Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

White Mice Mus Musculus liver

Faeza Nasir Toama **Aziz Khalid Hamid** **Asmat Jamal Jameel**

Science \University Kirkuk . **Science\University Tikrit.** ***Veterinary Medicine*\ kirkuk.**

FN-Faezahisto@yahoo.com **Azezkhalid370@yahoo.com**
Doctoresmat2016@gmail.com

(بحث مستل عن أطروحة الدكتوراه)

Abstract

The study included the effect of metformin drug over dose in the liver pregnant non – Diabetic mice with weight ranged (25±2) gm , Orally administration of (1.8 , 2.85) mg of drug from (6-18)th day of pregnancy in the morning and once time daily, Drug caused death in half number of animals in (١.٨) mg concentrate and caused significant increase in liver weight in high concentration 2.85 mg and non significant in low concentration compared with control group (non treated) , In addition some histologically changes that included inflammatory cells around damaged blood vessels which increase with high dose caused primary biliary cirrhosis . Other changes include Degeneration , necrosis , Blood vessels damage ,Greenish, Congestion and hemorrhage and fibrosis in the liver of dead mice .

Keyword: Metformin drug , Pregnant mice, Death animals, Histological changes.

تأثير الجرع المفرطة من عقار المتفورمين Metformin Drug في كبد الفئران الحوامل البيض Mus Musculus

Web Site: www.kujss.com Email: kirkukjoursci@yahoo.com, kirkukjoursci@gmail.com

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

فائزة ناصر طعمة **عزيز خالد حميد** **عصمت جمال جميل**

العلوم / جامعة كركوك **العلوم/ جامعة تكريت** **الطب البيطري/ جامعة كركوك**

FN-Faezahisto@yahoo.com Azezkhalid370@yahoo.com
Doctoresmat2016@gmail.com

الخلاصـــــــة

تضمنت هذه الدراسة التعرف على تأثير الجرع المفرطة من عقار المتفورمين في كبد الفئران الحوامل غير المصابة بداء السكر، بمعدل وزن (25±2) غم ، حيث جرعت الفئران فموياً بتركيز (١.٨ و٢.٨٥) ملغم من وزن الفأرة إعتباراً من اليوم السادس من الحمل الى اليوم الثامن عشر وذلك في الصباح الباكر ولمرة واحدة في اليوم ، سبب العقار حصول وفاة في نصف العدد من الحيوانات في التركيز ١.٨ ملغم كما لوحظ حصول تغير في وزن الكبد إذ حصلت زيادة معنوية في معدل وزن الكبد في التركيز العالي ٢.٨٥ ملغم وغير معنوي في التركيز الواطئ مقارنة بمجموعة السيطرة غير المعاملة فضلاً عن حصول العديد من التغيرات النسجية تمثلت بالارتشاح اللمفي حول الاوعية الدموية المتضررة والذي يزداد في التركيز العالي مسبب التشمع الصفراوي البدائي ، إضافة الى حصول تنخر في الخلايا بنوعية البؤري والقرصي فضلاً عن حصول التنكس ، تلف الاوعية الدموية ، حالة اللون النفطي ، الاحتقان والنزف وكذلك التليف في كبد الفئران الميتة .

الكلمات الدالة : عقار المتفورمين ، الفئران الحوامل ، الحيوانات الميتة ، التغيرات النسجية

المقدمـــــــــة

يعتبر عقار المتفورمين من مركبات البايكوانيد التي تتكون من مجموعتين Guanidine مرتبطة مع حلقة من الامونيا و يكون بشكل مسحوق ابيض ، ضعيف الذوبانية في الكحول

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

ويذوب بشكل سريع في الماء ، الجرعة العلاجية الموصى بها ٥٠٠ ملغم \ ٧٠ كغم للانسان [١] وأقصى جرعة ٢.٥ غرام ، تؤخذ مرتان الى ثلاث مرات في اليوم مع وجبة الافطار والعشاء ، مضاد لارتفاع السكر ولا يحفـــز على افراز الانسولين من البنكرياس ، يقلل السكر بواسطـــة خفض المنتوج الكبدي للكلوكـــوز وزيـــادة فعالية الانسولين في العضلات والدهون من خلال فعالية إنزيم Ampkinase [٢] ، يعطى العقار على شكل اقراص عن طريق الفم ويتم أمتصاصه بشكل جيد في الأمعاء ولا يؤيض في الكبد ويطرح مع الادرار والصفراء عن طريق النقل الفعال بواسطة الناقل الكايتوني العضوي المتضمن النقل الفعال عبر ظهارة الأمعاء ثم ينقل المتفورمين الى الخلايا الكبدية والى الخلايا الظهارية للنبيبات البولية ومن ثم الى النبيب البولي [٣] . يمكن أن يستخدم العقار بمفرده أو مع أدوية اخرى خافضة للسكر في حالة عدم قدرة الدواء المنفرد لخفض السكر [٤] كما يعمل على خفض الانسولين والكلوكوز في السكريين [٥] ، و يستخدم في علاج متلازمة تكيس المبايض Polycystic Ovaries Syndrome [٦] حيث يصاب الكثير من النساء بمتلازمة تكيس المبايض ويمثل التكيس السبب الاكثر شيوعاً في العقم بنسبة ٧٥% [٧] ، عند أستخدامه لفترة طويلة قد يسبب إعاقة امتصاص فيتامين B12 في الأمعاء مما ينتج عنه خفض في هذا الفيتامين في الجسم [٨] ، كما يمكن أن يسبب الحماض اللبني Lactic Acidosis إلا أن هذه الحالة تكون نادرة و المرضى الاكثر تعرضاً لها هم الذين يعانون من قصور في وظائف الكلى والكبد [٩] ، كما انه يزيد من معدل الهوموسيستين Homocysteine الذي يعد الخطر الاساسي لأستخدامـــه ويعتبر الهوموسستين حامض اميني يحتوي على الكبريت يوجد طبيعياً في بلازما الدم ويسبب ارتفاعه التهاب في جدار الأوعية الدموية وامرض القلب الأخرى [١٠].، وأثبتت بعض الدراســات انخفاض معدله عند أستخدام العقار مع حامض الفوليـــك إذ يقوم الحامض بتقليل معـــدل الهوموسيستين المرتفع[١١].

المـــواد وطرائـــق العمـــل

أجريت الدراسة الحالية على الفئران البيض الحوامل بعمر (١٢-١٦) أسبوع وبمعدل وزن (2±25) غم ، تم تربيتها في أوضاع مختبرية مناسبة من حيث الإضاءة والعليقة ، عزلت الاناث مساءً مع الذكور لغرض التزواج وشخص الحمل صباحا من خلال وجود السدادة المهبلية Vginal Plug وتم أعتبار اليوم الذي حصل فيه الاخصاب صفر من الحمل واليوم الذي يليه

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

هو اليوم الأول [١٢] . أستخدم عقار المتفورمين بهيئة حبوب بتركيز ملغم مصنعة من شركة (Merck Sant S.A.S. Lyon- France) ، تم تحديد الجرعة المفرطة بالاعتماد على الجرعة العلاجية الموصى بها في الانسان (٥٠٠ - ٢٥٠٠) ملغم من وزن الجسم ٧٠ كغم ، ومن ثم معادلتها وفقا لوزن الفئران (٢٥) غم [١٣] و بعد ذلك استخدم تركيز أعلى من الجرع الموصى بها وبالتالي تكون الجرعة المفرطة للفئران بتركيز (١.٨ و٢.٨٥) ملغم من وزن الجسم ٢٥ غم والتي تقابل في الانسان بتركيز ٥٠٠٠و٨٠٠٠ ملغم من وزن الجسم ، ولغرض تحديد الكمية اللازم تجريعها بالمل للفئران تم اذابة الحبوب في ٥٠٠ مل من الماء المقطر فبالتالي تصبح الجرعة بالمليلتر بالشكل التالي (١.٨ ملغم \ ١٨٠. مل) و (٢.٨٥ ملغم \ ١٨٠. مل) لكل فأرة [١٣] ، قسمت الفئران الى ثلاثة مجاميع ، المجموعة الأولى هي مجموعة السيطرة غير المعاملة ، المجموعة الثانية عوملت بتركيز ١.٨ ملغم والمجموعة الثالثة عوملت بتركيز ٢.٨٥ ملغم . جرعت فموياً بواسطة المجرعة الخاصة Cavage Tube في اليوم السادس من الحمل ولغاية اليوم الثامن عشر في الصباح ولمرة واحدة في اليوم ، شرحت في اليوم الثامن عشر من الحمل بعد تخديرها بمادة الكلوروفورم لثوان ومن ثم وضعت في طبق التشريح وبعد شق التجويف البطني أستخرج الكبد ووضع في طبق بتري يحوي NaCl بتركيز ٠.٩ % ومن ثم وزن بواسطة ميزان الكتروني حساس و نقل بعدها الى قنينة تحوي الفورمالين بتركيز ١٠% لمدة ٤٨ ساعة لغرض التثبيت وتهيئته لخطوات التحضير النسجي المتضمنة (الغسل ، الإنكاز ، الترويق ،الارتشاح ، الطمر، التشذيب والتقطيع ، التصبيغ والارساء) ، فحصت وصورت المقاطع النسجية بأستخدام مجهر ضوئي مزود بشاشة (Novel – Russia) .

حللت النتائج احصائياً باستخدام اختبار تحليل التباين(F-test) وقورنت المتوسطات الحسابية باستخدام اختبار دانكن متعدد الحدود بمستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) [١٤] .

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج حصول وفاة لنصف العدد في الحيوانات في تركيز (١.٨) ملغم في منتصف الحمل بين الجرعة (٨-٦) من العقار في الصباح التالي ، اعزوا بعض الباحثين أن سبب الوفاة بالجرعة الزائدة من عقار المتفورمين قد يكون بسبب حصول الحماض اللبني Lactic

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

Acidosis بنسبة (٣٠-٥٠ %) حيث أن الية ارتباط عقار المتفورمين مع الحماض اللبني غير مفهومة لحد الآن على الرغم من أن المعروف أن العقار يتراكم في الأمعاء فيؤدي إلى زيادة إنتاج اللاكتات مما يقلل من درجة الحموضة داخل الكبد ويقلل من عملية التمثيل الغذائي للاكتات عن طريق قمع و أخماد Carboxylase Pyruvate ويقلل أيضا أستخدام الكلوكوز ويزيد من أنتاج اللاكتات بواسطة خلايا الكبد [١٥] وهناك حالة أحضرت ألى أحدى المستشفيات عن فتاة بعمر١٥ عام بسبب تناول ٣٨.٢٥ غم من عقار المتفورمين لمحاولة الانتحار ولاحظوا بعد الكشف وجود الحماض اللبني وهذه الجرعة مقاربة للجرعة المستخدمة في هذه الدراسة. وفضلاً عما ذكر يمكن إعتبار فشل الكبد السبب في حصول الوفاة نتيجة حصول التشمع اذ لوحظ التشمع الصفراوي البدائي في بعض المقاطع النسجية ، وذكرت بعض الدراسات ان التشمع قد يتطور الى حصول فشل في الكبد وبالتالي يسبب الوفاة [١٦] .

كما لوحظ من خلال النتائج والتحليل الاحصائي حصول زيادة معنوية بمستوى احتمالية 0.05 ≥ في معدل وزن الكبد بتركيز (٢.٨٥) ملغم بينما كانت الزيادة غير معنوية في تركيز (١.٨)ملغم مقارنة بمجموعة السيطرة غير المعاملة كما موضح في الجدول أدناه.

جدول يبين تأثير المعاملات على معدل وزن الكبد (g) في الفئران الحوامل ± الانحراف المعياري

المجاميع	التراكيز	معدل وزن الكبد ±

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

		الانحراف المعياري
المجموعة الأولى	سيطرة	١.٨٦ ± ٠.٢٢ b
المجموعة الثانية	1.8 ملغم	١.٨٩ ± ٠.٠٧ ab
المجموعة الثالثة	2.85 ملغم	٢.٢٧ ± ٠.٢٨ a

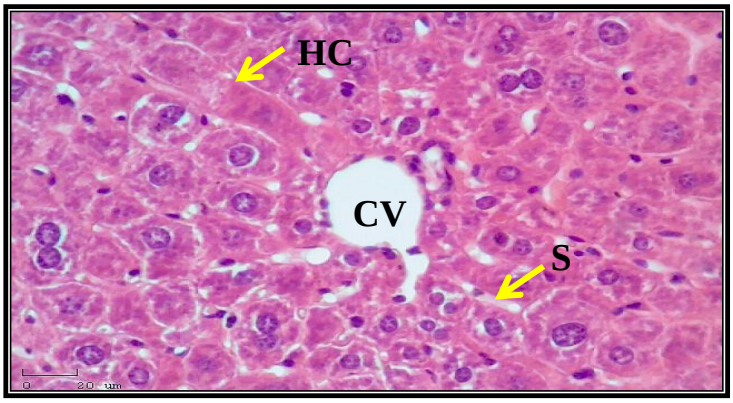
الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات بمستوى معنوي $P \leq 0.05$ الأحرف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات بمستوى معنوي $P \leq 0.05$

تعزى الزيادة الوزنية الى التغيرات النسجية التي حصلت نتيجة المعاملة اذ لوحظ ارتشاح الخلايا اللمفية وزيادتها بالعدد بالإضافة الى إحتقان أغلب الأوعية الدموية وتحلل بعض الكريات كلياً وجزئياً بالتالي ساهمت هذه التغيرات في زيادة معدل وزن الكبد وبما أن التغيرات كانت بأقل نسبة في التركيز الاوطأ الامر الذي سبب الزيادة غير المعنوية ، وأشار [١٧] أن زيادة عدد الخلايا اللمفية في النسيج يسبب زيادة في وزن العضو وهذا ما لوحظ في المقاطع النسجية بوجود الخلايا الألتهابية .

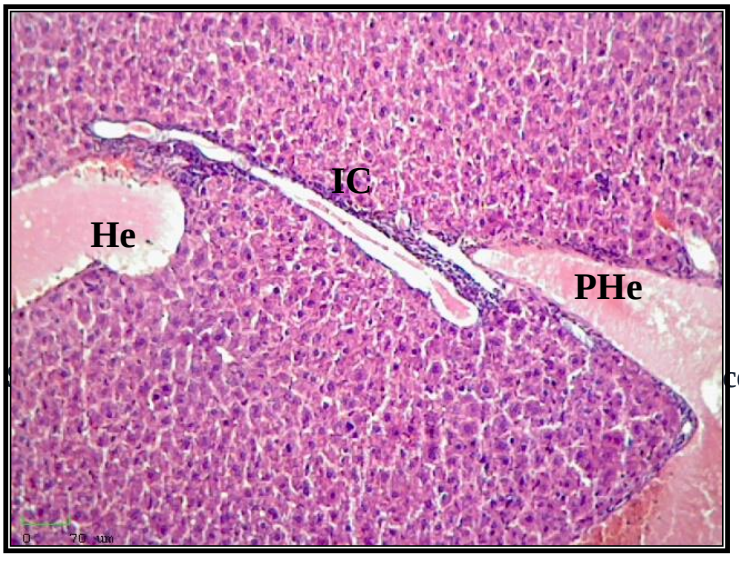
التغيرات النسجيـــــــــــة :-

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

قورنت المقاطع النسجية لكبد الفئران المعاملة مع كبد الفئران الحوامل السيطرة ، اذ توضح الصورة (١) كبد مكون من وريد مركزي Central Vein محاط بخلايا كبدية Hepatocytes مرتبة بشكل حبال Cords بتنظيم شعاعي وما بينها الجيبانيات Sinusoids.



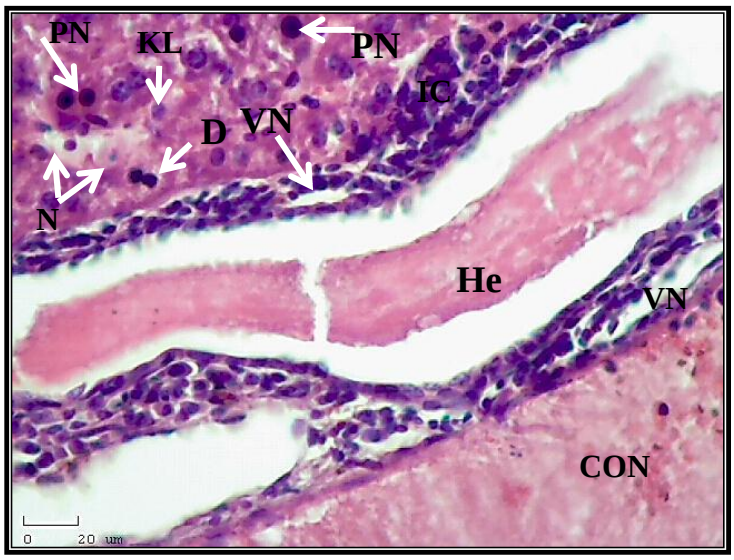
في حين أظهر الفحص النسجي لكبد الفئران المعاملة عدد من الآفات النسجية تمثلت في التركيز ١.٨ ملغم بحصول ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cell Infiltration حول الأوعية الدموية المتوسعة والمحتقنة Congestion والذي يربط بينهما مقارنة بمجموعة السيطرة ، فضلاً عن حصول تحلل جزئي لكريات الدم الحمر Partial Hemolysis داخل الاوعية ، الصورة (٢) . وعند تكبير المقطع لوحظ تنخر فجوي Vaculated Necrosis في جدار الاوعية الدموية فضلا عن التحلل الدموي Hemolysis التام في الجزء الرابط ما بينها ، كذلك سبب العقار تلف في الخلايا الكبدية اذ لوحظ حصول تنكس Degeneration في بعض الخلايا وتنخر Necrosis عدد قليل منها كما لوحظ تكثف المادة النووية في بعض الانوية Pyknotic وتحلل Karyolysis بعضها ، الصورة (٣).



Web com,

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

الصورة (٢) توضح كبد فأر حامل معاملة بتركيز ١.٨ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) كبير يربط اوعية دموية محتقنة متحللة جزئياً Partial Hemolysis(PHe) مع بعضها .الصبغة H&E،١٠٠X

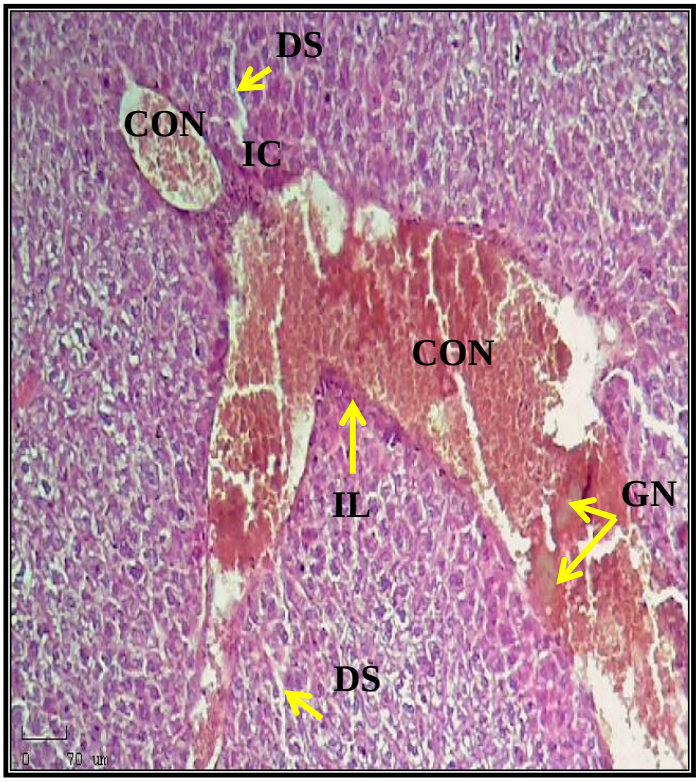


الصورة (٣) توضح كبد فأر حامل معاملة بتركيز ١.٨ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) حول الاوعية الدموية المحتقنة Congestion (CON) ، تنخرفجوي Vaculated (VN)Necrosis في الجدار، تحلل دموي Hemolysis(He) في الجزء الرابط بين الاوعية ، تكثف المادة النووية Pyknotic Nucleous (PN)، تحلل الانوية Karyolysis (KL)، تنكس الخلايا Degeneration (D) وتنخر Necrosis (N) .الصبغة H&E،٤٠٠X

اما في التركيز ٢.٨٥ ملغم فلوحظ زيادة الاحتقان في الاوعية الدموية المتوسعة المحاط بالخلايا اللمفية المرتشحة وحصول حالة اللون النفطي - Greenish في مناطق التحلل الدموي وتلف اغلب الخلايا فضلاً عن توسع الجيبانيات Dilated Sinusoids ، الصورة (٤) وعند تكبير المقطع لوحظ تسمك Wall Thickening في جدار الوعاء الدموي المحتقن وتنخر في الخلايا القريبة وتنكس وتنخر أغلب الخلايا الكبدية وتحلل الانوية ، الصورة (٥) ، كما شخص حصول التشمع الصفراوي البدائـي Biliary Primary Cirrhosis بسبب زيادة حدة الالتهاب

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849

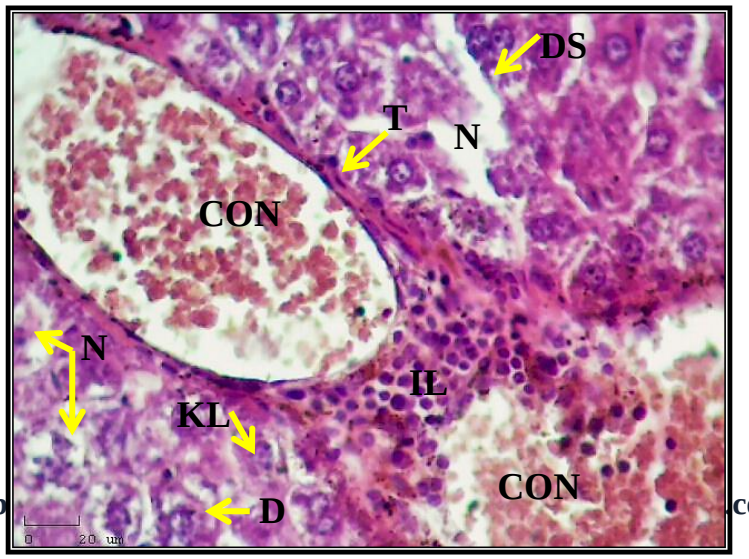
الذي يمتاز بوجود الالتهاب في المنطقة البابية ويحصر بينه خلايا حامضية الصبغة Eosinophilic Cell ، الصورة (٦).



الصورة (٤) توضح كبد فأر حامل معاملة بتركيز ٢.٨٥ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells (IC) Infilteration حول الوعاء الدموي المحتقن Congestion (CON) بشكل كبير ووجود مناطق Greenish(GN) داخل الوعاء ، توسع الجيبانيات Dilated Sinusoids(DS)

الصبغة H&E، ١00X

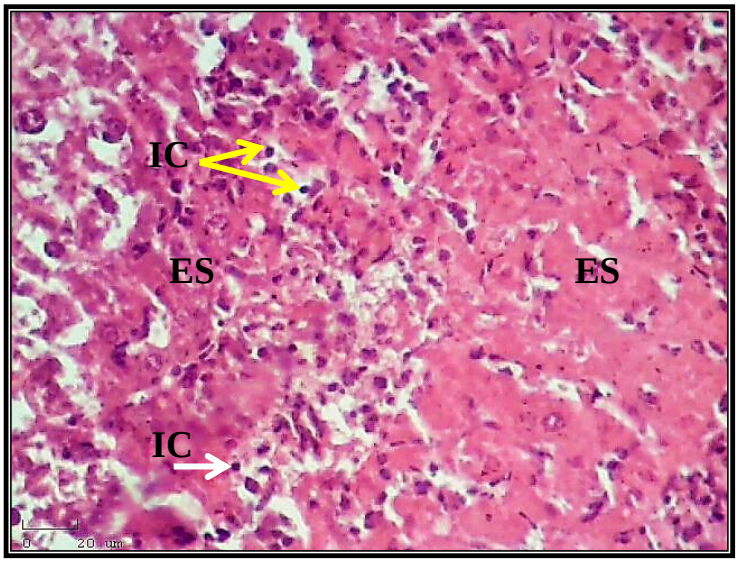
الصورة (١) توضح كبد فأر حامل (سيطرة) تبين الوريد المركزي Central Vein (CV) والخلايا الكبدية Hepatcytes (Hc) المرتبة شعاعيا حوله و الجيبانيات Sinusoids (S). الصبغة H&E،٤00X



Web com,

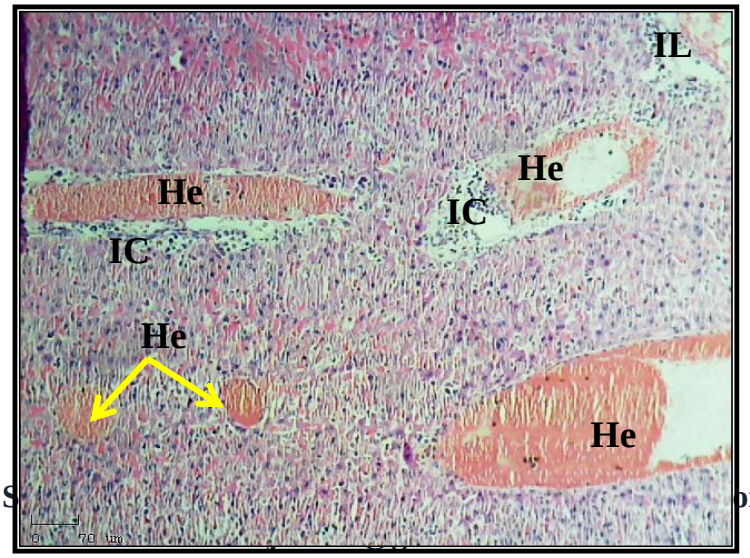
الصورة (٥) توضح كبد فأر حامل معاملة بتركيز ٢.٨٥ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) حول الوعاء الدموي المحتقن Congestion (CON) يربط بينهما ، تسمك Thick (T) في جدار الوعاء الدموي ، تنخرNecrosis(N) ، تنكس

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849



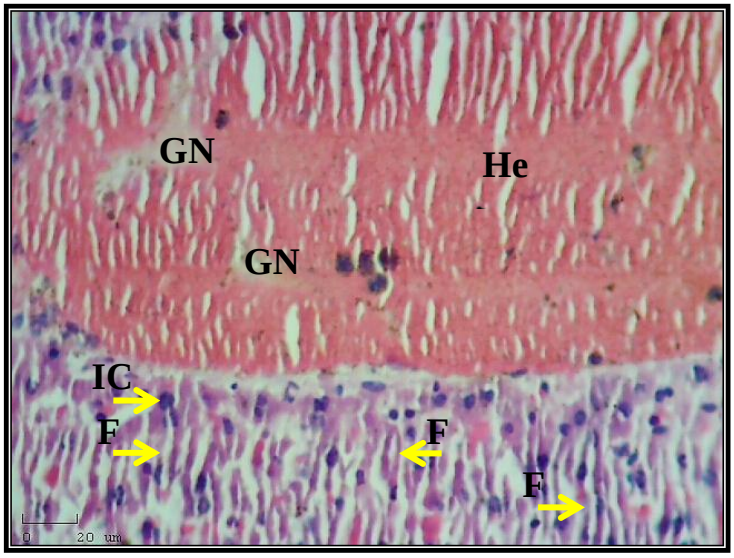
الصورة (٦) توضح كبد فأر حامل معاملة بتركيز ٢.٨٥ ملغم تبين مجموعة من الخلايا الكبدية حامضية الصبغة Eosinophil Cell (ES) ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) مابين وحول الخلايا الحامضية (التشمع الصفراوي البدائي) ، تلف اغلب الخلايا والانوية الصبغة H&E، 400X.

وشخص في كبد الفئران الميتة حصول توسع كبير وتحلل دموي في اغلب الاوعية الدموية المحاطة بالارتشاح اللمفي وحصول التليف Fibrosis في الكبد ، الصور (٧ و٨) .



الصورة (٧) توضح كبد فأرميت معاملة بتركيز ١.٨ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) حول الاوعية الدموية المتحللة Hemolysis (He). الصبغة H&E، 100X

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 3, June 2017
ISSN 1992 – 0849



الصورة (٨) توضح كبد فأرميت معاملة بتركيز ١.٨ ملغم تبين ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cells Infilteration (IC) حول الاوعية الدموية المتحللة Hemolysis (He) ، اللون النفطي Greenish (GN) ، تليف Fibrosis(F) عام في النسيج .الصبغة H&E، ٤00X

الحية تجاه الضرر فهو تفاعل حركي متكامل وليس حالة ساكنة يسعى الى حصر وتعديل فعل العامل المسبب للضرر والى اعادة الانسجة لوضعها الطبيعي [١٨] ويمتاز الالتهاب الحاد بسرعة استجابته للمؤثرات الذي يتطور الى الالتهاب المزمن المميز بأنتشار الخلايا الالتهابية في جميع مناطق الكبد والذي يؤدي زيادته بالتالي الى حصول التشمع والتليف [١٦] ويتفق هذا مع النتائج الحالية اذ لوحظ حصول التشمع الصفراوي البدائي في التركيز العالي بسبب زيادة الجرعة الذي شخص من خلال وصف التشمع الصفراوي البدائي بانه عبارة عن التهاب مزمن يمتاز بأرتشاح الخلايا اللمفية في المنطقة البابية تحصر بينها خلايا حامضية وبتقدمه يحصل تحطم في الخلايا الكبدية والقناة البابية وتتوسع بالأليافات [١٩] ومن الأسباب المؤدية لحصول التشمع الصفراوي هو أنسداد في الطرق الصفراوية كذلك تناول الأدوية [١٨] ، كما تفسر الاضرار الخلوية الأخرى من خلال عمل العقار على مواقع مخصصة للغشاء الخلوي تدعى Receptor Site تتفاعل هذه المواقع مع الكيميائيات مبينة التأثير داخل الخلية بحزم بروتينات الخلية المتضررة وإعادة طيها

لتحطيمها أما اذا لم تستطع هذه البروتينات تحديد الضرر الخلوي تنتج الخلية بروتينات تركيبية وتبدء في تقليص الطاقة الداعمة لحفظ التوازن الكهربائي والحفاظ على وظائف الغشاء الاخرى وعند الفحص المجهري تكون الخلايا الفاشلة شاحبة الصبغة أو مفجاة ويحصل انتفاخ أو تجمع للدهون داخل السايتوبلازم وإذا لم تستطع الخلية الاصلاح والعودة تموت وتتنخر [٢٠] ، وتتمثل آفات الخلية الغير قابلة للرجوع بتكثف الصبغة في الانوية Pyknotic وتمزق المادة النووية Karyorrhexus وتحلل الانوية Karyolysis ثم الموت الخلوي [١٩] .

كما فسرت التغيرات الوعائية على أن من أهم التغيرات نتيجة الالتهاب هو التغيرات الوعائية التي تسمح بتشكل النتحة الالتهابية لمعاكسة فعل الضرر وأول ما يحدث لها هو التضيق (ثواني ألى دقائق قليلة) ثم يحصل التوسع الوعائي في الشرايين والاوردة والاوعية الشعرية وسبب التوسع هو تأثير الهستامين المنطلق من جدار الوعاء ونتيجة لهذا التوسع يحصل أحتقان دموي [١٨] ، وأن تحلل كريات الدم الحمر يتم بواسطة الخلايا البلعمية بسبب النزف الموضعي وهذا التحلل يؤدي الى تكوين الهيم والكلوبين وينشطر الهيم الى هيماتودين وهيموسدرين ، الهيماتودين يكون بشكل حبيبات صفراء ذهبية اللون[٢١] ، والهيموسدرين يكون بلون بني مصفر ذهبي – Golden – yellow Brown [٢٢] فعند أمتزاج هذه الحبيبات بألوانها مع كريات الدم الحمر ينتج عنه حالة Greenish (اللون النفطي) [١٨] .

المصـــــــــادر

[١] R.J. Norman, Meformin in polycystic ovary syndrome : systematic review and metabolism , Analysis. (2003), BMJ, pp: 327-954.

[٢] L. Brunaton.; K.L.Parker.; D.L.Blumenthal and I.L.O. Buxton, Manual of pharmacology and therapeutics. (2008), Mc-Grow–Hill companies , USA, PP: 582 , 945,946.

[٣] G.Rena .; E.R. Peaso and K. Sakamoto, Molecular mechanism of action of metformin . university of Dundee , Journal Diabetes , PMC ,UK , 256, (2013), 9, pp:1898-1906 .

[٤] محمد بن سعد ، الحميد ، مرض السكر ، اسبابه ومضاعفاته وعلاجه ، الطبعة الاولى .

(٢٠٠٧)، المكتبة الالكترونية ، جامعة الملك سعود - السعودية.

[٥] R.S. Hundal and S.E. Inzucchi, Metformin , New understandings , New uses. University school medicine , Journal, Drugs, 63,(2003), 18, PP:1879- 1894.

[٦] F. Anglico .; M. Burattin .; C. Alessandri.; M. Delben and F. Lirussi, Drugs improving insulin resistance for non – alcoholic fatty liver disease and or non – alcoholic state hepatitis . Cochrane ,Journal Systemic Review, 24, (2007), 1, PP: 10-75.

[٧] D. Jakubowicz.; M.I. Luorno.; S. Jakubowicz.; K.A. Robert and J.E. Nestler, Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome . Journal Clinical Endocrine, Metabolism, 87, (2002),pp:524-529.

[٨] R. Obeid, Metformin casing vitamin B12 deficincy : A guilty verdict without sufficient evidence . American Journal diabetes, 37 ,(2014), PP:22-23.

[٩] G.G .Graham.; j. punt.; M. Arora . ; R.O. Day and M.P. Doogye , *et al*, Clinical pharmacokinetics of metformin. Journal clinical pharmacy, kinetic, ISSN, 50 ,(2011), 2, PP:81-98.

[١٠] MC.C. Kilmers, The homocysteine revolution, 2 nd ed. Medical book , (1999), Mc- Graw-Hill . USA .

[١١] S.W. Seto .; T.y . Lam.; Y.W .Lee.; R.W .Sum.; J.H. Xeung, *et al* , Folic acid consumption reduced resist in level and restores blunted acetylcholine – Induced aortic relaxation in obese / diabetic mice. Journal Nutritional, Bio chemistry ,21 ,.(2010), 9, PP:872-880.

[١٢] R.R. Fox and B.Witham, The Jackson laboratory handbook on genetically standardized JAX* Mice, 5th ed , (1997) , Maine :The Jackson laboratory, pp:148

[١٣] G .Katzung , Basic & Clinical Pharmacology . Lange medical , (2001) , Mc- Graw-Hill . USA , PP: 555,556.

[١٤] D.Beth.; G. Robert and Trapp, Basic and clinical biostatistics, 4th ed. Lung Medical book, (2004), Mc Graw-Hill Medical publishing Division, New York, PP: 83-154.

[١٥] M.Gura .; S. Devrim.; Z. Orhon and B. Sen, Severe metformin intoxication with lactic acidosis in an adolescent :Acase report. Journal, Anesth, UBM, medical , 27, (2009), 2, PP:10-15.

[١٦] R.M. MC-Namara .; F. Talavera.; E, Hardin.; J.D. Halamka and S.C. Dronen, Hepatitis. American Academy of Emergency medicine, (2006).

[١٧] J.C. Rosenberg and K. Lysz, Suppression of immune response by steroids : comparative potency of hydeocortisone , Methyiprednisolone and dexamethasone . Transplantation , 29, (1980) , PP:425-428.

[١٨] عماد ابراهيم ،الخطيب ، هشام ابراهيم ، الخطيب ، العبد عبد القادر، العكايلة و عبد المجيد مصطفى ، الشاعر ، علم الامراض(الباثولوجيا) .الاهلية للنشر والتوزيع ، (1989)، عمان – الأردن :ص ٢٤ ،٣٧، ، ١٢٩ ، ١٣٠ ، ١٣٥ .

[١٩] R.C. Curran and J. Crocker, Currans atlas of histopathology , 4th ed. Harvey miller publishers,(2008), oxford university press, USA , PP: 194,204.

[٢٠] H.G Burkitt.; A. Stevens .; J.S . Lowe and B. young, Basic histopathology, 3th ed . Churchill livingstone , Longman asia Ltd , (1996), Hong Kong. U.S.A, pp: 6,7,63 ,178.

[٢١] V. Kumar.; R. Cotran and S. Robbins, Basic pathology, 16th ed. W. B, (1997), Saunders Co, London, pp:10.

[٢٢] J. Barone and B. Hills, Usmle, Pathology, step 1. Kaplan medical, (2004), Inc, pp: 50, 95.