 7 °C and 11 °C (nested ANOVA: 7 °C:  $p<0.0001$ ; 11 °C:  $p=0.0137$ ) with weights of brown trout exposed to metformin concentrations of 10 and 100 µg/L being lower compared to the negative control (Dunnett's test: (0 µg/L|10 µg/L):  $p= 0.0072$ , (0 µg/L|100 µg/L):  $p= 0.0353$ ). Also, fish exposed to 1 µg/L metformin at 11 °C weighed less than the negative control (Dunnett's Test: (0 µg/L|1 µg/L):  $p= 0.0051$ ). Statistical analyses for the body length did not show any differences between the treatments at both temperatures (nested ANOVA: 7 °C:  $p=0.0251$  (with Dunnett's Test:  $p> 0.05$ ); 11 °C:  $p=0.9296$ ). In general, the brown trout larvae exposed to 11 °C had a higher body weight and length than the larvae exposed at 7 °C.

### Stress protein analyses

Neither the temperature nor metformin had an influence on the level of the stress protein Hsp70 in brown trout larvae (Table 1) (7 °C: nested ANOVA:  $p=0.6287$ ; 11 °C: Welch ANOVA:  $p=0.1721$ ).

### Histological investigations

In general, the liver tissue of the larvae were classified as category 1, 2 or 3 and did not show any strong histopathological alterations or severe damage of the tissue. In most livers, cells appeared large with a bright cytoplasm (Figure 2 A & B) containing high amounts of glycogen (Figure 2 C). Nevertheless, a number of individuals also had livers with small hepatocytes (Figure 2 D & E) and a low glycogen content (Figure 2 F). Small agglomerations of macrophages occurred in a few fish livers in all treatments, but further pathological changes could not be observed (further details in the Supplement, Tab. S. 9 and Tab. S. 10). The most prominent symptom was a modification of the glycogen content. Therefore, this parameter was crucial for the assessment values that have been allocated to the respective samples after semi-quantitative evaluation.

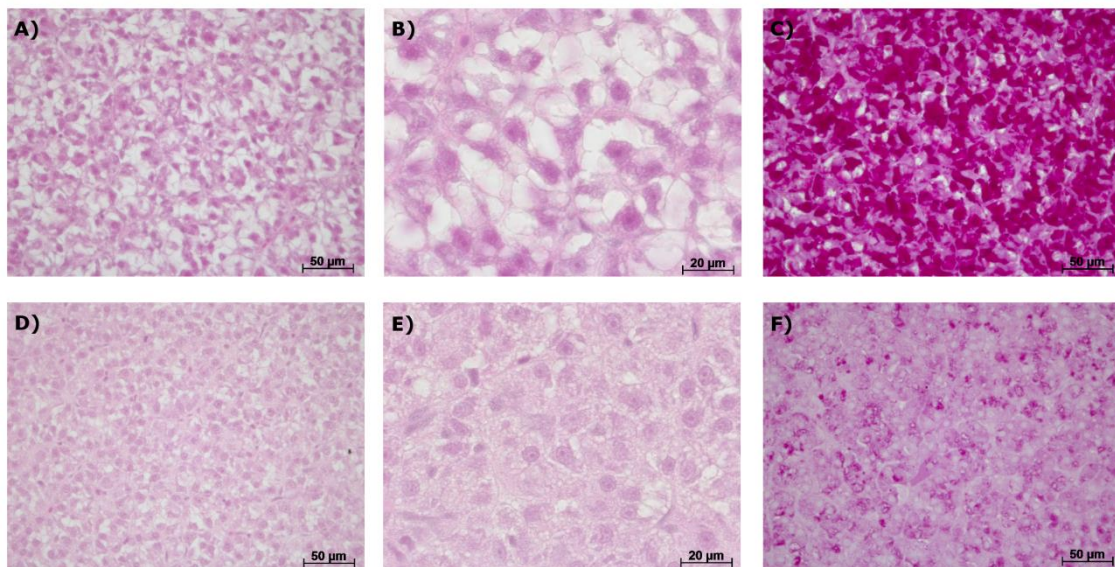


Figure 2: Representative sections of liver tissue of brown trout fry: A-C: Control fish, D-F: fish exposed to 100 µg/L metformin. The controls showed large hepatocytes with high amounts of glycogen (stained with alcian blue-PAS in section C). Livers of fish exposed to metformin showed small hepatocytes with low glycogen amount (low staining intensity with alcian blue-PAS in section F). Sections A, B, D and E were stained with haematoxylin-eosin.

### Histological and biochemical glycogen analyses

A qualitative comparison of the control individuals to determine whether temperature had an influence on the hepatic glycogen level revealed, for both histological examination and biochemical analysis, no difference between 7 °C and 11 °C. The histological examination showed that the liver glycogen amount was categorised as 'high' for 10 individuals, 'medium' for 5 and 'low' for 3 individuals at 7 °C. At 11 °C, there were 9 individuals with a glycogen content classified as 'high', 5 with a 'medium' glycogen amount and 3 with a 'low' one. Focussing solely on the effect of the drug, more individuals of the exposure groups with 1-100 µg/L metformin showed a hepatic glycogen content which was categorised as 'high' compared to the respective control group at 7 °C, especially for 1 µg/L (Figure 3). At 11 °C, in contrast, such a relationship between metformin exposure and a 'high' glycogen content was not clear, but more individuals of the exposure groups with 1-100 µg/L metformin show a hepatic glycogen content which was categorised as 'medium' compared to the respective control group, again particularly at 1 µg/L; however, these differences were not significant (Likelihood-Ratio  $\chi^2$  test: 7 °C:  $p=0.5211$ ; 11 °C:  $p=0.3769$ ).

Also biochemical glycogen measurements (Figure 4) revealed an increase of glycogen content in the livers of metformin-exposed larvae when compared to the control. At 11 °C, this difference was significant only for the lowest concentration, but the trend was also visible at 7 °C with a p-value slightly higher than 0.05 (nested ANOVA: 7 °C:  $p=0.0620$ ; 11 °C:  $p=0.0085$  (with Dunnett's Test: (0 µg/L|1 µg/L):  $p=0.0024$ )).

For the intermediate concentrations of metformin (10 and 100 µg/L), the biochemical assay revealed an increased glycogen content compared to the controls, however, the effect was not as strong as for the lowest metformin concentration. In fish exposed to 11 °C, the glycogen content in the 100 µg/L metformin exposure group was distinctly lower compared to the 1 µg/L metformin treatment. However, at the highest concentration (1000 µg/L) the inter-individual variation of the glycogen amount within the exposure groups was rather high. The observed variation in glycogen content was visible with the histological and biochemical method.

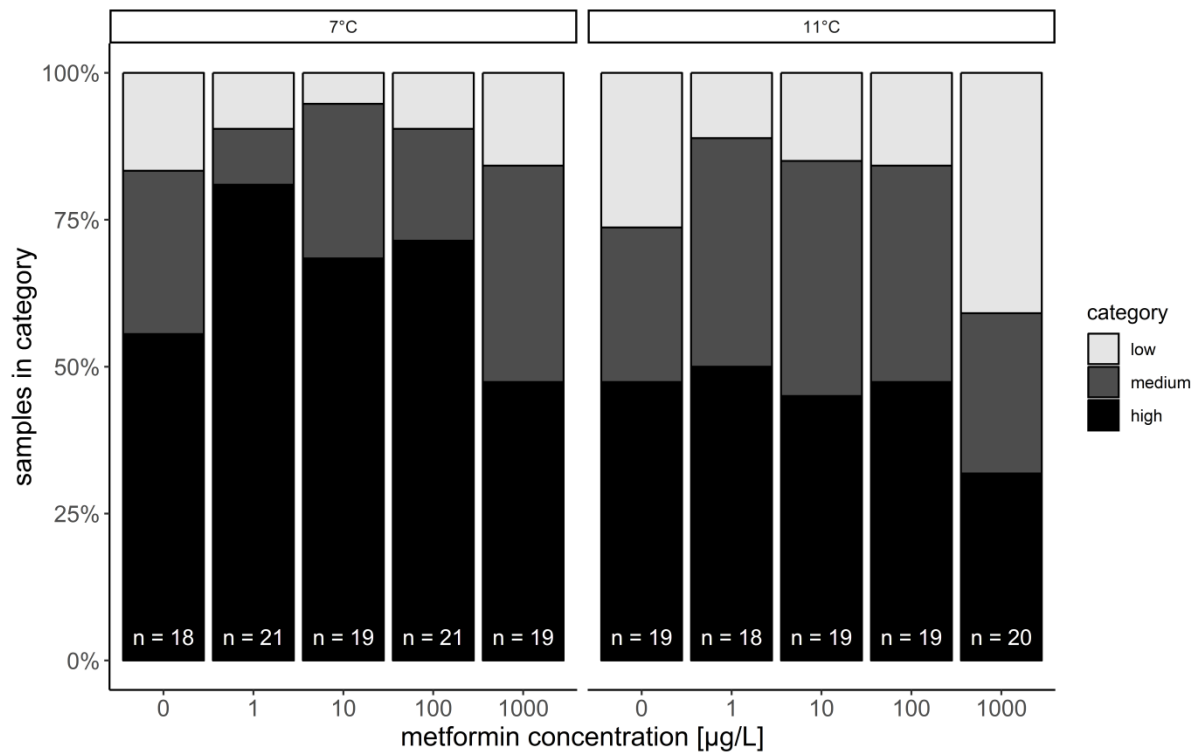


Figure 3: Semi-quantitative histological examination of the glycogen amount in the liver of brown trout larvae exposed to metformin at 7 °C and 11 °C categorised in low, medium and high glycogen content (Likelihood-Ratio  $\chi^2$  test: 7 °C:  $p=0.5211$ ; 11 °C:  $p=0.3769$ ). The number n of examined fish individuals is indicated in the bars.

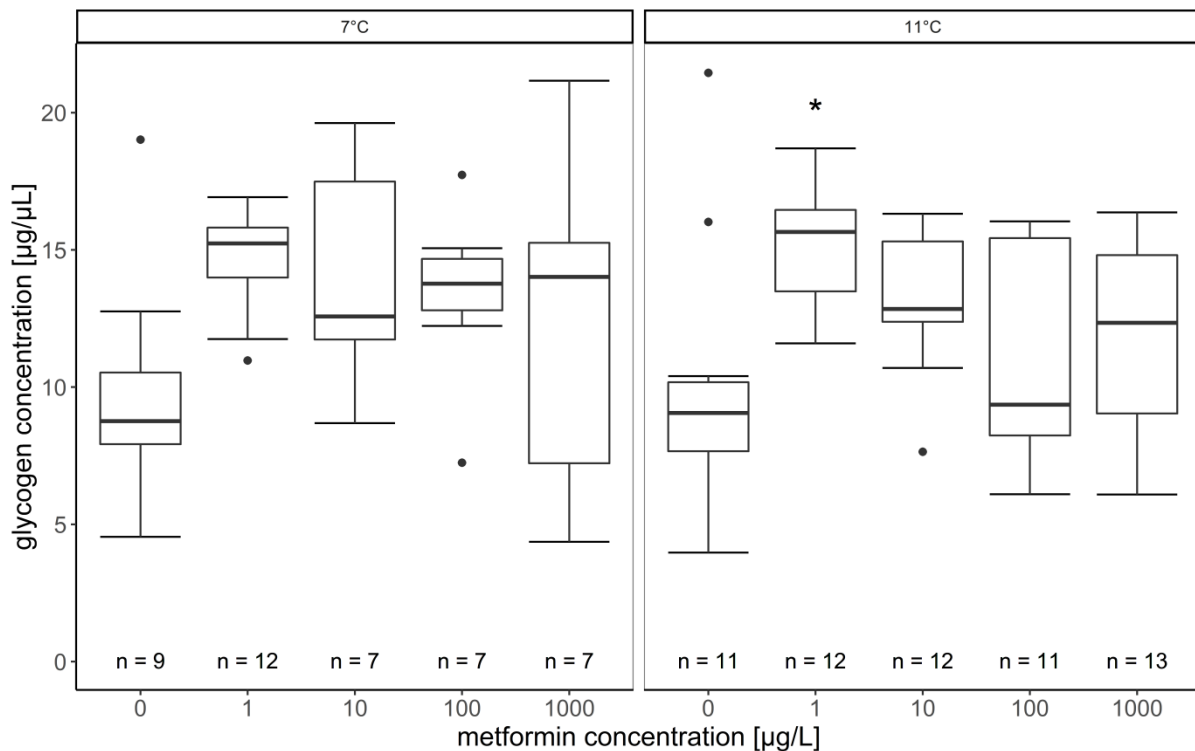


Figure 4: Hepatic glycogen content (measured with the biochemical glycogen assay) of brown trout fry exposed to metformin at 7 °C and 11 °C; the number n of examined fish individuals is indicated (reduced number of samples due to pre-tests and exclusion of values out of calibration curve). The line within the boxes represents the median, the boxes are bordered by the 25 % to 75 % quartiles, the whiskers show the minimum and maximum values, the black dots are outliers. The asterisk indicates a significant difference compared to the respective control at the p=0.05 level (nested ANOVA: 7 °C: p=0.0620; 11 °C: p=0.0085 (with Dunnett's Test: (0 µg/L | 1 µg/L): p=0.0024)).

#### Behavioural analyses

The temperature of the test medium was shown to have an effect on the swimming behaviour of brown trout. Control fish that had not experienced metformin and were kept at 7 °C swam about 700 cm further in 18 min than control fish exposed at 11 °C. Also the velocity was about 0.6 cm/s higher at 7 °C compared to 11 °C. Concerning the effect of metformin solely, there was no difference of distance moved (7 °C: nested ANOVA: p=0.9216; 11 °C: Welch ANOVA: p=0.9690) and velocity (7 °C: nested ANOVA: p=0.9215; 11 °C: Welch ANOVA: p=0.9690) between the exposure groups, either at 7 °C or at 11 °C.

Table 1: Measured metformin concentrations in medium and tissue, mortality, biometric data, biochemical, developmental and behavioural parameters of brown trout larvae exposed to metformin.

|                                                  | 7 °C             |                   |                   |                   |                  |  | 11 °C            |                  |                  |                  |                  |  |
|--------------------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--|
|                                                  | 0 µg/L           | 1 µg/L            | 10 µg/L           | 100 µg/L          | 1000 µg/L        |  | 0 µg/L           | 1 µg/L           | 10 µg/L          | 100 µg/L         | 1000 µg/L        |  |
| Treatment (nominal metformin concentrations)     |                  |                   |                   |                   |                  |  |                  |                  |                  |                  |                  |  |
| Measured metformin water concentrations [µg/L]   | <LoQ             | 0.8 ± 0.2         | 8.1 ± 0.5         | 97.0 ± 11.4       | 950.9 ± 108.1    |  | <LoQ             | 0.8 ± 0.2        | 8.6 ± 0.9        | 98.7 ± 5.2       | 921.1 ± 106.4    |  |
| Metformin tissue concentration [ng/g] wet weight | < LoQ            | <LoQ              | 4                 | 42                | 56               |  | < LoQ            | < LoQ            | 5                | 42               | 234              |  |
| Mortality [%]                                    | 2.0 ± 1.6        | 0.7 ± 0.9         | 1.3 ± 0.9         | 1.3 ± 0.9         | 1.3 ± 0.9        |  | 3.3 ± 2.5        | 1.3 ± 0.9        | 4.0 ± 2.8        | 2.7 ± 0.9        | 0.7 ± 0.9        |  |
| Heart rate [bpm]                                 | 77.4 ± 7.0       | n.e.              | n.e.              | n.e.              | 74.4 ± 6.2       |  | 98.2 ± 12.2      | n.e.             | n.e.             | n.e.             | 100.6 ± 10.8     |  |
| Mean time to hatch [dpf]                         | 54.5 ± 2.5       | 54.8 ± 2.7        | 53.9 ± 2.8        | 54.1 ± 3.0        | 54.6 ± 2.8       |  | 51.4 ± 1.2       | 51.4 ± 1.4       | 51.4 ± 1.4       | 51.0 ± 1.1       | 51.2 ± 1.3       |  |
| Body weight [g]                                  | 0.545 ± 0.09     | 0.506 ± 0.09      | 0.480 ± 0.09 *    | 0.491 ± 0.09 *    | 0.566 ± 0.09     |  | 0.959 ± 0.26     | 0.769 ± 0.29 *   | 0.902 ± 0.25     | 0.885 ± 0.23     | 0.829 ± 0.26     |  |
| Body length [cm]                                 | 3.5 ± 0.2        | 3.4 ± 0.2         | 3.5 ± 0.2         | 3.5 ± 0.2         | 3.6 ± 0.2        |  | 4.2 ± 0.4        | 4.2 ± 0.5        | 4.2 ± 0.4        | 4.3 ± 0.4        | 4.2 ± 0.4        |  |
| Hepatic glycogen content [µg/µl]                 | 9.75 ± 3.94      | 14.75 ± 1.77      | 14.19 ± 3.84      | 13.38 ± 2.97      | 12.07 ± 5.65     |  | 10.07 ± 4.55     | 15.28 ± 2.13 *   | 13.25 ± 2.41     | 11.04 ± 3.60     | 11.78 ± 3.37     |  |
| Hsp70 level [rel. grey value]                    | 1.05 ± 0.24      | 0.99 ± 0.13       | 1.07 ± 0.20       | 1.03 ± 0.19       | 0.97 ± 0.19      |  | 1.04 ± 0.27      | 0.95 ± 0.25      | 0.97 ± 0.15      | 0.87 ± 0.23      | 0.88 ± 0.21      |  |
| Total distance moved [cm]                        | 2119.49 ± 664.19 | 2321.80 ± 1020.74 | 2407.21 ± 1034.18 | 2218.53 ± 1087.29 | 2321.57 ± 695.89 |  | 1414.14 ± 889.91 | 1337.55 ± 388.98 | 1461.24 ± 515.14 | 1464.91 ± 582.54 | 1437.23 ± 515.47 |  |
| Mean velocity [cm/s]                             | 1.96 ± 0.62      | 2.15 ± 0.95       | 2.23 ± 0.96       | 2.06 ± 1.01       | 2.15 ± 0.64      |  | 1.31 ± 0.82      | 1.24 ± 0.36      | 1.35 ± 0.48      | 1.36 ± 0.54      | 1.33 ± 0.48      |  |

All data except for the analytical tissue measurements are shown as arithmetic means ± standard deviation (SD). For the measurement of the tissue concentration, details of the method variation are given in the Supplement (Tab. S. 4). Heart rate was only evaluated for the negative control and the highest metformin concentration, so no evaluation took place for 1, 10 and 100 µg/L. Asterisks (\*) indicate significant differences compared to the respective control at the p=0.05 level; LoQ = limit of quantification; n.e.= not evaluated; bpm = beats per minute; dpf = days post fertilisation;



## Microbiome analyses

The microbiome analysis includes 162290 sequences, classified into 773 operational taxonomic units (OTU). In total, 98.7 % of these sequences belonged to the four dominant phyla, Proteobacteria (63.6 %), Firmicutes (15.2 %), Actinobacteria (16.5 %) and Bacteroidetes (3.4 %) comprising a total of 705 OTU. Keeping the low replicate number of samples in mind, fish exposed to 1 and 10  $\mu\text{g/L}$  metformin at 7 °C and to 100  $\mu\text{g/L}$  metformin at 11 °C seem to hold an intestinal microbiome with a different composition than that of the respective control fish: The proportion of the Proteobacteria in those individuals exposed to these two metformin concentrations was found to be increased compared to the control, whereas the proportion of the Firmicutes and Actinobacteria was reduced (Figure 5).

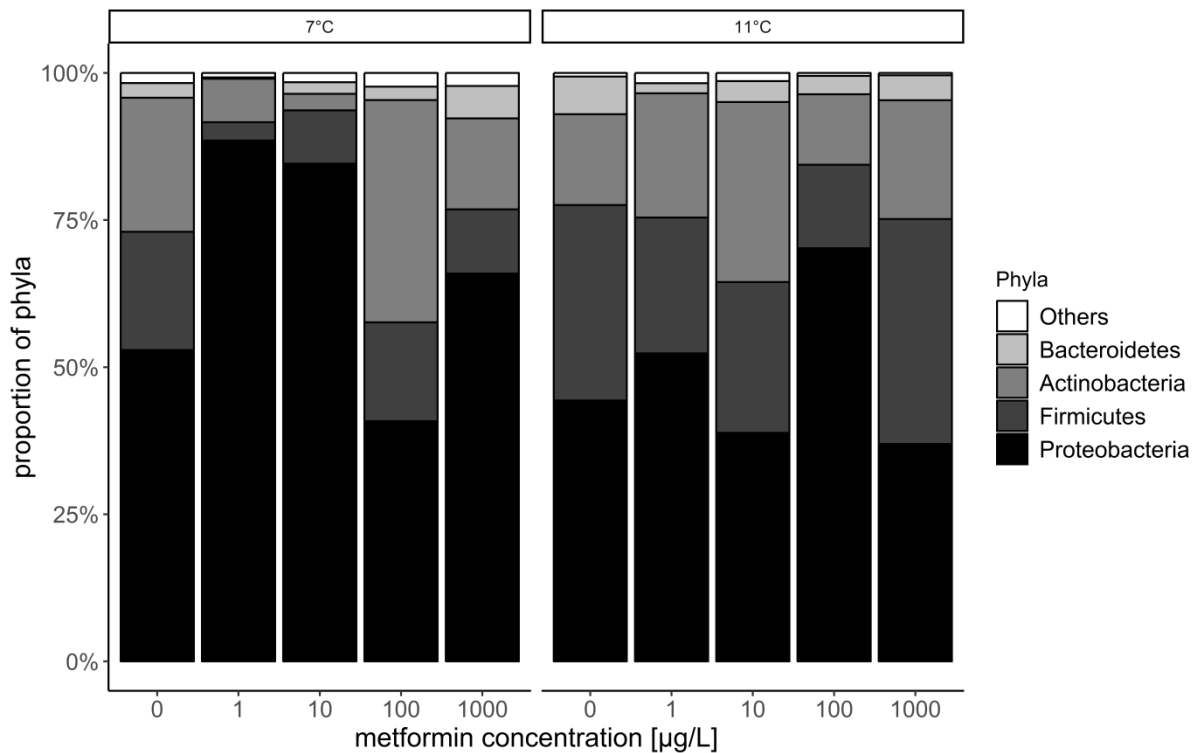


Figure 5: Composition of the intestinal microbiome of brown trout fry exposed to metformin at 7 °C and 11 °C. The analysis focuses on the four dominating phyla in the gut: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes.

## Discussion

In the present study, the impact of the antidiabetic drug metformin on the development and health of brown trout larvae was investigated at 7 °C and 11 °C. The parameters focussing on development, such as heart rate and time to hatch, did not show any effects of metformin. Also mortality, stress protein levels, tissue integrity of the liver, body length and swimming behaviour were not influenced by metformin. However, an environmentally relevant concentration of 1  $\mu\text{g/L}$  metformin led to a significantly enhanced liver glycogen content in brown trout larvae and a concentration range of 1-100  $\mu\text{g/L}$  significantly decreased the body weight of the larvae. In the same concentration range, the investigation of the gut microbiome indicated a shift in the bacterial community. The observed metformin induced changes did not follow a linear concentration effect relationship.

The chemical analysis of the larval tissue showed a concentration-dependent presence of metformin with temperature having an effect on the presence of the drug in the tissue. In particular for the highest metformin concentration, the tissue concentration of the drug was higher in fish exposed to 11 °C compared to the lower temperature which could be caused by an enhanced metabolism and uptake of metformin at higher temperatures. Several studies with mice and humans consuming metformin made it clear that the highest concentrations of metformin in the body can be found in the gastrointestinal tract, kidney and liver (Beckmann 1969; Graham et al. 2011; Paleari et al. 2018; Wilcock and Bailey 1994). Since the samples used for the chemical analysis only contained kidney, muscle and head without gills, but not liver or gut, the measured metformin concentrations in the tissue of our test organisms were most likely dominated by metformin in the kidney – assuming a similar distribution of metformin in fish as in human or mice. However, additional tissue samplings would have been necessary to determine whether the maximal tissue uptake capacity for metformin has already been reached at the end of the experiment. Also, one has to keep in mind that we could not show possible variations between the individual test organisms since the tissue samples were pooled per treatment.

In our study, metformin did not have any effect on mortality and the development of brown trout, since even sensitive endpoints such as the heart rate and mean time to hatch did not differ between the treatments. Consequently, metformin is not embryotoxic for brown trout. This assumption is supported by EMA (2011) cited by Moermond and Smit (2016). In this report, no effects of metformin on hatching rate, time to hatch and mortality in an early-life stage test with zebrafish could be displayed leading to a no observed effect concentration (NOEC) of  $\geq 10$  mg/L for metformin. Ussery (2018) showed that metformin did not influence mortality, hatch success or time-to-hatch of Japanese medaka exposed to 1-100  $\mu\text{g/L}$  metformin for 28 d. Likewise, an effect of the drug on the body length could not be observed in our experiment whereas the weight of brown trout larvae was found to be reduced when exposed to 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  metformin at 7 °C and 1  $\mu\text{g/L}$  at 11 °C. This result reflects the use of the antidiabetic as a weight loss drug in human at doses of 1.5 to 2.5 g/d (Malin and Kashyap 2014; Seifarth et al. 2013). As a potential mechanism responsible for metformin-induced weight loss in humans, the downregulation of appetite by attenuating the activity of the adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) in the hypothalamus has been proposed by Malin and Kashyap (2014). In the gastrointestinal tract, metformin increases the secretion of glucagon-like peptide 1 (GLP-1), a hormone which functions as satiation signal by decreasing the AMPK activity (Malin and Kashyap 2014). Moreover, two studies with fish also detected a reduction in weight at concentrations similar to those in our experiment. Niemuth and Klaper (2015) showed that fathead-minnows weighed less when exposed to 40  $\mu\text{g/L}$  metformin. Ussery (2018) demonstrated that metformin decreased the weight and length of 28 d old Japanese medaka at concentrations of 1-100  $\mu\text{g/L}$ . In contrast, in the assessment report mentioned above (EMA 2011) the growth of zebrafish was not influenced by metformin.

The histopathological investigations revealed that the livers of the test organisms did not show pathological changes except for marginal macrophage agglomerations which occurred in a few animals only, but not consistently in a particular treatment. Thus, an effect of metformin on the tissue integrity of brown trout liver can be excluded.

It was expected that glycogen storage is lower at 11 °C than at 7 °C, as energy demands for maintenance and activity are increased at higher temperatures (Weatherley and Gill 1987). However, a qualitative comparison of the control individuals of the high and low temperature did not reveal a

difference in the hepatic glycogen content. Likewise, Barton and Schreck (1987) showed that the glycogen content of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) acclimated to 7.5 °C, 12.5 °C and 21.0 °C was reduced more at higher temperatures after being exposed to a stressor, but was restored to the same level in all temperature groups after a certain time. With respect to the influence of metformin on glycogen storage in the liver, the biochemical analysis showed that the lowest metformin concentration (1 µg/L) resulted in a high hepatic glycogen level and the histological examination indicated a similar trend. This finding can be explained by a limitation of metformin-triggered glycogenolysis which is one aspect of the therapeutic effect of this drug in humans (Cusi et al. 1996; Giannarelli et al. 2003; Wiernsperger and Bailey 1999). With both methods, a high variability of the glycogen content in the livers of fish exposed to 1000 µg/L metformin became obvious. The low hepatic glycogen content in this exposure group could be caused by energy demanding processes induced by metformin resulting in a reduction of the liver glycogen or the reduced uptake of metformin in the liver so the drug could not fully exert its pharmaceutical effect. To date, we do not have a more detailed explanation for this finding.

The stress protein levels did not differ between the metformin-treated fish or between the controls exposed at the two temperatures. It is known that high base loads of stress proteins occur in developing organisms (Lindquist 1986; Peragon et al. 2001) due to a high demand for the chaperones needed for correct protein folding. The high base level of Hsp70 in larvae compared to adult fish – as previously shown by Murtha and Keller (2003) for *Danio rerio* - could conceal the effects of metformin, as described by Piro et al. (2012), and temperature. To clarify whether or not metformin leads to a reduction in the stress protein level in brown trout, the Hsp70 level of older fish should be investigated. In a recent experiment conducted with eight month-old brown trout, we were able to show that metformin did not influence the Hsp70 level, even in those fish (fish head was analysed, unpublished data, in the Supplement Fig. S. 1). Therefore, metformin probably does not have a reducing effect on the Hsp70-level in brown trout, but this cannot be excluded since we investigated the head in contrast to the pancreas, as in in the study of Piro et al. (2012).

The swimming behaviour of fish was not influenced by metformin. Although analyses regarding the energy status of the brown trout (hepatic glycogen content) showed a difference between the treatments, this effect was not reflected by behavioural parameters (distance moved and velocity). The study of Godoy et al. (2018) also showed that the swimming behaviour of zebrafish was not influenced by metformin in comparable concentrations of 50 and 500 µg/L. Concerning the behavioural parameters, one can expect that animals exposed at higher temperatures move faster than those exposed at lower temperatures. The results for behaviour are not consistent with this expectation as we observed a higher activity of the larvae exposed at 7 °C. Since the EthoVision-system was installed in the climate chamber which was set to 11 °C, the higher ambient temperature during the record and the acclimatisation time could pose an additional stress factor and result in a higher swimming activity of these test organisms which were originally exposed at 7 °C.

Microbiological analyses indicated an effect of metformin on the intestinal microbiome of brown trout larvae, but this result must be verified by the analyses of the other replicates. Low to medium (1 & 10 µg/L at 7 °C and 100 µg/L at 11 °C) metformin concentrations led to a shift in the composition of the bacterial community of brown trout larvae which was also shown for mice and human (Forsslund et al. 2015; Lee and Ko 2014; Shin et al. 2014; Wu et al. 2017). These effects of metformin on the microbiome are most likely caused by an accumulation of the drug in the intestine as shown by several studies (Bailey et al. 2008; Graham et al. 2011; Wilcock and Bailey 1994). In a parallel

experiment conducted with 12 month-old brown trout, we were able to show that the amount of metformin per g tissue in the gut is about three to sixty times higher than in the kidney, liver or fillet (unpublished data, in the Supplement, paragraph 8, Fig. S. 2); however, it cannot be excluded that the measured metformin concentrations in the gut samples were influenced by metformin in the gut content, and not only determined by the presence of the drug in the tissue of the intestine. The different effect concentrations of the two temperatures could be explained with respect to the temperature preferences of the bacteria. Concerning the negative controls at the two temperatures, the proportion of Firmicutes was increased at 11 °C compared to 7 °C, whereas the proportion of Proteobacteria and Actinobacteria was decreased at 11 °C compared to 7 °C. Generally, a functional interpretation of the changes in the microbial community is not yet possible. Future analyses will focus on the presence of facultative-pathogenic bacteria with relevance for brown trout (e.g. Enterococci, Aeromonads) and the presence of species-specific virulence genes to determine whether and how the observed changes in the gut microbiome can affect the immune system and vitality of brown trout. Forslund et al. (2015) have already described the increased expression of virulence factors and gas metabolism genes owing to metformin-associated shifts in the human gut microbiome. These shifts in the intestinal microbiome may have an indirect impact on the immune system (Pollak 2017).

Generally, the observed effects of metformin in brown trout concerning body weight, liver glycogen and the intestinal microbiome did not follow a linear concentration-effect relationship. However, a profound mechanistic explanation for this finding cannot be provided since the pharmaceutical action of the drug is still not fully elucidated.

Scheen (1996) and Graham et al. (2011) indicated that metformin shows non-linear pharmacokinetics caused by a reduced bioavailability at higher doses. Moreover, Chung et al. (2018) revealed that effects on glycaemia did not linearly increase with higher doses of metformin in humans. The results of these studies led to the assumption that a similar phenomenon could have been possible in our study. Thus, metformin did not show an effect at the highest concentration. However, it would be favourable to complement our results of liver glycogen increase, the intestinal microbiome shift and body weight reduction and focus on the uptake of metformin at different concentrations in the identified target organs of the liver, intestine and brain to validate the assumptions for the non-linearity of the obtained results.

Concerning the environmental relevance of the drug, it has to be stressed that other life stages of brown trout e.g. adults and other species groups e.g. invertebrates could react more sensitively to metformin, especially when exposed chronically. In addition to the effects on the metabolism of fish, several studies demonstrated endocrine effects of metformin such as vitellogenin mRNA upregulation or intersexes (Crago et al. 2016; Niemuth et al. 2015; Niemuth and Klaper 2015; Niemuth and Klaper 2018) which can pose a risk for aquatic organisms and have to be included in the assessment of the environmental relevance of the drug. Apart from that, guanylurea - the main transformation product of metformin generated microbially in sewage treatment plants – occurs at even higher concentrations than its parent compound in surface waters (Scheurer et al. 2012; Tisler and Zwiener 2018); the knowledge concerning its ecotoxicity is scarce, but would be required to judge the full ecotoxicological impact of metformin.

## **Conclusions**

Our study made it clear that metformin did not induce lethal or embryotoxic effects in brown trout and no influence on the tissue integrity of the liver, on the stress protein level and on swimming behaviour or body length became evident. However, metformin exerted effects related to the carbohydrate metabolism (changes of the liver glycogen), reduced body weight and influenced the gut microbiome already in low, environmentally relevant concentrations. These effects resemble the pharmaceutical effects of metformin in humans as antidiabetic and weight loss drug. To date, it is not known how the changes in the intestinal microbiome which occurred in the same concentration range can influence the vitality of the host organism, so further research is requested in this field.

The non-linearity of the concentration-effect-relation of the findings with the presence of effects only at low to medium metformin concentrations is also indicated in other studies and might be ascribed to the reduced bioavailability of metformin at higher doses. However, mechanistic explanations for this phenomenon are still lacking and need to be studied to fully understand metformin's potential environmental impact

## **Abbreviations**

AcN: acetonitrile; AMPK: adenosine monophosphate-activated kinase; bpm: beats per minute; CE-MS: capillary electrophoresis-mass spectrometry; CRED: criteria for reporting and evaluation ecotoxicity data; DDD: defined daily doses; dpf: days post fertilisation; FA: formic acid; EMA: European medicines agency; GLP-1: glucagon-like peptide 1; Hsp: heat shock protein; LoQ: limit of quantification; MRM: multiple reaction monitoring; n.e.: not evaluated; NOEC: no observed effect concentration; OTUs: operational taxonomic units; PAS: Periodic acid-Schiff; PCR: polymerase chain reaction; SD: standard deviation

## **Ethics approval and consent to participate**

The experiments were conducted in strict accordance with German legislation and were approved by the animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (authorisations ZO 1/15 and ZO 2/16).

## **Consent for publication**

Not applicable

## **Availability of data and material**

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Funding**

This study is funded by the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg.

## Author contributions

ST analysed the water samples during the experiment. CZ supervised the chemical analyses of the water samples. SK analysed the tissue samples of the brown trout. CH supervised the chemical analyses of the fish tissue. SJ performed the exposure experiment, the histological examination of the liver, the biochemical analyses and the statistical analyses. RT supervised the histological examinations and designed the study. HK supervised the biochemical analyses. ER, AD and DS performed the microbiome analyses. TS supervised the microbiome analyses. All authors critically revised and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This study is part of the project Effect-Net (Effect Network in Water Research) in the Wassernetzwerk Baden-Württemberg and funded by the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg. Particular thanks go to Thomas Braunbeck for the coordination of this project. Furthermore, we thank Andreas Dieterich, Melanie Huch, Philipp Huith, Stefanie Kraus, Kathrin Leinmüller, Silke-Mareike Marten, Katharina Peschke, Lukas Reinelt, Lilia Rudolf, Judith Rüschoff, Rubén Fernández Sánchez, Hannah Schmieg, Simon Schwarz, Sabrina Wilhelm and Michael Ziegler for technical assistance and help in the lab and again Simon Schwarz for comments on the manuscript.

## References

- Agüera A, Bueno MJM, Fernández-Alba AR (2013) New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environ Sci Poll Res* 20:3496-3515 doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-013-1586-0>
- An H, He L (2016) Current understanding of metformin effect on the control of hyperglycemia in diabetes. *J Endocrinol* 228:R97-R106 doi:<http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0447>
- Aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A (2016) Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem* 35:823-835 doi:<https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bailey C, Wilcock C, Scarpello J (2008) Metformin and the intestine. *Diabetologia* 51:1552 doi:<https://doi.org/10.1007/s00125-008-1053-5>
- Bailey CJ (1993) Metformin—an update. *Gen Pharmacol* 24:1299-1309 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/0306-3623\(93\)90411-p](https://dx.doi.org/10.1016/0306-3623(93)90411-p)
- Barton BA, Schreck CB (1987) Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 62:299-310 doi:[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90172-4)
- Beckmann R (1969) Resorption, Verteilung im Organismus und Ausscheidung von Metformin. *Diabetologia* 5:318-324 doi:<https://dx.doi.org/10.1007/bf00452906>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braunbeck T, Storch V, Bresch H (1990) Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Arch Environ Contam Toxicol* 19:405-418 doi: <https://dx.doi.org/10.1007/bf01054986>

- Camarinha-Silva A et al. (2014) Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environ Microbiol* 16:2939-2952 doi:<https://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12362>
- Chung H, Oh J, Yoon SH, Yu K-S, Cho J-Y, Chung J-Y (2018) A non-linear pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship of metformin in healthy volunteers: An open-label, parallel group, randomized clinical study. *PLoS One* 13:e0191258 doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191258>
- Cleuvers M (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* 142:185-194 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Crago J, Bui C, Grewal S, Schlenk D (2016) Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen Comp Endocrinol* 232:185-190 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.030>
- Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA (1996) Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4059-4067 doi:<http://dx.doi.org/10.1210/jcem.81.11.8923861>
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907 doi:<https://dx.doi.org/10.2307/3434573>
- de Vos WM, de Vos EA (2012) Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev* 70:S45-S56 doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x>
- Dieterich A et al. (2015) Hsp70 and lipid peroxide levels following heat stress in *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836) (Gastropoda, Pulmonata) with regard to different colour morphs. *Cell Stress Chaperones* 20:159-168 doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12192-014-0534-3>
- El-Mir M-Y, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 275:223-228 doi:<https://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.1.223>
- EMA (2011) Assessment report - Jentaduo. Procedure No.: EMEA/H/C/002279 London
- EU (2006) Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:328:0014:0056:en:PDF%20>. Accessed 19.09.2018
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B (2014) Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 20:953-966 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>
- Foretz M et al. (2010) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 120:2355-2369 doi:<http://dx.doi.org/10.1172/JCI40671>
- Forslund K et al. (2015) Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528:262-266 doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nature15766>
- Ghoshdastidar AJ, Fox S, Tong AZ (2015) The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. *Environ Sci Pollut Res* 22:689-700 doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3400-z>

- Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S (2003) Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab* 29:6S28-26S35 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/s1262-3636\(03\)72785-2](https://dx.doi.org/10.1016/s1262-3636(03)72785-2)
- Godoy AA, Domingues I, Nogueira AJA, Kummrow F (2018) Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environ Pollut* doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.031>
- Graham GG et al. (2011) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 50:81-98 doi:<http://dx.doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>
- Hari RE, Livingstone DM, Siber R, Burkhardt-Holm P, Guettinger H (2006) Consequences of climatic change for water temperature and brown trout populations in Alpine rivers and streams. *Global Change Biol* 12:10-26 doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.001051.x>
- Hawley SA et al. (2010) Use of cells expressing  $\gamma$  subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11:554-565 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.001>
- Hundal H, Ramlal T, Reyes R, Leiter L, Klip A (1992) Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* 131:1165-1173 doi:<http://dx.doi.org/10.1210/endo.131.3.1505458>
- Janssens Y et al. (2018) Disbiome database: linking the microbiome to disease. *BMC Microbiol* 18:50 doi:<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1197-5>
- Jones O, Voulvoulis N, Lester J (2002) Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res* 36:5013-5022 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00227-0](https://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00227-0)
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 42:3498-3518 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>
- Khan S, Ongerth J (2002) Occurrence and Distribution of Pharmaceutical Residuals in Bay Sewage and Sewage Treatment. <https://bacwa.org>. Accessed 19.09.2018
- Killeen J, McLay H, Johnston I (1999) Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons. *J Fish Biol* 55:382-404 doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jfbi.1999.1004>
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*: 01043-01013 doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Lee H, Ko G (2014) Effect of metformin on metabolic improvement and the gut microbiota. *Appl Environ Microbiol*:AEM. 01357-01314 doi:<https://doi.org/10.1128/aem.01357-14>
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191 doi:<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.005443>
- Lord JM, Flight IH, Norman RJ (2003) Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327:951 doi:<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.327.7421.951>
- Malin SK, Kashyap SR (2014) Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr Opin Endocrinol and Diabetes* 21:323-329 doi:<http://dx.doi.org/10.1097/MED.0000000000000095>



- Marchesi JR et al. (2015) The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*:2015-309990 doi:<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Martin-Castillo B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA (2010) Metformin and cancer: doses, mechanisms and the dandelion and hormetic phenomena. *Cell cycle* 9:1057-1064 doi:<http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.6.10994>
- Matthaei S, Reibold J, Hamann A, Benecke H, Häring H, Greten H, Klein H (1993) In vivo metformin treatment ameliorates insulin resistance: evidence for potentiation of insulin-induced translocation and increased functional activity of glucose transporters in obese (fa/fa) Zucker rat adipocytes. *Endocrinology* 133:304-311 doi:<http://dx.doi.org/10.1210/endo.133.1.8391425>
- Moermond CT, Kase R, Korkaric M, Ågerstrand M (2016) CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. *Environ Toxicol Chem* 35:1297-1309 doi:<http://dx.doi.org/10.1002/etc.3259>
- Moermond CT, Smit CE (2016) Derivation of water quality standards for carbamazepine, metoprolol, and metformin and comparison with monitoring data. *Environ Toxicol Chem* 35:882-888 doi:<http://dx.doi.org/10.1002/etc.3178>
- Murtha JM, Keller ET (2003) Characterization of the heat shock response in mature zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol* 38:683-691 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/s0531-5565\(03\)00067-6](https://dx.doi.org/10.1016/s0531-5565(03)00067-6)
- Natali A, Ferrannini E (2006) Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* 49:434-441 doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-006-0141-7>
- Nestler JE (2008) Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 358:47-54 doi:<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMct0707092>
- Niemuth NJ, Jordan R, Crago J, Blanksma C, Johnson R, Klaper RD (2015) Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ Toxicol Chem* 34:291-296 doi:<http://dx.doi.org/10.1002/etc.2793>
- Niemuth NJ, Klaper RD (2015) Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135:38-45 doi:<https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.060>
- Niemuth NJ, Klaper RD (2018) Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. *Aquat Toxicol* 195:33-40 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.003>
- Paleari L et al. (2018) High accumulation of metformin in colonic tissue of subjects with diabetes or the metabolic syndrome. *Gastroenterology* 154:1543-1545 doi:<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.040>
- Peragon J, Barroso JB, Garcia-Salguero L, de la Higuera M, Lupiáñez JA (2001) Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *Int J Biochem Cell Biol* 33:1227-1238 doi:[https://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00088-7](https://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00088-7)
- Piro S, Rabuazzo A, Renis M, Purrello F (2012) Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest* 35:504-510
- Pollak M (2017) The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia* 60:1662-1667 doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-017-4352-x>

- Quast C et al. (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590-D596 doi:<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Ringø E (1999) Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult Res* 30:73-93 doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00302.x>
- Ringø E, Lødemel J, Myklebust R, Kaino T, Mayhew T, Olsen R (2001) Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. *J Appl Microbiol* 90:294-300 doi:<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01246.x>
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584 doi:<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Scheen AJ (1996) Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 30:359-371 doi:<https://dx.doi.org/10.2165/00003088-199630050-00003>
- Scheurer M, Michel A, Brauch H-J, Ruck W, Sacher F (2012) Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res* 46:4790-4802 doi:<https://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019>
- Schloss PD et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537-7541 doi:<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schramm M, Müller E, Triebkorn R (1998) Brown trout *Salmo trutta* f. Fario liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. *Biomarkers* 3:93-108 doi:<http://dx.doi.org/10.1080/135475098231264>
- Schwabe U, Paffrath D (2016) *Arzneiverordnungs-Report 2016*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi:<https://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-50351-5>
- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U, Wehrli B (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313:1072-1077 doi:<http://dx.doi.org/10.1126/science.1127291>
- Seifarth C, Schehler B, Schneider H (2013) Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp Clin Endocrinol* 121:27-31 doi:<http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1327734>
- Shin N-R, Lee J-C, Lee H-Y, Kim M-S, Whon TW, Lee M-S, Bae J-W (2014) An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* 63:727-735 doi:<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303839>
- Tisler S, Zwiener C (2018) Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Sci Total Environ* 628:1121-1129 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.105>
- TOCRIS (2017) Safety data sheet of metformin hydrochloride. [https://documents.tocris.com/pdfs/tocris\\_msds/2864\\_sds.pdf?1542620235](https://documents.tocris.com/pdfs/tocris_msds/2864_sds.pdf?1542620235).
- Trautwein C, Kümmerer K (2011) Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* 85:765-773 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.057>
- Triebkorn R, Casper H, Heyd A, Eikemper R, Köhler H-R, Schwaiger J (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and

intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 68:151-166  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.015>

Triebskorn R et al. (2008) Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish. *Environ Monit Assess* 141:177-188 doi:<https://doi.org/10.1007/s10661-007-9886-9>

Ussery E (2018) The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanyurea, on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). University of Ontario Institute of Technology

Weatherley A, Gill H (1987) The biology of fish growth. Academic Press, London.  
doi:<https://doi.org/10.2307/1446462>

Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A (2016) Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem* 35:823-835  
doi:<https://dx.doi.org/10.1002/etc.3339>

Wiernsperger NF, Bailey CJ (1999) The antihyperglycaemic effect of metformin. *Drugs* 58:31-39  
doi:<https://dx.doi.org/10.2165/00003495-199958001-00009>

Wilcock C, Bailey C (1994) Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* 24:49-57 doi:<http://dx.doi.org/10.3109/00498259409043220>

Wu H et al. (2017) Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med*  
doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nm.4345>

Wu H, Tremaroli V, Bäckhed F (2015) Linking microbiota to human diseases: a systems biology perspective. *Trends Endocrinol Metab* 26:758-770 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.011>

## **Kapitel III: Effects of guanylurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, on the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)**

Stefanie Jacob<sup>1</sup>, Sarah Knoll<sup>2</sup>, Carolin Huhn<sup>2</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Selina Tisler<sup>3</sup>, Christian Zwiener<sup>3</sup>, Rita Triebkorn<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Effect-based Environmental Analysis, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>3</sup>Environmental Analytical Chemistry, University of Tübingen, D-72074 Tübingen, Germany

<sup>4</sup>Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, D-72108 Rottenburg, Germany.

Corresponding Author: Stefanie Jacob

Email address: Stefanie.jacob@uni-tuebingen.de

### **Abstract**

Guanylurea is the main transformation product of the antidiabetic drug metformin, which is one of the most prescribed pharmaceuticals worldwide. Due to the high rate of microbial degradation of metformin in sewage treatment plants, guanylurea occurs in higher concentrations in surface waters than its parent compound and could therefore affect aquatic wildlife. In this context, data for fish are scarce up to now, which made us investigate the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) in response to guanylurea.

In two experiments, eggs plus developing larvae and juvenile brown trout were exposed to three different concentrations of guanylurea (10, 100 and 1000 µg/L) and, as a negative control, filtered tap water without this compound. Low internal concentrations were determined. The investigated parameters were mortality, length, weight, condition factor, tissue integrity of the liver and kidney, levels of stress proteins and lipid peroxides, as well as behavioural and developmental endpoints. It was found that guanylurea did not significantly change any of these parameters in the tested concentration range.

In conclusion, these results do not give rise to concern that guanylurea could negatively affect the health or the development of brown trout under field conditions. Nevertheless, more studies focusing on further parameters and other species are highly needed for a more profound environmental risk assessment of guanylurea.

### **Introduction**

For the environmental risk assessment of chemicals, the inclusion of transformation products and the investigation of their contribution to the risk posed by the parent compound are often challenging and increase the complexity of the evaluation process. In this context, it is a major issue that the identity of transformation products is often unknown; in addition, there is a general dearth of data concerning the ecotoxicological effects of identified ones (Celiz et al. 2009). However, particularly in cases of transformation products with high formation yield or a higher persistence and toxicity than their parent compound, it would be a striking error to neglect transformation products in a risk assessment (Escher & Fenner 2011). For example, Schlüter-Vorberg et al. (2015) showed that carboxy-acyclovir, a transformation product of the antiviral drug acyclovir formed in sewage treatment plants, was much more toxic than its parent compound. Valsartanic acid, the transformation product of the antihypertensive drug valsartan formed in the activated sludge of waste water treatment plants, was shown to be much more persistent than its parent compound

(Berkner & Thierbach 2014; Helbling et al. 2010). An example for a transformation product with a high formation yield is guanylurea. The substance is generated in sewage treatment plants by the microbial degradation of the antidiabetic drug metformin (Scheurer et al. 2012; Tisler & Zwiener 2018; Trautwein & Kümmerer 2011), and is detected in surface waters at concentrations up to 28 µg/L (Scheurer et al. 2012); the maximum concentration of the parent compound is about a factor of 10 lower (Scheurer et al. 2012). Generally, data on the ecotoxicity of guanylurea are scarce (Riegraf et al. 2017). To the best of our knowledge, there is only a single study addressing the effects of guanylurea in fish. In this study, larval Japanese medaka (*Oryzias latipes*) were exposed test to 1-100 ng/L guanylurea for 28 days in an early life stage resulting in significantly reduced growth at all tested concentrations (Ussery et al. 2019). Mortality, time to hatch, and hatching success were not influenced by the chemical. In the same study by Ussery et al. (2019), growth was not significantly reduced in adult medaka exposed to 1 ng/L and 7.5 µg/L guanylurea in a full life cycle test. In addition, the authors reported that the hormonal system seemed to be influenced by guanylurea, since enhanced estradiol production was measured in the liver of male adult medaka exposed to 7.5 µg/L guanylurea. There are few studies dealing with the effects of guanylurea in invertebrates. In crustaceans, a low sensitivity to guanylurea was shown: *Daphnia magna* was immobilised with a 50% effective concentration (EC<sub>50</sub>) value of 40 mg/L (Markiewicz et al. 2017). In another study, reproduction of *Ceriodaphnia dubia* remained unaffected with a no observed effect concentration (NOEC) of 8 mg/L (Caldwell et al. 2019).

In our study, we investigated whether and how guanylurea influences the development and health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*), a species of high environmental relevance for Central Europe, at several organisational levels. Studies were conducted with larvae developed from exposed eggs and nine month-old juvenile fish exposed for three weeks to cover sensitive life stages of the selected species. The investigated parameters were apical endpoints as mortality, body weight and length, condition factor, as well as the time to hatch and heart rate of the larvae to account for embryotoxicity. Moreover, we investigated the tissue integrity of the most important organs in metabolism and biotransformation, i.e. the liver and kidney, since histopathology is a good marker to detect sublethal effects of chemicals on cells and organs (Bernet et al. 1999; Johnson et al. 1993; Schwaiger et al. 1992; Triebkorn et al. 2007). As general, biochemical stress markers, the level of the 70 kDa heat shock protein family (Hsp70) was analysed in the head of juvenile brown trout and the lipid peroxide level was measured in the head of larval brown trout. Hsp70 induction is part of the molecular stress response which is highly conserved across a wide range of taxa (Margulis et al. 1989). Their function lies in the folding of nascent proteins and the re-folding of partially damaged proteins. Lipid peroxides are the product of reactions of reactive oxygen species (ROS) with polyunsaturated lipids (Monserrat et al. 2003). ROS are generated by different biochemical processes, e.g. by aerobic respiration or the metabolism of xenobiotics (Betteridge 2000; Valavanidis et al. 2006). In case of an imbalance between the ROS production and the anti-oxidative defence, oxidative stress can arise (Betteridge 2000). For example, alterations of the membrane fluidity in mitochondria caused by lipid peroxides (Chen & Yu 1994) can lead to a loss of essential cellular functions (Hermes-Lima et al. 1995). The parent compound of guanylurea, the antidiabetic drug metformin, was shown to decrease the stress protein level (Piro et al. 2012). Concerning the effects of the pharmaceutical on oxidative stress, the literature states that metformin is able to reduce (Anurag & Anuradha 2002; Bonnefont-Rousselot et al. 2003) but also increase (Dai et al. 2014; Lee et al. 2019) the level of oxidative stress. Therefore, we wanted to investigate whether guanylurea has similar effects on Hsp70 and lipid peroxide levels as its parent compound. Additionally, for the

juvenile brown trout, swimming behaviour (total distance moved and mean velocity) was analysed, since physiological stress may manifest itself as behavioural alterations (Scott & Sloman 2004). The parent compound metformin is known to influence the aggression behaviour of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Thus, we wanted to know whether guanylurea is able to change the movement activity of brown trout. Finally, the uptake of guanylurea into the tissue of the brown trout larvae was determined.

## **Material and Methods**

### Test organisms

Brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) were purchased from a commercial fish breeder (trout breeding Lohmühle, D- 72275 Alpirsbach-Ehlenbogen) whose fish breeding is listed as category I, disease-free according to the EC Council Directive (EU 2006). Eggs in the eyed-ova stage (46 days post fertilisation (dpf)) were exposed directly after purchase. Juvenile fish (age: nine month) were kept in a 250 L aquarium in the laboratory for two weeks prior to the exposure experiments for acclimation to the lab conditions.

### Test substances

Guanylurea sulphate (CAS number: 591-01-5; Lot: WIA7F and AKJLG; purity: 98%) was purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan). With a maximum solubility in water of 50 g/L (ChemIDplus), the substance was readily soluble in water. The concentrations of guanylurea investigated in the present study refer to the free base.

### Exposure experiments and sampling

#### Larval brown trout

Eyed eggs of brown trout (46 dpf) were exposed to four different nominal concentrations of guanylurea (0, 10, 100 and 1000 µg/L) in triplicate at 7°C in a climate chamber (start: Dec 29, 2017). The exposure was conducted in a semi-static system using glass aquaria with 30 test organisms per 10 L test medium. After 91 days of exposure, the water volume was increased to 15 L per aquarium. In total, 360 individuals were investigated for their development and health. During the experiment, hatching and mortality were recorded daily. At day 40, when the larvae reached the finfold resorption phase (step 38/39 according to Killeen et al. (1999)), the heart rate was determined. Fifteen larvae (five per replicate aquarium) from both the control and the 1000 µg/L guanylurea treatment were transferred to vessels containing the respective test medium and the heart rate of each individual was counted for 20 s. Twice a week, 50% of the exposure medium was exchanged with freshly prepared medium. Aerated and filtered tap water (iron filter, active charcoal filter, particle filter) was used for the preparation of the medium. The medium in the aquaria was aerated with air stones (JBL Pro Silent Aeras Micro S2). The illumination conditions were kept constant during the test with a 10 h/14 h light/dark cycle. Additionally, the aquaria were shaded from direct light using black plastic foil. After yolk-sac consumption (day 56), the larvae were fed every day with commercial trout food (INICIO plus 0.5 mm from Biomar, Denmark). The amount of food provided per day was constantly adapted in relation to the developmental status of the brown trout; the larvae were fed at maintenance. During the water exchange process, excess food and faeces were removed. Temperature, pH, oxygen content and conductivity were monitored at the beginning and

end of the test as well as at day 55 (temperature= $7.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , pH= $8.33 \pm 0.05$ , oxygen concentration= $11.00 \pm 0.20$  mg/L, conductivity= $483 \pm 15$   $\mu\text{S/cm}$ ). Eight weeks after yolk-sac consumption (17.04.2018; after 110 days) the fish were euthanised with an overdose of MS 222 (1 g/L buffered by  $\text{NaHCO}_3$ ) and subsequent severance of the spine. The length and weight of the fish as well as possible abnormalities or injuries were recorded. Fulton's condition factor was calculated (ratio of weight and length cubed). Due to the small size of the test organisms, individual fish were separated into three groups (samples obtained from 10 individuals per replicate aquarium; 30 individuals per treatment). In the first group, the liver was sampled for histopathological examination. The second group provided samples for the analyses of lipid peroxide level (head). In the third group, samples for chemical analysis of fish tissue were obtained; for this purpose, the middle part of the fish was used (tissue between neck and dorsal fin). Samples for histological analysis were chemically fixed in glutardialdehyde. All other samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### Juvenile brown trout

Juvenile brown trout (age: nine month) were exposed to four different nominal concentrations of guanylurea (0, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g/L}$ ) in triplicate at  $7^{\circ}\text{C}$  in a climate chamber. The exposure was conducted in a semi-static system using glass aquaria with ten test organisms per 15 L test medium. In total, 120 individuals were investigated. The water exchange and the illumination conditions were the same as described above. Daily, juvenile brown trout were fed a defined amount of commercial trout food (INICIO plus 0.8 mm from Biomar, Denmark). Temperature, pH, oxygen content and conductivity of the media in the aquaria were monitored at the beginning and end of the test (temperature=  $6.9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , pH= $8.33 \pm 0.12$ , oxygen concentration= $11.42 \pm 0.15$  mg/L, conductivity= $497 \pm 23$   $\mu\text{S/cm}$ ). After 29 days of exposure (08.08.2017-05.09.2017), seven fish per aquarium (21 per treatment) were euthanised with an overdose of MS 222 (1 g/L buffered by  $\text{NaHCO}_3$ ) and subsequent severance of the spine. The length and weight of the fish, as well as possible abnormalities or injuries, were recorded. The liver and kidney were sampled for histopathological examination. The head was taken for the analysis of the stress protein level. Samples for histological analyses were chemically fixed in glutardialdehyde. All other samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The remaining three fish per aquarium (nine per treatment) were used for swimming behaviour experiments (7 September 2017). In addition to the negative control in the lab, 20 juvenile brown trout were sampled directly at the trout breeding facility as a qualitative 'hatchery control' (12 September 2017).

### Chemical analyses

During the experiments, water samples were taken to determine the real guanylurea concentrations in the test medium. For both experiments, water samples were taken at the beginning (larvae: 29 December 2017; juveniles: 8 August 2017) and at the end of the experiment (larvae: 17 April 2018; juveniles: 5 September 2017). Moreover, samples were taken during the exposure, before and after water exchange (larvae: after 25, 56 and 77 days; juveniles: after 14 days). The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing. At the end of the experiment, tissue samples of the brown trout larvae (between neck and dorsal fin) containing liver, muscle, gut and kidney were investigated to determine the internal guanylurea concentration in the fish.

### Analysis of water concentrations by LC-MS

The real water concentrations were determined using LC-MS with a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a quadrupole time of flight mass spectrometer (6550 iFunnel QTOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For separation, a Phenomenex LUNA 5 u HILIC 200 A column (150 x 3 mm; 5 µm particle size) with a flow rate of 0.5 mL/min at 40°C was used. A gradient elution was performed with eluent A (aqueous buffer with 15 mM ammonium formate and 0.1% formic acid) and eluent B (acetonitrile with 0.1% formic acid) (all chemicals purchased from Fisher Scientific, Schwerte, Germany). A portion of 95% of eluent B was used for 0-4 min, decreased to 50% within 4 min and held for 6 min. After switching back to the starting conditions, the post time was 8 min.

Samples were kept in the autosampler at 10°C. The injection volume was 20 µL. All samples had a composition of 90% acetonitrile and 10% H<sub>2</sub>O due to dilution with acetonitrile. The ionisation of guanylyurea was performed in positive ionisation mode. Further details on the operating parameters of the QTOF are provided in the Supplement (Paragraph S1, Table S1). Acquired data were processed with the software Mass Hunter (Agilent Technologies). For quantification and confirmation, the exact mass of guanylyurea [M+H]<sup>+</sup> *m/z* 103.0614 ± 10 ppm was used at a retention time of 4.87 ± 0.5 min. The limit of quantification (LoQ) was 300 ng/L. The intra- and interday variations of the analytical method (n=4) were 4.6 and 8.5%, respectively.

### Analysis of tissue samples by SPE and CE-MS

The guanylyurea concentration in the tissue of brown trout fry was determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS). For sample clean-up and extraction of guanylyurea, solid-phase extraction (SPE) was used. Fish samples originating from all exposure concentrations were analysed. For each exposure group, tissue samples of three individuals per replicate (nine per treatment) were pooled to reach the required detection limits. For sample preparation, frozen (-20°C) samples were first homogenised by grinding using a mortar and pestle under liquid nitrogen. A total of 100 mg of the homogenised sample was transferred to an Eppendorf tube and 1.5 ml water was added, followed by vortexing for 30 s. After centrifugation for 15 min, the supernatant was transferred into an Eppendorf tube and was then ready for SPE extraction. Prior to the extraction, the material was conditioned with 3x3 ml methanol followed by 3x3 ml of water (LC-MS grade). After equilibrating, 1 ml of sample extract was loaded onto the cartridges. The elution of guanylyurea was performed with 1 ml of a methanol/acetonitrile mixture containing 2% formic acid. The eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and the concentrated residue was redissolved in 300 µL of methanol. After filtration using a 45 µm PTFE filter (pore size 0.45 µm, Chromafil, Macherey-Nagel, Germany), the samples were analysed by CE-MS. Calibration was performed between 5 and 50 µg/L fish extract and the recovery was determined to 84%. The intraday variation of the analytical method was 9%. Further details can be found in the Supplement.

All analyses were performed using an Agilent CE 7100 interfaced to an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany and Santa Clara, CA, USA) using an electrospray ionisation source assisted by the sheath-liquid interface. CE separations were carried out by means of an uncoated fused-silica capillary (length 80 cm, i.d. 50 µm). The background electrolyte was a mixture of 25 mM ammonium acetate and 3% glacial acetic acid in methanol. Samples were injected hydrodynamically by applying a pressure of 100 mbar for 10 s. The CE capillary



was kept at 25°C during CE runs and a voltage of +30 kV was applied. Details of the CE-MS method are given in the Supplement (Paragraph S2).

### Histopathological investigations

Samples for histological analyses were fixed in 2% glutardialdehyde (Merck, Darmstadt, Germany) diluted with a sodium-cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.6; AppliChem Darmstadt, Germany). After being washed three times with this buffer, samples were dehydrated in a graded series of ethanol and infiltrated with paraffin wax (Parablast; Leica, Wetzlar, Germany) in a tissue processor (Leica TP 1020). Additionally, kidney samples were decalcified prior to the infiltration step using a 1:2 mixture of formic acid and 70% ethanol. After paraffin embedding, samples were cut into 3 µm slices using a microtome (Leica SM 2000 R). One portion of the slices was stained with haematoxylin-eosin (to visualise nuclei, cytoplasm, connective tissue and muscles), the other one was stained with Alcian blue-PAS (to visualise mucus and glycogen). The slides were examined using a light microscope (Axioskop 2; Zeiss, Oberkochen, Germany), first in a qualitative manner to obtain a general overview of the tissues and to identify pathologies. In a second step, the observed pathologies were semi-quantitatively assessed and classified into one of five different categories (1: control, 2: slight reaction, 3: moderate reaction, 4: strong reaction, 5: destruction) according to the criteria published by Triebkorn et al. (2008). In a further step, all samples were re-analysed once again after being blinded and randomised to avoid observer bias in the final evaluation.

### Stress protein analysis

For the determination of the 70 kDa stress protein family (Hsp70) level in the heads of juvenile brown trout (21 per treatment), the samples were homogenised with a mixture of 98% extraction buffer and 2% protease inhibitor as described by Dieterich et al. (2015). Subsequently, the total protein content in the samples was quantified according to Bradford (1976). A standardised amount of 40 µg total protein per sample was used for the analysis of the Hsp70 level. The proteins were separated according to their weight using minigel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) and blotted on a nitrocellulose membrane in a semi-dry chamber. After specific binding of the primary antibody (monoclonal α-Hsp70 IgG; Dianova Hamburg, Germany) to the Hsp70 proteins, a secondary antibody (peroxidase-coupled α-IgG; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) directed to the first antibody was added. Finally, the membranes were stained with 4-chloro-1-naphthol until the Hsp70 proteins became visibly. The optical volume (=band area x average grey scale value) of the bands was quantified in relation to an internal standard (brown trout full body homogenate).

### Lipid peroxide analysis

The level of lipid peroxides in the head of the brown trout larvae (30 per treatment) was determined with the FOX (ferrous oxidation xylenol orange) assay according to a modified version of the protocols from Hermes-Lima et al. (1995) and Monserrat et al. (2003). Basically, Fe(+II) is oxidised by the lipid peroxides of the sample under acidic conditions, followed by a complexation of the resulting Fe(+III) with the dye xylenol orange resulting in a colour change. Head samples were homogenised in HPLC-grade methanol (according to a tissue: methanol ratio of 1:7, w.w.) and centrifuged at 4°C at 14 000 rpm for 5 min. 50 µl each of FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and xylenol orange, 35 µl sample supernatant and 15 µl bi-distilled water were pipetted in each well, adding up to a total volume of 200 µl. Each sample was tested in triplicate and, additionally, tested without FeSO<sub>4</sub> to account for endogenous iron in the

sample. Subsequently, the samples were incubated for 90 min at room temperature. Then, the absorbance was measured at 570 nm using an automated microplate reader (Bio-Tek Instruments; Winooski, VT, USA). Finally, 1 µl of 1 mM cumene hydroperoxide (CHP) solution was added per well and the samples were incubated for 30 min at room temperature. Then, the absorbance was measured again and cumene hydroperoxide equivalents (CHPequiv.) were calculated according to the following equation:

$$CHPequiv. = \frac{Abs_{570} \text{ before CHP}}{Abs_{570} \text{ after CHP}} * volume_{CHP} * \frac{total \ volume}{sample \ volume} * dilution \ factor$$

with  $volume_{CHP}=1 \mu\text{l}$ ;  $total \ volume=200 \mu\text{l}$ ;  $sample \ volume=25 \mu\text{l}$ ;  $dilution \ factor=4$ .

#### Analysis of swimming behaviour

The swimming behaviour of the juvenile brown trout was quantitatively analysed using the EthoVision 12 software (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Three fish per replicate (nine per treatment) were transferred to cubic aquaria (17 cm edge length) containing 1.6 L of the respective test medium. After acclimation for 2 min, swimming behaviour was recorded for 18 min with a digital camera (Basler acA1300-60gm camera, 1.3 MP resolution; Basler, Ahrensburg, Germany) in four aquaria simultaneously. By tracking the centre-point of the fish, the total distance moved and the mean velocity of each individual were analysed. Afterwards, possible identity swaps between the tracked individuals were corrected with the Track Editor in EthoVision software.

#### Statistical analysis

Statistics were conducted with JMP 12 (SAS, Cary, NC, USA). Whenever a normal distribution and homoscedasticity were not present, data were transformed. The data of body weight of larval brown trout and the data of the swimming behaviour were transformed with a natural logarithm function. Body length and weight of the juveniles as well as the data of the lipid peroxide analysis of the larvae were transformed with the function  $x^{-0.5}$ . Mortality and time to hatch were analysed with Cox regression. The histopathological data were checked for significance with the likelihood ratio  $\chi^2$  test. For the analysis of the lipid peroxide level of the larvae, a Welch ANOVA was performed, since the data could not be transformed to reach homoscedasticity. A nested ANOVA was conducted for all other endpoints using the replicate as a nesting factor. The  $\alpha$ -level was set to 0.05, but was adjusted in case of multiple testing according to sequential Bonferroni correction. Comparisons with the hatchery controls were solely conducted qualitatively. The statistical tests used and the corresponding p-values are shown in the Results section; further information (e.g. degrees of freedom and F-values) is given in the Supplement (Paragraph S5).

#### Animal welfare

All experiments were approved by the animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (authorisation ZO 2/16).

#### Credibility of the data

The details about the fulfilment of the criteria for reporting and evaluation ecotoxicity data (CRED) according to Moermond et al. (2016) are provided in the Supplement (Paragraph S6).

## Results

### Chemical analyses

The measured guanyurea concentrations in exposure media were in good accordance with the nominal water concentrations (Table 1 and 2, detailed information in the Supplement, Paragraph S1, Table S2 and S3). Therefore, we refer to the nominal concentrations throughout the entire text of this paper. In most exposure groups, the real concentrations were slightly higher than the nominal concentrations; the recovery rate was between 89 and 132%. The analysis of the tissue of brown trout larvae revealed that guanyurea was solely quantifiable in the exposure group with the highest guanyurea concentration (1000 µg/L) and only at low concentrations. In the three replicates of this exposure group, the transformation product of metformin was found at a concentration of 5.05 ng/g in the first replicate, 16.91 ng/g in the second replicate and 9.98 ng/g in the third replicate, resulting in an average internal guanyurea concentration of 10.65 ng/g (Table 1).

### Mortality and growth metrics

The mortality varied between 2.2 and 6.7% in the experiment with the larval brown trout (Table 1) and between 0 and 3.3% in the experiment with juvenile brown trout (Table 2), so guanyurea did not show any signs of a lethal effect (Cox regression: larvae:  $p=0.2001$ ; juveniles:  $p=0.4253$ ) in the tested concentration range. Also, body weight, length and condition factor of both life stages of brown trout were not influenced by guanyurea (Table 1 and 2) (nested ANOVA: larvae:  $p=0.8919$  (weight);  $p=0.0589$  (length);  $p=0.0587$  (condition factor); juveniles:  $p=0.6383$  (weight);  $p=0.8157$  (length);  $p=0.7942$  (condition factor)).

### Developmental parameters

The investigations of heart rate and time to hatch did not reveal any effects of guanyurea in larval brown trout (Table 1) (heart rate: nested ANOVA:  $p=0.9090$ ; time to hatch: COX-regression:  $p=1$ ). Moreover, the hatching success in all exposure groups was 100%.

### Biochemical markers

The analysis of lipid peroxides in larval brown trout did not reveal any differences between the exposure groups (Table 1) (Welch-ANOVA:  $p=0.2333$ ). Also, the stress protein level in juvenile brown trout was not influenced by guanyurea (Table 2) (nested ANOVA:  $p=0.3235$ ).

### Swimming behaviour

The total distance moved and mean velocity of juvenile brown trout exposed to 10 µg/L guanyurea were slightly but not significantly enhanced compared to the control (Table 2). This was not observed after exposure to the higher test concentrations (nested ANOVA: distance moved:  $p=0.1676$ ; mean velocity:  $p=0.1676$ ).

Table 1: Measured guanylurea concentrations in medium and in tissue, mortality, biometric data, developmental and biochemical parameters of larval brown trout exposed to guanylurea. All data are displayed as arithmetic means  $\pm$  standard deviations. The heart rate was only evaluated for the negative control and the highest guanylurea concentration.

| Larval brown trout                                       |                  |                               |                                 |                               |
|----------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Nominal water concentrations [ $\mu\text{g/L}$ ]         | 0                | 10                            | 100                             | 1000                          |
| Measured (real) water concentrations                     | < LoQ            | 9.0 $\pm$ 0.9 $\mu\text{g/L}$ | 117.3 $\pm$ 5.3 $\mu\text{g/L}$ | 1254 $\pm$ 33 $\mu\text{g/L}$ |
| Internal concentration (average for 3 replicates) [ng/g] | < LoQ            | < LoQ                         | < LoQ                           | 10.65                         |
| Mortality [%]                                            | 5.6 $\pm$ 1.6    | 2.2 $\pm$ 3.1                 | 6.7 $\pm$ 2.7                   | 3.3 $\pm$ 0.0                 |
| Time to hatch (dpf)                                      | 55.5 $\pm$ 3.0   | 56.8 $\pm$ 1.6                | 57.0 $\pm$ 1.1                  | 56.2 $\pm$ 2.1                |
| Heart rate [bpm]                                         | 59.2 $\pm$ 5.1   | n.e.                          | n.e.                            | 59.4 $\pm$ 4.3                |
| Body weight [g]                                          | 0.50 $\pm$ 0.11  | 0.50 $\pm$ 0.14               | 0.51 $\pm$ 0.13                 | 0.50 $\pm$ 0.12               |
| Body length [cm]                                         | 3.8 $\pm$ 0.3    | 3.7 $\pm$ 0.3                 | 3.8 $\pm$ 0.3                   | 3.7 $\pm$ 0.3                 |
| Condition factor [g/cm <sup>3</sup> ]                    | 0.92 $\pm$ 0.10  | 0.94 $\pm$ 0.09               | 0.92 $\pm$ 0.11                 | 0.99 $\pm$ 0.11               |
| Lipid peroxide level [CHP-equiv./mg wet weight]          | 18.01 $\pm$ 5.57 | 16.97 $\pm$ 4.61              | 18.55 $\pm$ 7.14                | 19.48 $\pm$ 5.24              |

Table 2: Measured guanylurea concentrations in medium, mortality, biometric data, biochemical and behavioural parameters of juvenile brown trout exposed to guanylurea. All data are displayed as arithmetic means  $\pm$  standard deviations.

| Juvenile brown trout                                     |                   |                     |                   |                   |                  |
|----------------------------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Nominal water concentrations [ $\mu\text{g/L}$ ]         | 0                 | 10                  | 100               | 1000              | Hatchery control |
| Measured (real) water concentrations [ $\mu\text{g/L}$ ] | < LoQ             | 11.8 $\pm$ 0.2      | 132.5 $\pm$ 2.4   | 1319 $\pm$ 60     | -                |
| Mortality [%]                                            | 3.3 $\pm$ 4.7     | 3.3 $\pm$ 4.7       | 0.0 $\pm$ 0.0     | 0.0 $\pm$ 0.0     | -                |
| Body weight [g]                                          | 2.80 $\pm$ 1.01   | 2.88 $\pm$ 0.83     | 2.83 $\pm$ 0.88   | 3.06 $\pm$ 0.80   | 8.66 $\pm$ 2.64  |
| Body length [cm]                                         | 6.4 $\pm$ 0.7     | 6.5 $\pm$ 0.7       | 6.5 $\pm$ 0.7     | 6.6 $\pm$ 0.6     | 9.1 $\pm$ 0.8    |
| Condition factor [g/cm <sup>3</sup> ]                    | 1.02 $\pm$ 0.08   | 1.04 $\pm$ 0.06     | 1.02 $\pm$ 0.06   | 1.04 $\pm$ 0.07   | 1.13 $\pm$ 0.08  |
| Hsp 70 level [relative grey value]                       | 1.15 $\pm$ 0.18   | 1.10 $\pm$ 0.20     | 1.18 $\pm$ 0.18   | 1.08 $\pm$ 0.21   | 1.09 $\pm$ 0.07  |
| Total distance moved [cm]                                | 781.5 $\pm$ 786.2 | 1432.7 $\pm$ 1016.4 | 972.0 $\pm$ 452.0 | 912.3 $\pm$ 658.6 | -                |
| Mean velocity [cm/s]                                     | 0.7 $\pm$ 0.7     | 1.3 $\pm$ 0.9       | 0.9 $\pm$ 0.4     | 0.8 $\pm$ 0.6     | -                |

## Histopathology

### Liver

The liver tissue of larval brown trout did not show any severe damage or pathological alterations and was classified into the categories 1, 2 or 3. For the liver samples of juvenile brown trout, categories 1 to 4 were allocated to the sections. In both life stages, one portion of the liver samples showed large cells with a bright cytoplasm (Fig. 1A, 1C) containing high amounts of glycogen (Fig. 1B). The other portion of the samples revealed small and darker hepatocytes (Fig. 1D) and a low glycogen amount (Fig. 1E). The glycogen amount was generally lower in the livers of juveniles compared to larval

brown trout. Moreover, large inflammatory sites (Fig. 1F), which occurred in some livers of juvenile brown trout exposed to guanylurea, resulted in a classification into category 4. Further details of the qualitative tissue analyses for each individual are given in the Supplement (Paragraph S4). The semi-quantitative histopathological assessment of the liver did not show any significant effects of guanylurea in larval or juvenile brown trout (likelihood ratio  $\chi^2$  test: larvae:  $p=0.2865$ ; juveniles:  $p=0.5224$ ) (Fig. 2). In the hatchery control, the livers contained more glycogen compared to the juvenile brown trout exposed in laboratory, but the prevalence of inflammatory sites resulted in a classification of the respective samples into categories 3 and 4 (Fig. 2).

## Kidney

The kidney tissue of juvenile brown trout was classified into the categories 1 to 4. Symptoms were the enlargement of vesicles and the accumulation of hyaline droplets (Fig. 1H) in anterior parts of the proximal tubules and the occurrence of vacuoles (Fig. 1I) in anterior and posterior parts of the proximal tubules. In a few kidney sections, the hematopoietic tissue was partially degenerated and the spaces between the glomeruli and Bowman's capsule were enlarged. The semi-quantitative assessment revealed that these symptoms were prevalent in all treatments and that there was no observable difference between the exposure groups with guanylurea and the control (likelihood ratio  $\chi^2$  test:  $p=0.6668$ ; Fig. 2). In the hatchery control (Fig. 1G), however, symptoms as described above did not occur except for one single animal. Further details of the qualitative tissue analyses for each individual are given in the Supplement (Paragraph S4).

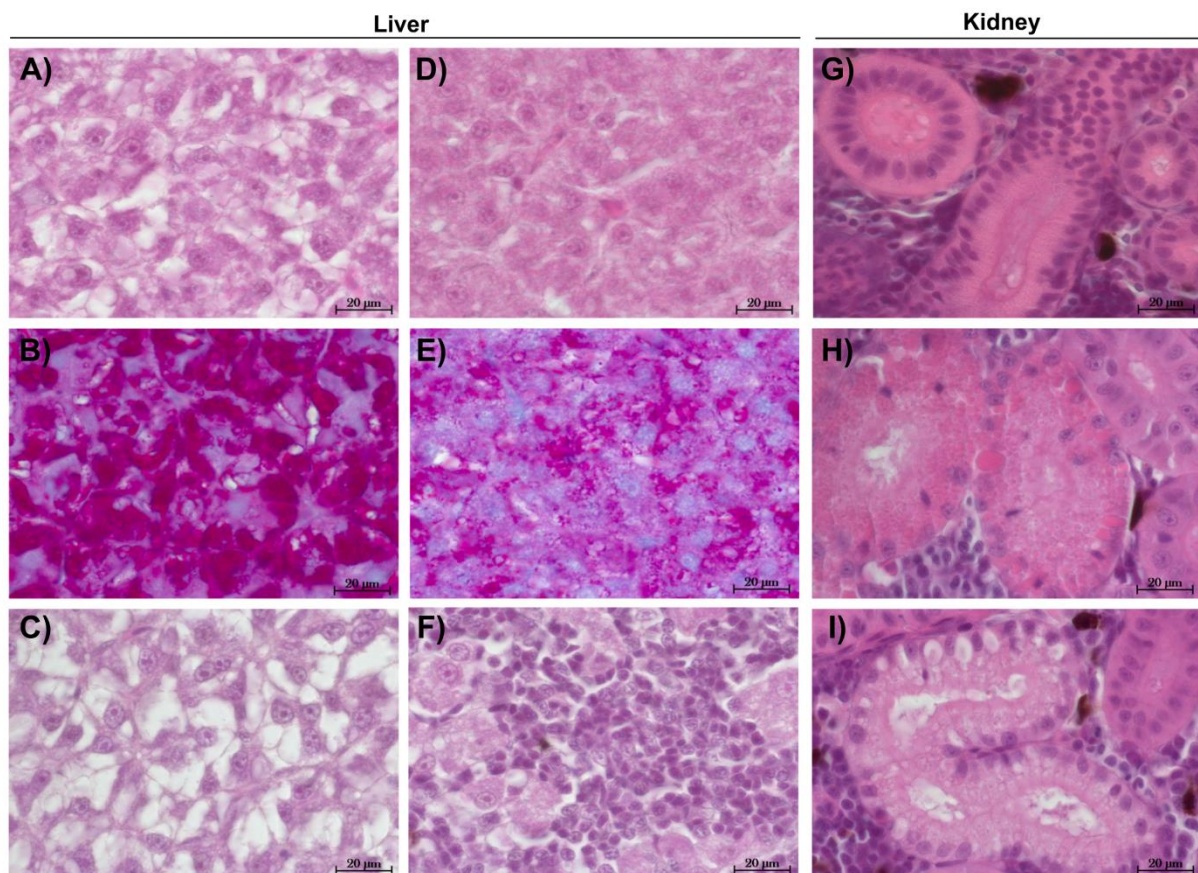


Figure 1: Representative sections of liver and kidney of brown trout. Control status of liver of (A) juvenile and (C) larval brown trout with large hepatocytes with bright cytoplasm and (B) high glycogen amounts; reaction status of liver with (D) small hepatocytes with (E) reduced glycogen

amounts and (F) inflammatory sites; control status of kidney showing (G) proximal tubules in compact hematopoietic tissue; reaction status of kidney showing (H) hyaline droplets and (I) vacuoles in the proximal tubules; (B & E): alcian blue-PAS staining; all other sections: haematoxylin-eosin staining; (C): liver section of larval brown trout; all other sections: juvenile brown trout.

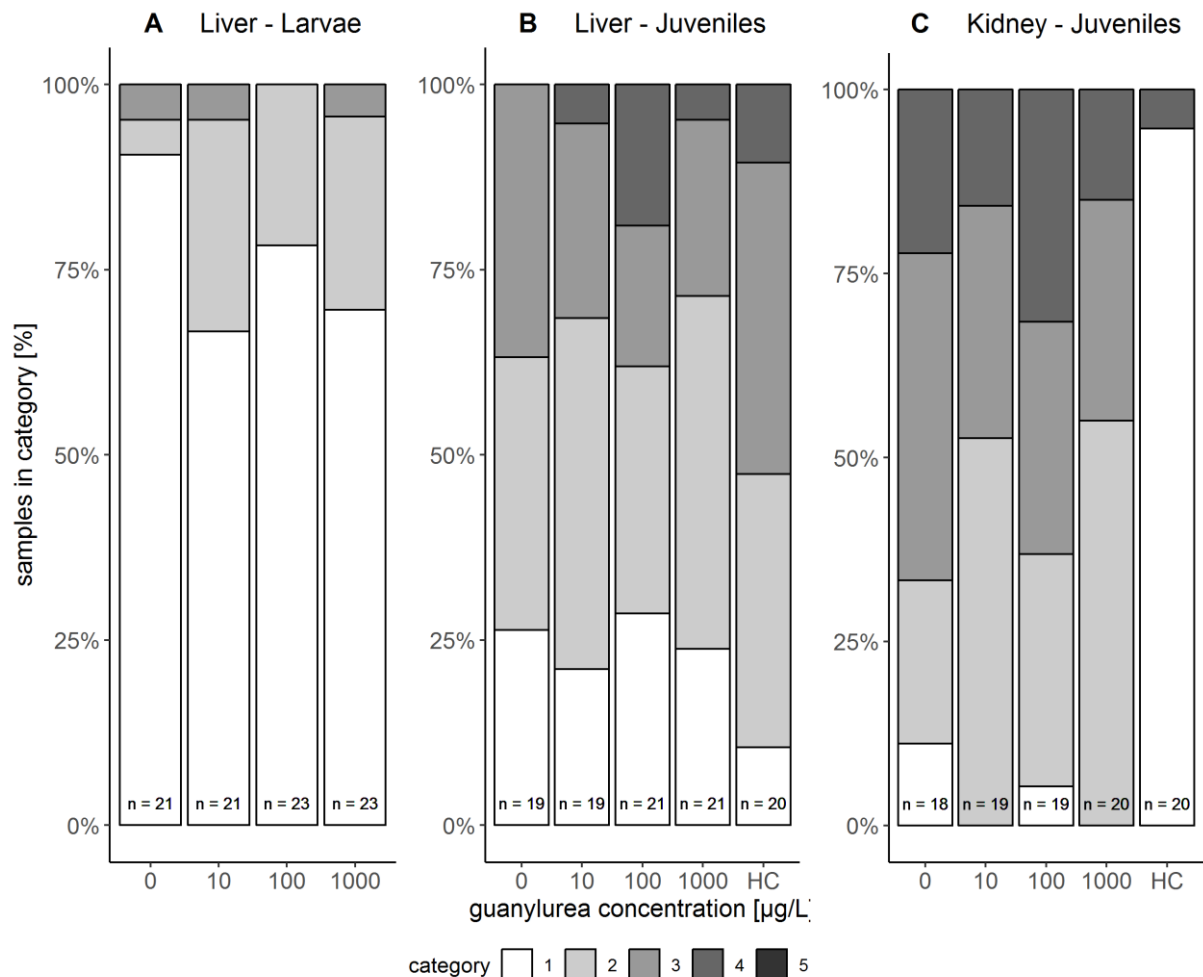


Figure 2: Semi-quantitative assessment of histopathological symptoms in the liver of larval brown trout and in the liver and kidney of juvenile brown trout exposed to guanylurea. Samples were classified in categories 1 to 4; category 5 was not allocated to any of the samples. The number n of examined individuals is given at the base of each bar. Statistical comparisons revealed that guanylurea did not significantly affect the integrity of the investigated tissues. Hatchery controls (HC) were excluded from statistical comparison.

## Discussion

In the present study, we investigated the effects of guanylurea, the major transformation product of metformin, in brown trout. Generally, it is assumed that most metabolites or transformation products show the same behaviour in the environment as their parent compounds (EMA 2006) and are equally or less toxic than these (Escher & Fenner 2011; Kümmerer 2009). With respect to guanylurea, however, there is a lack of ecotoxicological data, and it is not known whether this transformation product resembles metformin in its (ecotoxic) effects. Usually, a similar chemical structure of transformation product and parent compound indicates a similar environmental

behaviour. The general chemical properties of guanylylurea are similar to those of the parent compound: both substances are very polar and positively charged at the pH values of natural waters (Scheurer et al. 2012; Scheurer et al. 2009). It has been shown that metformin can be taken up by fish to some extent leading to tissue concentrations of about 55 ng/g in brown trout larvae exposed to 1000 µg/L metformin (Jacob et al. 2018; Ussery 2018). The mean guanylylurea concentration in the tissue of larval brown trout exposed to 1000 µg/L was about 11 ng/g, which is a factor of 5 lower compared to metformin. These low internal concentrations of metformin and its transformation product in fish might be related to the high polarity (logD=-3.85 for guanylylurea and -5.62 for metformin; calculation according to chemicalize.com) and charge (single for guanylylurea and double for metformin) of these compounds.

The present study demonstrated that guanylylurea did not lead to any lethal or embryotoxic effects in brown trout. Mortality and developmental parameters, like heart rate, hatching success and time to hatch were not influenced by the transformation product of metformin. Also, Ussery et al. (2019) showed that guanylylurea did not affect hatching success or time to hatch in Japanese medaka exposed for 28 days in an early life stage test at concentrations of 1-100 ng/L and for 165 days in a full life cycle test to 1 ng/L and 7.5 µg/L guanylylurea. Investigations of the parent compound metformin revealed comparable results (Jacob et al. 2018; Ussery et al. 2019); neither study showed a negative impact of the pharmaceutical on survival or development up to the highest concentrations applied.

The length and weight of brown trout was not affected by guanylylurea, neither in larvae nor in juveniles. When interpreting these results, one has to keep in mind that the brown trout were fed at maintenance and not ad libitum. This feeding regime was chosen due to the semi-static test design, since it is necessary to provide clean water with high oxygen content for brown trout. In contrast, Ussery et al. (2019) showed the weight and length of larval medaka to be decreased by guanylylurea, but it was not significantly reduced in adult medaka exposed in a full life-cycle test. Guanylylurea had no influence on the condition factor of the two life stages of brown trout; this was also observed by Ussery et al. (2019) for adult medaka. Metformin, the parent compound of guanylylurea, clearly reduced the growth of fish. This was shown for early life stages of Japanese medaka (Ussery et al. 2018), but also for brown trout (Jacob et al. 2018) and adult male fathead minnows in a full life cycle test (Niemuth & Klaper 2015). This metformin-induced effect might be explained by the appetite reducing capacity of metformin, which also explains its use as a weight loss drug (Malin & Kashyap 2014). Guanylylurea, in contrast, does not seem to show this activity in brown trout.

The biochemical analyses of lipid peroxides and stress proteins did not reveal any influences of guanylylurea on these stress parameters in larval and juvenile brown trout. Likewise, in big ramshorn snails (*Planorbis corneus*) exposed to 0.1-100 mg/L guanylylurea for 21 days, lipid peroxides and stress proteins were not changed by guanylylurea (Jacob et al. 2019). Thus, one explanation could be that guanylylurea does not induce proteotoxic or oxidative stress at all. However, it could also be possible that the peroxidation of lipids was prevented by increased activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase or catalase, which would lead to the neutralisation of ROS. Therefore, additional analysis of these antioxidant enzymes would be of advantage to gain more detailed insights into oxidative stress exerted in fish. This, however, was not possible in the present study due to restrictions with respect to tissue availability. Further information concerning the effects of guanylylurea on stress proteins and lipid peroxides, to the best of our knowledge, does not exist in the literature. The structurally similar compound guanidine serves as a scavenger for ROS, so

it contributes to reducing oxidative stress (Yildiz et al. 1998). The parent compound metformin was also shown to reduce the production of ROS; its anti-oxidative effect is known for type 2 diabetes patients who are prone to oxidative stress (Bonnetfont-Rousselot et al. 2003; Bułdak et al. 2014; Dehkordi et al. 2018). However, in a study with Japanese medaka, metformin increased the ROS level in male fish and the catalase activity in female fish, but it also reduced the glutathione level in male fish (Lee et al. 2019). Phenformin, an antidiabetic drug related to metformin, was shown to reduce ROS generation in the serum of rats, whereas it increased the ROS production in the brain (Anisimov et al. 2005). The same drug had no effect on the Hsp70 levels in hippocampal neurons (Lee et al. 2002). In contrast, the expression of stress protein Hsp70 was shown to be reduced by metformin in the pancreas of rats exposed to high free fatty acid levels (Piro et al. 2012). Despite all this information on chemically similar compounds, there is, currently, no indication that the transformation product guanyurea may exert or reduce oxidative or proteotoxic effects.

The swimming behaviour of juvenile brown trout also did not provide any evidence for a possible harmfulness of guanyurea. The high variation in the activity of brown trout exposed to 10 µg/L guanyurea was caused by exceptionally high swimming activity (total distance moved >2000 cm) of three out of nine individuals in this exposure group. Unfortunately, a comparison with literature data is not possible because studies dealing with the effects of guanyurea on behaviour are lacking. As shown in a previous study, neither the parent compound metformin changed the movement activity of brown trout larvae (Jacob et al. 2018) or the locomotor activity of zebrafish (Godoy et al. 2018). However, MacLaren et al. (2018) showed that metformin can influence the aggressive behaviour of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). Generally, endpoints of locomotor and movement activity seem to be suitable parameters for the assessment of neuroactive drugs like antidepressants (Brodin et al. 2014) as, e.g. citalopram enhanced the swimming activity of three-spine stickleback (Kellner et al. 2016). Since physiological stress effects were lacking in our experiments with guanyurea, it seems plausible that no behavioural disruption occurred.

The histopathological examinations did not reveal any guanyurea-induced changes in liver and kidney of brown trout. With respect to the two investigated life stages, the livers of larval brown trout were generally in a better condition than the livers of the juveniles. Since the test organisms in the lab were fed at maintenance but not ad libitum, as the latter is the case in breeding farms, such feeding regime could result in a lower hepatic glycogen amount, particularly for the larger juveniles. Symptoms like hyaline droplets and vacuoles in the proximal tubules of the kidney of the juveniles might be related to the altered water parameters, e.g. conductivity and pH, compared to the situation in the trout breeding farm. Such symptoms have also been observed in another study on brown trout performed in the laboratory (Schwarz et al. 2017). The absence of reactions in the kidney of the hatchery controls support this assumption. An increase in the hepatic glycogen amount, as it was the case for brown trout exposed to metformin (Jacob et al. 2018) indicating the therapeutic effect of the drug on glycogen depletion, could not be observed in the experiments with guanyurea.

Overall, none of the investigated endpoints in the present study revealed any effect of guanyurea on the development or health of brown trout. However, Ussery (2018) indicated that the transformation product of metformin can influence the hormone system, since the estradiol production in the liver of adult, male Japanese medaka exposed in a full life cycle test to 7.5 µg/L guanyurea was increased. This is of particular importance since the parent compound metformin was shown to exert endocrine effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) with an upregulation of vitellogenin mRNA in



juveniles (Crago et al. 2016) and adult males (Niemuth et al. 2015), the occurrence of intersex in adult males and reduced fecundity of mating pairs (Niemuth & Klaper 2015). However, vitellogenin production in the liver was not induced by guanylurea in Japanese medaka (Ussery 2018). Therefore, future studies should focus more explicitly on this hormone-changing aspect of guanylurea and the mode of action behind it.

In general, transformation products play a minor role in the regulation of pharmaceuticals. In the European Medicines Agency (EMA) guideline on the environmental risk assessment of medical products for human use, tests according to the OECD 308 on transformation of organic chemicals in water/sediment systems are requested for the base data set of each pharmaceutical which is provided in phase II, tier A of the environmental risk assessment (EMA 2006). These tests serve for the identification and quantification of transformation products that are formed at a level of  $\geq 10\%$  of the applied dose of the parent compound (OECD 2002). Berkner and Thierbach (2014) examined the OECD 308 tests of dossiers for marketing authorisation applications of pharmaceuticals and found 70% of the tests to show a formation of at least one transformation product, but only 26% of the studies to identify this product. These results reveal a significant data gap regarding the transformation products of pharmaceuticals that form in the environment. To date, in the new draft for the guidelines on the environmental risk assessment of pharmaceuticals of the EMA, the identification of transformation products according to the OECD 308 is no longer supposed to be part of the base data set of phase II, tier A (EMA 2018). Consequently, the environmental risk assessment of pharmaceuticals will stay 'blind' for the formation and action of transformation products. In addition, an evaluation of the ecotoxic effects of the transformation products is not mandatory for an environmental risk assessment of pharmaceuticals. This, however, would be of particular importance for transformation products that are very persistent or occur at higher environmental concentrations than its parent compound, as it is the case for guanylurea.

## **Conclusion**

Our study showed that guanylurea neither led to lethal, embryotoxic nor behavioural effects in brown trout at the tested concentrations. Also, the length, weight, biochemical markers (stress proteins and lipid peroxides) and tissue integrity of the main metabolic organs (liver and kidney) were not influenced by the transformation product of metformin. Internal concentrations were very low. Investigations of ecotoxic effects of transformation products are scarce in general and this also applies to guanylurea. Thus, we consider our present study as a rather elaborate starting point, at least for a risk assessment of fish toxicity, even though we admit that a final evaluation of the ecotoxic potential of guanylurea has not been completed, particularly in view of its endocrine potential. Nevertheless, we appeal to authorities to go ahead and implement the present data into the environmental risk assessment of the parent compound metformin.

## **Acknowledgements**

This study is part of the project Effect-Net (Effect Network in Water Research) which is part of the Wassernetzwerk Baden-Württemberg and funded by the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg. Particular thanks go to Thomas Braunbeck, Heidelberg University, for the coordination of this project. We are grateful to Melanie Biecker and Eileen Pfitzer for the analysis of biochemical markers which were conducted in context of their bachelor theses. Furthermore, we thank Andreas Dieterich, Birgit Dittrich, Stefanie Kraus, Lone Kundy, Katharina Peschke, Judith

Rüschhoff, Hannah Schmiege, Simon Schwarz, Sabrina Wilhelm and Michael Ziegler for technical assistance and help in the lab.

## References

Anisimov VN, Ukraintseva SV, Anikin IV, Popovich IG, Zabezhinski MA, Bertsein LM, Arutjunyan AV, Ingram DK, Lane MA, and Roth GS. 2005. Effects of phentermine and phenformin on biomarkers of aging in rats. *Gerontology* 51:19-28. <https://doi.org/10.1159/000081430>

Anurag P, and Anuradha C. 2002. Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats. *Diabetes Obes Metab* 4:36-42. <https://doi.org/10.1046/j.1463-1326.2002.00178.x>

Berkner S, and Thierbach C. 2014. Biodegradability and transformation of human pharmaceutical active ingredients in environmentally relevant test systems. *Environmental Science Pollution Research* 21:9461-9467. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1868-6>

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, and Wahli T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22:25-34. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49:3-8. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)

Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S, Gardes-Albert M, Jore D, Legrand A, Peynet J, and Vasson M. 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 52:586-589. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50093>

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. [https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brodin T, Piovano S, Fick J, Klaminder J, Heynen M, and Jonsson M. 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369:20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>

Buđak Ł, Łabuzek K, Buđak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, Suchy D, Duława-Buđak A, and Okopień B. 2014. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Reports* 66:418-429. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.11.008>

Caldwell DJ, D'Aco V, Davidson T, Kappler K, Murray-Smith RJ, Owen SF, Robinson PF, Simon-Hettich B, Straub JO, and Tell J. 2019. Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanyleurea: II. Occurrence in surface waters of Europe and the United States and derivation of predicted no-effect concentrations. *Chemosphere* 216:855-865. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.038>

Celiz MD, Tso J, and Aga DS. 2009. Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:2473-2484. <https://doi.org/10.1897/09-173.1>

- ChemIDplus. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/guanylurea> (accessed 16.08.2018).
- Chen JJ, and Yu BP. 1994. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 17:411-418. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90167-8)
- Crago J, Bui C, Grewal S, and Schlenk D. 2016. Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *General and Comparative Endocrinology* 232:185-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.030>
- Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wu K, Deng X, Jing Y, Jia M, Wan J, and Zhang L. 2014. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chemico-Biological Interactions* 216:34-42. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.013>
- Dehkordi AH, Abbaszadeh A, Mir S, and Hasanvand A. 2018. Metformin and its anti-inflammatory and anti-oxidative effects; new concepts. *Journal of Renal Injury Prevention* 8:54-61.
- Dieterich A, Troschinski S, Schwarz S, Di Lellis MA, Henneberg A, Fischbach U, Ludwig M, Gärtner U, Triebkorn R, and Köhler H-R. 2015. Hsp70 and lipid peroxide levels following heat stress in *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836) (Gastropoda, Pulmonata) with regard to different colour morphs. *Cell Stress & Chaperones* 20:159-168. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-014-0534-3>
- EMA. 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use.
- EMA. 2018. Draft - Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London: European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use.
- Escher BI, and Fenner K. 2011. Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environmental Science and Technology* 45:3835-3847. <https://doi.org/10.1021/es1030799>
- EU. 2006. Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. Available at <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:328:0014:0056:en:PDF%20> (accessed 19.09.2018).
- Godoy AA, Domingues I, Nogueira AJA, and Kummrow F. 2018. Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.031>
- Helbling DE, Hollender J, Kohler H-PE, Singer H, and Fenner K. 2010. High-throughput identification of microbial transformation products of organic micropollutants. *Environmental Science & Technology* 44:6621-6627. <https://doi.org/10.1021/es100970m>
- Hermes-Lima M, Willmore WG, and Storey KB. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine* 19:271-280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-x](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-x)
- Jacob S, Dötsch A, Knoll S, Köhler H-R, Rogall E, Stoll D, Tisler S, Huhn C, Schwartz T, and Zwiener C. 2018. Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? *Environ Sci Eur* 30:48. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0179-4>
- Jacob S, Köhler HR, Tisler S, Zwiener C, and Triebkorn R. 2019. Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*). *Frontiers in Environmental Science* 7:45. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00045>

- Johnson LL, Stehr CM, Olson OP, Myers MS, Pierce SM, Wigren CA, McCain BB, and Varanasi U. 1993. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. *Environmental Science & Technology* 27:2759-2771. <http://dx.doi.org/10.1021/Es00049a015>
- Kellner M, Porseryd T, Hallgren S, Porsch-Hällström I, Hansen SH, and Olsén KH. 2016. Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 173:19-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.026>
- Killeen J, McLay H, and Johnston I. 1999. Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons. *Journal of Fish Biology* 55:382-404. <http://dx.doi.org/10.1006/jfbi.1999.1004>
- Kümmerer K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90:2354-2366. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>
- Lee J, Chan SL, Lu C, Lane MA, and Mattson MP. 2002. Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *Experimental Neurology* 175:161-167. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7864>
- Lee JW, Shin Y-J, Kim H, Kim H, Kim J, Min S-A, Kim P, Do Yu S, and Park KJ. 2019. Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. 367:171-181.
- MacLaren RD, Wisniewski K, and MacLaren CJ. 2018. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. 13:e0197259.
- Malin SK, and Kashyap SR. 2014. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 21:323-329. <http://dx.doi.org/10.1097/MED.0000000000000095>
- Margulis B, Antropova O, and Kharazova A. 1989. 70 kDa heat shock proteins from mollusc and human cells have common structural and functional domains. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry* 94:621-623. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90138-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90138-7)
- Markiewicz M, Jungnickel C, Stolte S, Białk-Bielińska A, Kumirska J, and Mroziak W. 2017. Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *Journal of Hazardous Materials* 333:154-161. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.030>
- Moermond CT, Kase R, Korkaric M, and Ågerstrand M. 2016. CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35:1297-1309. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3259>
- Monserat JM, Geracitano L, Pinho GLL, Vinagre T, Faleiros M, Alciati JC, and Bianchini A. 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylene orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45:177-183. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0073-x>
- Niemuth NJ, Jordan R, Crago J, Blanksma C, Johnson R, and Klaper RD. 2015. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34:291-296. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2793>

Niemuth NJ, and Klaper RD. 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135:38-45. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.060>

OECD. 2002. OECD Guideline for the testing of chemicals (308) Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems. Available at [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-308-aerobic-and-anaerobic-transformation-in-aquatic-sediment-systems\\_9789264070523-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-308-aerobic-and-anaerobic-transformation-in-aquatic-sediment-systems_9789264070523-en) (accessed 08.02.2019).

Piro S, Rabuazzo A, Renis M, and Purrello F. 2012. Effects of metformin on oxidative stress, adenine nucleotides balance, and glucose-induced insulin release impaired by chronic free fatty acids exposure in rat pancreatic islets. *Journal of Endocrinological Investigation* 35:504-510.

Riegraf C, Fenner K, Werner I, and Kase R. 2017. Grenzwerte für Transformationsprodukte. *Aqua & Gas* 2:46-56.

Scheurer M, Michel A, Brauch H-J, Ruck W, and Sacher F. 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanyurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Research* 46:4790-4802. <https://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.019>

Scheurer M, Sacher F, and Brauch H-J. 2009. Occurrence of the antidiabetic drug metformin in sewage and surface waters in Germany. *Journal of Environmental Monitoring* 11:1608-1613. <http://dx.doi.org/10.1039/b909311g>

Schlüter-Vorberg L, Prasse C, Ternes TA, Mückter H, and Coors A. 2015. Toxication by transformation in conventional and advanced wastewater treatment: the antiviral drug acyclovir. *Environmental Science & Technology Letters* 2:342-346. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00291>

Schwaiger J, Bucher F, Ferling H, Kalbfus W, and Negele R-D. 1992. A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO): histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 23:31-48. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x\(92\)90010-K](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445x(92)90010-K)

Schwarz S, Schmiege H, Scheurer M, Köhler H-R, and Triebkorn R. 2017. Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Science of the Total Environment* 607:1026-1036. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.042>

Scott GR, and Sloman KA. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68:369-392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>

Tisler S, and Zwiener C. 2018. Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Science of the Total Environment* 628:1121-1129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.105>

Trautwein C, and Kümmerer K. 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanyurea. *Chemosphere* 85:765-773. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.057>

Triebkorn R, Casper H, Scheil V, and Schwaiger J. 2007. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:1405-1416. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-1033-x>

Ussery E. 2018. The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanyurea, on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) dissertation. University of Ontario.

Ussery E, Bridges KN, Pandelides Z, Kirkwood AE, Bonetta D, Venables BJ, Guchardi J, and Holdway D. 2018. Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 205:58-65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.003>

Ussery E, Bridges KN, Pandelides Z, Kirkwood AE, Guchardi J, and Holdway D. 2019. Developmental and full-life cycle exposures to guanyurea, and guanyurea-metformin mixtures results in adverse effects on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.4403>

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, and Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

Yildiz G, Demiryürek AT, Sahin-Erdemli I, and Kanzik I. 1998. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *British Journal of Pharmacology* 124:905-910. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701924>

# Anhang I

## Histopathologische Analyse

- Infiltration der Gewebeprobe

| Einbettungsschritt | Medium                           | Dauer |
|--------------------|----------------------------------|-------|
| Dehydrierung       | 70%iges Ethanol                  | 0,5 h |
|                    | 70%iges Ethanol                  | 1,5 h |
|                    | 80%iges Ethanol                  | 1 h   |
|                    | 90%iges Ethanol                  | 1 h   |
|                    | 96%iges Ethanol                  | 1 h   |
|                    | 100%iges Ethanol                 | 1 h   |
|                    | 100%iges Ethanol                 | 1 h   |
| Intermedium 1      | Isopropanol                      | 1,5 h |
|                    | Isopropanol                      | 2 h   |
| Intermedium 2      | 1:2 Isopropanol-Paraffin-Gemisch | 3 h   |
| Infiltration       | Paraffin                         | 3 h   |
|                    | Paraffin                         | 8 h   |

- HE-Färbung

Hämatoxylin: Fertiglösung Hämalalaun nach Mayer

Eosin: 3,75 g Eosin + 750 ml destilliertes Wasser + 8 Tropfen Eisessig

| Färbeschritt | Medium                    | Dauer  |
|--------------|---------------------------|--------|
| 1            | Roti - Histol             | 5 min  |
| 2            | Roti - Histol             | 5 min  |
| 3            | 100%iges Ethanol          | 5 min  |
| 4            | 90%iges Ethanol           | 5 min  |
| 5            | 80%iges Ethanol           | 5 min  |
| 6            | 70%iges Ethanol           | 5 min  |
| 7            | Aqua dest.                | 5 min  |
| 8            | Hämatoxylin               | 4 min  |
| 9            | Aqua dest.                | 4 s    |
| 10           | Fließendes Leitungswasser | 20 min |
| 11           | Eosin                     | 5 min  |
| 12           | 70%iges Ethanol           | 10 s   |
| 13           | 80%iges Ethanol           | 5 min  |
| 14           | 90%iges Ethanol           | 5 min  |
| 15           | 96%iges Ethanol           | 5 min  |
| 16           | 100%iges Ethanol          | 5 min  |
| 17           | Roti - Histol             | 5 min  |
| 18           | Roti - Histol             | 5 min  |

- Alcianblau-PAS-Färbung

3%ige Essigsäure: 2425 ml destilliertes Wasser + 75 ml Eisessig

Alcianblau: 10 g Alcianblau-8GX + 1 L 3%iger Essigsäure

Sulfitwasser: 2227,5 ml destilliertes Wasser + 22,6 ml 1M HCl + 11,25 g Natriumdisulfit

Schiffsches Reagenz: Fertiglösung

| Färbeschritt | Medium                    | Dauer  |
|--------------|---------------------------|--------|
| 1            | Roti - Histol             | 3 min  |
| 2            | 96%iges Ethanol           | 2 min  |
| 3            | 80%iges Ethanol           | 2 min  |
| 4            | 60%iges Ethanol           | 2 min  |
| 5            | Aqua dest.                | 5 min  |
| 6            | 3% Essigsäure             | 3 min  |
| 7            | Alcianblau                | 30 min |
| 8            | 3%ige Essigsäure          | 4 s    |
| 9            | Aqua dest.                | 5 min  |
| 10           | 1%ige Perjodsäure         | 10 min |
| 11           | Aqua dest.                | 5 s    |
| 12           | Aqua dest.                | 5 s    |
| 13           | Aqua dest.                | 5 s    |
| 14           | Schiffsches Reagenz       | 5 min  |
| 15           | Sulfitwasser              | 2 min  |
| 16           | Sulfitwasser              | 2 min  |
| 17           | Sulfitwasser              | 2 min  |
| 18           | Fließendes Leitungswasser | 15 min |
| 19           | Aqua dest.                | 5 s    |
| 20           | 70%iges Ethanol           | 5 min  |
| 21           | 80%iges Ethanol           | 5 min  |
| 22           | 90%iges Ethanol           | 5 min  |
| 23           | 100%iges Ethanol          | 5 min  |
| 24           | Roti - Histol             | 5 min  |

### Stressprotein-Analyse

- Homogenisieren der Proben

Extraktionspuffer: 3,9 g Kaliumacetat + 540 mg Magnesiumacetat + 2,4 g Hepes ad 500 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 7,5 einstellen

SDS-Puffer: 20 ml Glycerin + 3 g Natriumdodecylsulfat + 300 µl β-Mercaptoethanol + 140 mg Tris<sub>HCl</sub> + 20 mg Tris<sub>Base</sub> + 5 mg Bromphenolblau ad 100 ml bidestilliertes Wasser

- Bradford-Assay

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 + 50 ml 95%iges Ethanol + 100 ml 85%ige Phosphorsäure ad 1000 ml bidestilliertes Wasser



- Gelelektrophorese

30% Acrylamid/Bisacrylamid: 30 g Acrylamid, 300 mg N,N'-Bisacrylamid ad 100 ml bidestilliertes Wasser

4 x Trenngelpuffer: 18,5 g Tris<sub>HCl</sub> + 76,95 g Tris<sub>Base</sub> + 2 g SDS ad 500 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 8,8 einstellen

4 x Sammelgelpuffer: 17,55 g Tris<sub>HCl</sub> + 1,68 g Tris<sub>Base</sub> + 2 g SDS ad 500 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 6,8 einstellen

10 % Ammoniumpersulfat (APS): 1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml bidestilliertes Wasser

TEMED: Fertiglösung von Merck

Trenngel ansetzen (für 2 Gele): 2,65 ml bidestilliertes Wasser + 3 ml Acrylamid/Bisacrylamid + 1,87 ml Trenngelpuffer + 40 µl Starter APS + 20 µl TEMED

Sammelgel ansetzen (für 2 Gele): 1,4 ml bidestilliertes Wasser + 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid + 0,6 ml Sammelgelpuffer + 10 µl Starter APS + 10 µl TEMED

10 x E-Puffer + SDS: 143 g Glycin + 30,3 g Tris<sub>Base</sub> + 10 g SDS ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

- Proteintransfer

10 x Transferpuffer: 9,5 g Tris<sub>HCl</sub> + 63,4 g Tris<sub>Base</sub> + 36,3 g Glycin + 4,6 g SDS ad 1000 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 9 einstellen

1 x Transferpuffer: 80 ml 10x Transferpuffer + 720 ml bidestilliertes Wasser + 200 ml Methanol, auf pH 9 einstellen

- Antikörper-Inkubation

10 x TBS: 88 g NaCl + 63,5 g Tris<sub>HCl</sub> + 11,8 g Tris<sub>Base</sub> ad 1000 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 7,5 einstellen

1 x TBS: 100 ml 10 x TBS ad 1000 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 7,5 einstellen

Absättigungslösung: 5 ml Horse serum + 5 ml TBS

1. Antikörperlösung: 4,5 ml TBS + 0,5 ml Horse serum + 1 µl 1. Antikörper (mouse anti-human Hsp70)

2. Antikörperlösung: 4,5 ml TBS + 0,5 ml Horse serum + 5 µl 2. Antikörper (goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat)

- Färbung der Membranen

30 mM Tris: 0,66 g Tris<sub>HCl</sub> + 1,31 g Tris<sub>Base</sub> ad 500 ml bidestilliertes Wasser, auf pH 8,5 einstellen

Färbelösung (für 2 Filter): 4,5 mg 4-Chlor(1)naphtol + 1,5 ml Methanol + 25 ml 30 mM Tris + 40 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **Lipidperoxid-Analyse**

FeSO<sub>4</sub>-Lösung: 208,515 mg ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung: 3,99 ml ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

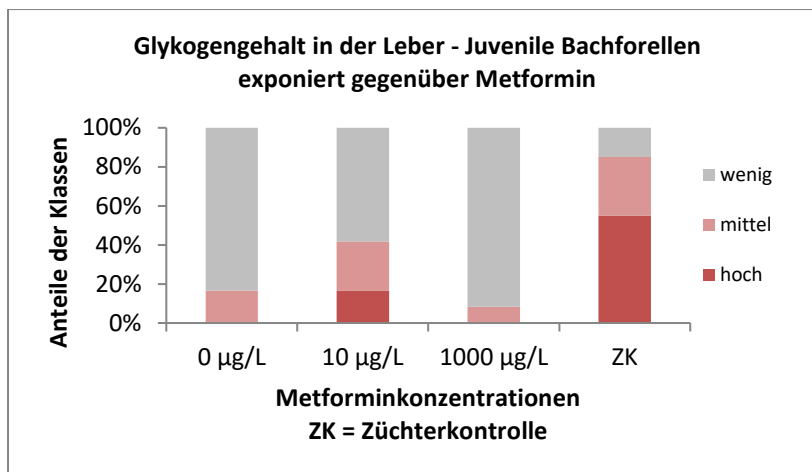
Xylenolorange-Lösung: 228,174 mg ad 1000 ml bidestilliertes Wasser

Cumolhydroperoxid-Lösung: 75 µl ad 500 ml bidestilliertes Wasser

## Anhang II

- Rohdaten zu Versuch 2: Exposition von juvenilen Bachforellen gegenüber Metformin (Mittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Parameter)

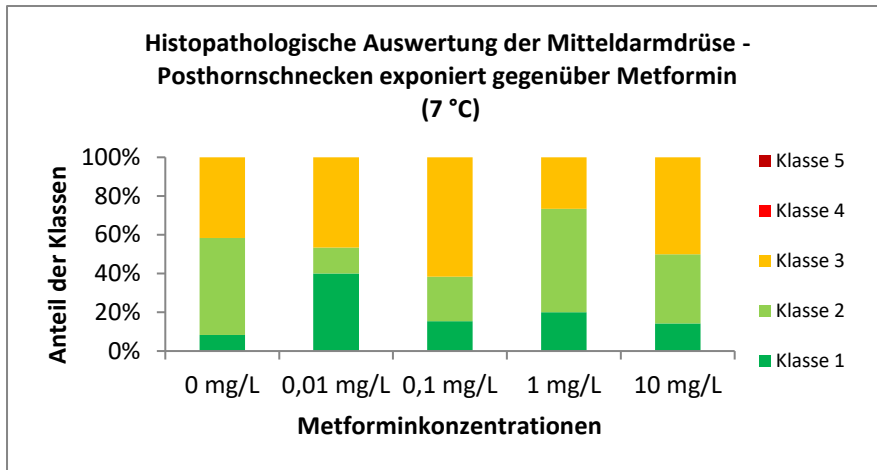
|                                  | 0 µg/L          | 10 µg/L         | 1000 µg/L       |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mortalität [%]                   | 0 ± 0           | 3,3 ± 0,1       | 3,3 ± 0,1       |
| Gewicht [g]                      | 1,63 ± 0,48     | 1,59 ± 0,43     | 1,81 ± 0,48     |
| Länge [cm]                       | 5,3 ± 0,6       | 5,4 ± 0,5       | 5,5 ± 0,6       |
| Hsp70-Level [relativer Grauwert] | 3,35 ± 1,22     | 3,43 ± 1,38     | 3,42 ± 1,67     |
| Zurückgelegte Distanz [cm]       | 1148,9 ± 1366,1 | 1801,5 ± 1374,2 | 1732,2 ± 1649,8 |
| Geschwindigkeit [cm/s]           | 1,1 ± 1,3       | 1,7 ± 1,3       | 1,6 ± 1,5       |



| <b>Bakterielle Zusammensetzung des Darmmikrobioms</b> |        |         |           |
|-------------------------------------------------------|--------|---------|-----------|
|                                                       | 0 µg/L | 10 µg/L | 1000 µg/L |
| <b>Proteobacteria</b>                                 | 64,3 % | 44,9 %  | 42,7 %    |
| <b>Firmicutes</b>                                     | 26,8 % | 39,9 %  | 40,7 %    |
| <b>Actinobacteria</b>                                 | 5,5 %  | 9,7 %   | 13,7 %    |
| <b>Bacteroidetes</b>                                  | 1,2 %  | 2,5 %   | 1,8 %     |
| <b>Rest</b>                                           | 2,2 %  | 3,0 %   | 1,1 %     |

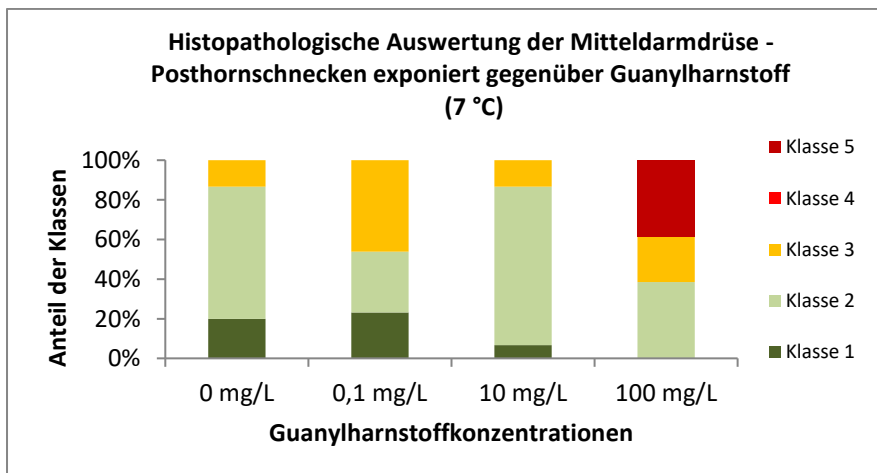
- Rohdaten zu Versuch 3: Exposition von Posthornschncken gegenüber Metformin bei 7 °C (Mittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Parameter)

|                                                      | 0 mg/L       | 0,01 mg/L    | 0,1 mg/L     | 1 mg/L       | 10 mg/L      |
|------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Mortalität [%]                                       | 0 ± 0        | 0 ± 0        | 4,8 ± 6,7    | 0 ± 0        | 0 ± 0        |
| Gewicht [g]                                          | 2,74 ± 1,30  | 2,85 ± 1,27  | 3,23 ± 1,68  | 3,03 ± 1,19  | 3,12 ± 1,42  |
| Hsp70-Level [relativer Grauwert]                     | 1,11 ± 0,37  | 1,18 ± 0,31  | 0,96 ± 0,23  | 1,15 ± 0,33  | 0,97 ± 0,21  |
| Lipidperoxid-Level [CHP-Äquivalente/ mg Nassgewicht] | 13,17 ± 1,66 | 12,17 ± 2,67 | 13,42 ± 2,04 | 13,05 ± 1,57 | 13,04 ± 2,67 |



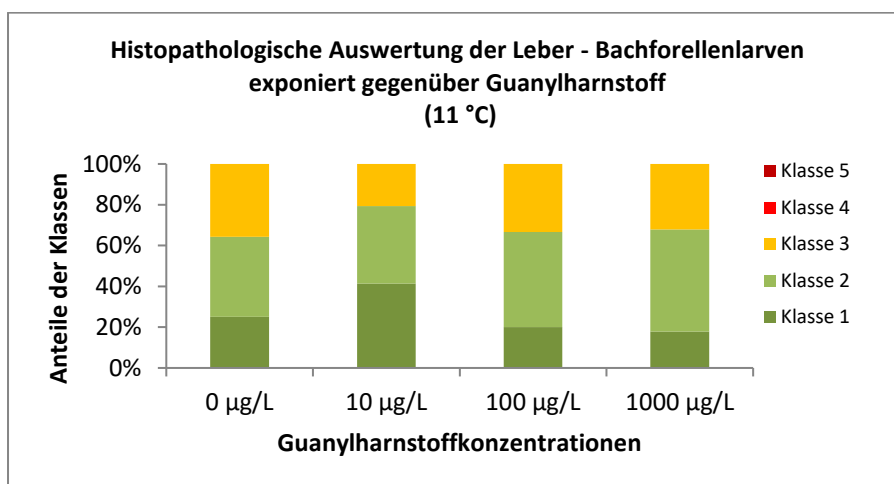
- Rohdaten zu Versuch 4: Exposition von Posthornschncken gegenüber Guanylharnstoff bei 7 °C (Mittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Parameter)

|                                                             | 0 mg/L       | 0,1 mg/L     | 10 mg/L      | 100 mg/L      |
|-------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>Mortalität [%]</b>                                       | 0 ± 0        | 0 ± 0        | 0 ± 0        | 28,57 ± 11,66 |
| <b>Gewicht [g]</b>                                          | 2,01 ± 0,54  | 1,80 ± 0,63  | 1,53 ± 0,62  | 1,53 ± 0,35   |
| <b>Hsp70-Level [relativer Grauwert]</b>                     | 1,02 ± 0,29  | 0,95 ± 0,19  | 0,91 ± 0,15  | 1,04 ± 0,30   |
| <b>Lipidperoxid-Level [CHP-Äquivalente/ mg Nassgewicht]</b> | 11,97 ± 5,80 | 11,67 ± 2,93 | 13,43 ± 3,77 | 14,31 ± 4,54  |



- Rohdaten zu Versuch 6: Exposition von Bachforellenlarven gegenüber Guanylharnstoff bei 11 °C (Mittelwerte und Standardabweichung der untersuchten Parameter)

|                                                             | 0 µg/L       | 10 µg/L      | 100 µg/L     | 1000 µg/L    |
|-------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Mortalität [%]</b>                                       | 4,4 ± 1,6    | 5,6 ± 3,1    | 6,7 ± 7,2    | 1,1 ± 1,6    |
| <b>Schlupf [Tage nach Befruchtung]</b>                      | 50,6 ± 0,6   | 50,3 ± 0,8   | 50,3 ± 0,6   | 50,6 ± 0,7   |
| <b>Herzschlagrate [Schläge pro Minute]</b>                  | 84,6 ± 4,9   | -            | -            | 84,4 ± 6,0   |
| <b>Gewicht [g]</b>                                          | 0,67 ± 0,20  | 0,69 ± 0,20  | 0,70 ± 0,21  | 0,70 ± 0,23  |
| <b>Länge [cm]</b>                                           | 4,2 ± 0,5    | 4,2 ± 0,4    | 4,2 ± 0,5    | 4,2 ± 0,5    |
| <b>Lipidperoxid-Level [CHP-Äquivalente/ mg Nassgewicht]</b> | 16,96 ± 6,03 | 16,27 ± 4,61 | 14,69 ± 3,79 | 17,18 ± 5,04 |



## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

- S. Jacob, A. Dötsch, S. Knoll, H.-R. Köhler, E. Rogall, D. Stoll, S. Tisler, C. Huhn, T. Schwartz, C. Zwiener, R. Triebkorn, Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?; Environmental Science Europe 30 (48) 2018, doi:<https://doi.org/10.1186/s12302-018-0179-4>
- S. Jacob, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Zwiener, R. Triebkorn, Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanyurea on the health of the big ramshorn snail (*Planorbis corneus*); Frontiers in Environmental Science 2019, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00045>
- S. Jacob, S. Knoll, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Huhn, C. Zwiener, R. Triebkorn, Does guanyurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, affect the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?; PeerJ 7:e7289 2019, doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.7289>
- P. Thellmann, K. Greiner-Perth, S. Jacob, M. Knoll, M. Schäfer, M. Stängle, M. Ziegler, M. Scheurer, H.-R. Köhler, R. Triebkorn, Does Waste Water Treatment Plant Upgrading with Powdered Activated Carbon Result in Reduced Water and Sediment Toxicity of the Receiving Stream?; International Journal of Water and Wastewater Treatment 2017, doi: <https://doi.org/10.16966/2381-5299.141>
- S. Wilhelm, S. Jacob, M. Ziegler, H.-R. Köhler, R. Triebkorn, Influence of different wastewater treatment technologies on genotoxicity and dioxin-like toxicity in effluent-exposed fish; Environmental Sciences Europe 30 (25) 2018, doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0154-0>
- S. Jacob, L. Kundy, M. Biecker, R. Triebkorn, Einfluss des Antidiabetikums Metformin und seines Transformationsprodukts Guanylarnstoff auf den Gesundheitszustand der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*), Vortrag zur Jahrestagung der SETAC-GLB in Münster 2018
- S. Jacob, L. Kundy, M. Biecker, E. Rogall, T. Schwartz, R. Triebkorn, Impact of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanyurea on brown trout (*Salmo trutta f. fario*), Posterbeitrag zur Jahrestagung der SETAC-Europe in Rom 2018
- S. Jacob, L. Kundy, E. Rogall, T. Schwartz, R. Triebkorn, Impact of the antidiabetic drug metformin and the artificial sweetener sucralose on brown trout (*Salmo trutta f. fario*), Posterbeitrag zur Jahrestagung der SETAC-Europe in Brüssel 2017
- S. Jacob, R. Triebkorn, Impact of the antidiabetic drug metformin on brown trout, Posterbeitrag zur Jahrestagung der SETAC-Europe in Nantes 2016
- S. Jacob, R. Triebkorn, Einfluss des Antidiabetikums Metformin und des Zuckerersatzstoffes Sucralose auf die Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*), Posterbeitrag zur Jahrestagung SETAC-GLB in Tübingen 2016
- S. Jacob, S. Knoll, E. Rogall, S. Tisler, C. Huhn, T. Schwartz, C. Zwiener, R. Triebkorn, Einfluss von Metformin und Guanylarnstoff auf Bachforellen und Posthornschnecken, Posterbeitrag zum Statuskolloquium Wassernetzwerk in Stuttgart 2018
- S. Mieck, S. Jacob, S. Tisler, C. Zwiener, R. Triebkorn, T. Braunbeck, Effekte von Sucralose bei Zebraabrämlingen und Bachforellen, Posterbeitrag zum Statuskolloquium Wassernetzwerk in Stuttgart 2018

## Danksagung

Mein Dank geht an das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, das im Rahmen des Verbundprojekts *Wassernetzwerk Baden-Württemberg* das Projekt Effect-Net ins Leben gerufen hat.

Ganz besonders danken möchte ich Prof. Dr. Rita Triebkorn, die mir die Möglichkeit gab, meine Promotion im Rahmen des Effect-Net-Projekts zu machen. Sie hat mich während der ganzen Promotionszeit bei allen Fragen und Problemen unterstützt sowie bei der Erstellung der Paper und bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Heinz R. Köhler, der mir ebenfalls mir Rat und Tat zur Seite gestanden und bei der Erstellung der Paper geholfen hat. Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Christian Zwiener für seine Tätigkeit als Betreuer und Gutachter meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe *Physiologische Ökologie der Tiere* für die gute Arbeitsatmosphäre und insbesondere allen, die mich bei den Probenahmen und im Labor unterstützt haben: Hannah Schmiege, Sabrina Wilhelm, Michael Ziegler, Simon Schwarz, Andreas Dieterich, Katharina Peschke, Stefanie Kraus sowie Lone Kundy, Melanie Biecker, Joanna Probst, Jochen Schwantzer, Eileen Pfitzer, Helene Eckstein, Philipp Huith, Kathrin Leinmüller, Lukas Reinelt, Judith Rüschoff und Rubén Fernández Sánchez.

Ein großes Dankeschön geht an alle Partner des Effect-Net-Teams und an Prof. Dr. Thomas Braunbeck für die Koordination des Projekts. Besonders hervorheben möchte ich hier die Arbeitsgruppen Zwiener, Huhn und Schwartz, die begleitend zu meinen Experimenten die chemische Analytik von Wasser- bzw. Gewebeprobe sowie die Analyse des intestinalen Mikrobioms vorgenommen haben. Vielen Dank auch an Selina Tisler, Sarah Knoll, Susanna Mieck, Florian Zindler, Eike Rogall, Siegfried Hohmann und Simon Schaub für die gegenseitige Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Für die Aufmunterung und Motivation möchte ich meinen Freunden danken, die ich während der Promotionszeit gewinnen konnte: Hannah Schmiege, Sabrina Wilhelm, Simon Schwarz, Paul Thellmann, Carla Lorenz, Andreas Dieterich und Michael Ziegler.

Schließlich möchte ich auch meinen Eltern und Simon für die große Unterstützung während der ganzen Promotionszeit danken.