

Şıçanlarda Metformin Kullanımının Karaciğer Dokuları Üzerine Morfolojik Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopisi ile Değerlendirilmesi

Elif Aksöz^{1*}, Bükay Yenice Gürsu², Büşra Aslan¹, Betül Yılmaz Öztürk², İlknur Dağ²

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ESOGÜ-ARUM), Eskişehir, Türkiye

*Corresponding author : aksoz@balikesir.edu.tr
Orcid No: <https://orcid.org/0000-0002-4827-804X>

Received : 09/05/2020
Accepted : 17/06/2020

Özet: Metformin, tip II diyabet için en sık reçete edilen oral anti-diyabetik ajandır. Genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilir, ancak hepatotoksik etkisi de olabileceği bildirilmektedir. Literatürde metforminin karaciğer dokusundaki morfolojik ve ultrayapısal etkilerini değerlendiren çalışmalar, daha çok deneysel olarak oluşturulan bir karaciğer hasarını azaltıp azaltmadığı yönündedir. Ancak bu ilaç polikistik over sendromu gibi, herhangi bir karaciğer rahatsızlığı olmayan hastalarda da kullanılabilmektedir. Bu çalışmadaki amacımız herhangi bir karaciğer hastalığı yok iken metformin kullanımının karaciğerde herhangi bir değişime neden olup olmadığını ışık ve geçirimli elektron mikroskopisi yardımı (TEM) ile değerlendirmektir. Bu amaçla Wistar Albino erkek şıçanlar kontrol ve metformin grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Metformin grubuna üç hafta boyunca metformin (100mg / kg) uygulanmış ve kontrol grubuna eşit hacimde serum fizyolojik verilmiştir. Bir haftalık ilaçsız dönemden sonra şıçanlardan ketamin/ksilazin anestezisi altında karaciğer örnekleri alınmış ve ötenazi uygulanmıştır. Biyopsi sonrası karaciğer örnekleri ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için rutin TEM takibine alınmışlardır. Örneklerden elde edilen yarı ince (700 nm) ve TEM için alınan tam ince (60 nm) kesitler önce ışık mikroskobu ile sonra da Hitachi HT 7800 TEM ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu örneklerinde düzenli hepatosit, çekirdek ve çekirdekçik içeren sağlıklı bulgular izlenirken, metformin uygulanan örneklerde bol miktarda koful oluşumu, çekirdek düzensizlik ve küçülmeleri, bol kan damarı ve hepatosit ayrılmaları gözlenmiştir. Çalışmamızın bulguları metforminin uzun süreli kullanımda hepatositler üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metformin, karaciğer, TEM

Evaluation of morphological effects on liver tissues of metformin use in rats by light and electron microscopy

Abstract: Metformin is the most commonly prescribed oral anti-diabetic agent for type II diabetes. It is generally considered as a safe drug but it is reported that it may also have a hepatotoxic effect. Studies in the literature evaluating the morphological and ultrastructural effects of metformin on liver tissue are more likely include whether it reduces an experimentally created liver injury. However, this drug can also be used in patients without any liver disease, such as polycystic ovarian syndrome. Our aim in this study is to evaluate whether metformin use causes any change in the liver with the help of light and permeable electron microscopy (TEM) while there is no liver disease. For this purpose, Wistar Albino male rats were divided into two groups as control and metformin groups. Metformin (100mg/kg) was applied to the metformin group for three weeks and an equal volume of saline was given to the control group. Liver samples were taken from rats under ketamine/xylozine anesthesia after one week of the drug-free period and euthanasia was performed. After biopsy, liver samples were taken for routine TEM procedure for light and electron microscopic examinations. Semithin (700 nm) and ultrathin (60 nm) sections from samples were evaluated by firstly light microscope and then Hitachi HT 7800 TEM. While healthy findings including regular hepatocyte, nucleus and nucleolus were observed in the control group samples, abundant vacuol formation, nuclear irregularity and shrinkage, abundant blood vessel and hepatocyte separation were observed in metformin-treated samples. The findings of our study show that metformin may have adverse effects on hepatocytes in long-term use.

Keywords: Metformin, liver, TEM

© EJBCS. All rights reserved.

Bu çalışma, Ankara'da gerçekleştirilen 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

1. Giriş

Metformin, tüm dünyada yaygın olarak görülen Tip 2 Diabetes Mellitus (DM) tedavisinde en sık reçete edilen ilaçtır (Wang ve ark., 2017). Diyabetli hasta sayısının 2019 yılında dünya genelinde 463 milyon olduğu ve Tip 2 DM hastalarının diyabetik popülasyonun yaklaşık %90'ını oluşturduğu bildirilmektedir (Saeedi ve ark., 2019). Bu hastaların çoğu metformin kullanımına adaydır. Tüm bunların yanında son yıllarda, kan glukozunu düşürücü etkisine ek olarak, birçok çalışma metformin için antitümör, antiaging, nöroprotektif ve kardiyovasküler koruyucu etkiden bahsetmekte (Wang ve ark., 2017), ayrıca, antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri olabileceği de düşünülmektedir (Martin-Montalvo ve ark., 2013). Bu nedenlerle metforminin başka hastalıklarda da terapötik kullanımları üzerine araştırmalar artış göstermiştir. Kanser, metabolik sendrom, obezite, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve polikistik over sendromu (PCOS) gibi hastalıkların tedavisinde de metforminin etkili olduğu gözlenmektedir (Zhou ve ark., 2018). Bu da metformin kullanımının daha da artabileceği manasına gelmekte ve metforminin kullanım güvenliliği ile ilgili araştırmaların önemini göstermektedir.

Metformin, genellikle güvenli kabul edilmektedir. Bununla birlikte, ishal, gastrointestinal sistem rahatsızlığı, karın ağrısı, bulantı, metalik tat, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi ve döküntü gibi yan etkileri de olabilir. Nadir fakat potansiyel olarak ciddi yan etkileri ise laktik asidoz, hipoglisemi, dehidrasyon ve aşırı duyarlılık reaksiyonları olarak sayılabilir (Livertox, 2020). Yapılan çalışmalarda metforminin plazma, pankreas ve yağ dokudan daha yüksek oranda karaciğerde biriktiği tespit edilmiştir (Madiraju ve ark., 2014). Metformin kullanımına bağlı olarak belirgin karaciğer hasarının nadir olarak görüldüğü söylenmekle beraber, karaciğerde hepatosellüler ve kolestatik hasar ya da ikisinin de tespit edildiği vakalar rapor edilmiştir (Kutoh, 2005; Cone ve ark., 2010, Hashmi, 2011; Zheng, 2016). Hepatotoksisite genellikle 1-8 haftalık kullanımdan sonra, halsizlik ve yorgunluk belirtilerini takiben sarılıkla ortaya çıkmaktadır. Metformin tedavisi durdurulduktan sonra iyileşmenin genellikle hızlı olduğu bildirilmektedir (Livertox, 2020).

Metforminin karaciğerdeki etkileri üzerine şimdiye kadar yapılan çalışmalarda genellikle çeşitli karaciğer rahatsızlıkları durumunda metforminin etkileri incelenmiş; koruyucu ve terapötik etkileri rapor edilmiştir (Iranshahy ve ark., 2019). Bununla beraber, metforminin herhangi bir patolojisi olmayan normal karaciğer üzerine etkileri konusunda çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, karaciğer hastalığı bulunmayan sıçanlarda metformin kullanımının karaciğer dokularında herhangi bir ultrayapısal değişime neden olup olmadığını ışık ve geçirimli elektron mikroskopik yöntemlerle araştırmaktır.

2. Materyal ve Metod

Çalışmada 20 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Deneysel süresince hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsü içerisinde yem ve su alımları serbest bırakılarak, sıcaklığı sabit tutulan (21±3°C) odada barındırılmıştır. Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerel Etik Kurulu 2020/3-10 nolu onayı ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. Deneysel Prosedürü

Deneysel hayvanları kontrol ve metformin grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Metformin (met) (METFULL 1000 mg efervesan tablet, Vitalis İlaç, Türkiye) %0,9 salinde çözülerek hazırlanmıştır. Kontrol gruplarına 3 hafta süreyle gavajla oral salin, metformin grubuna üç hafta süreyle gavajla oral 100 mg/kg/gün olacak şekilde ilaç uygulanmıştır. Üç haftalık uygulama sonunda ilaç kesilmiş, 1 hafta ilaçsız dönem bırakılmış ve metforminin hafıza etkilerini değerlendirmek için Morris maze labirent testi uygulanmıştır. Takiben ketamin/ksilazin anestezisi altında karaciğer örnekleri alınmış ve servikal dislokasyonla ötenazi uygulanmıştır. Alınan karaciğer örnekleri 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanan %2.5'lük glutaraldehit ön fiksasyon solusyonuna alınmıştır. 24 saat sonunda hücreler 3 kez PBS tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra 0.1 M fosfat tampon içeren %1'lik osmiyum tetroksit ile oda sıcaklığında ve rotatorda 2 saat süreyle karanlıkta dokuların sekonder fiksasyonu tamamlanmıştır. Dokular PBS tamponla tekrar 3 kez yıkanarak dehidrasyon işlemi için giderek artan konsantrasyonlarda ve 4°C'de ikişer kez 15'er dk etil alkol serilerinden geçirilmiştir. (%30, %50, %70, %90, %96, %100). Dehidrasyon sonrası propilen oksitte 30 dk boyunca iki kere şeffaflaştırma işlemi yapılmıştır. Propilen oksit- araldit karışımı ile 2 saat rotator inkubasyon uygulaması sonrası örnekler saf araldite alınarak ve bir gece boyunca rotatorda tutularak, ertesi gün resine gömülmüş ve 60°C'de 48 saat polimerize olan resin içerisine gömülü doku blokları elde edilmiştir.

2.2. Işık Mikroskopik Uygulamalar

Işık mikroskopisi çalışmaları için elde edilen doku bloklarından ultramikrotom (Leica Ultracut R) cihazı ile 700 nm kalınlığında kesitler alınmış ve toluidin mavisiyle boyanarak yarı ince kesit preparatları ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirilmiştir.

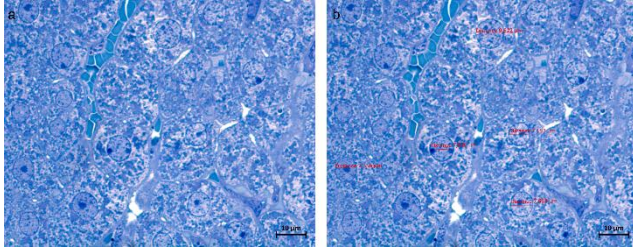
2.3. Geçirimli Elektron Mikroskopik Uygulamalar

TEM uygulamaları için yarı ince kesitler ile bölge belirlemesi sonrası örnekler ultramikrotomda (Leica Ultracut R) 60 nm kalınlığında kesilerek elde edilen doku kesitleri bakır gridlere (200 mesh EMS) alınmış ve uranil asetat-kurşun sitrat ile boyandıktan sonra elektron mikroskopik (Hitachi HT 7800) incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular

3.1. Işık Mikroskopik Veriler

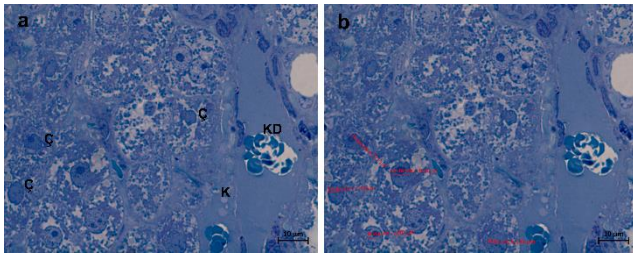
Işık mikroskopi yardımıyla gerçekleştirdiğimiz histolojik çalışmada, kontrol ve deney gruplarından alınan karaciğer örneklerinin rutin fiksasyon işlemleri ve kimyasal takipleri yapılmış ve elde edilen bloklardan ultramikrotomla yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyanmaları sağlanmıştır. Kontrol grubu örneklerinde normal histolojik bulgular tespit edilmiştir. Hepatosit yapıları düzenlidir, çekirdek yuvarlak ve çekirdekçik görünümleri normaldir. Sitoplazma homojen bir dağılım göstermekte ve doku bütünlüğünün genel olarak iyi korunduğu gözlenmektedir (Şekil 1 a).



Şekil 1a. Sıçan karaciğer biyopsi örneklerinden elde edilen sağlıklı histolojik yapı ve hepatosit organizasyonuna sahip kontrol grubu örneği, b. Kontrol grubu örneklerinde değerlendirmeye alınan hepatosit çap ölçümlerine ait demonstratif resim. Toluidin mavisi, 10 µm.

Çalışmamızdan elde edilen ışık mikroskopik görüntülerde hepatosit çekirdek çapları için kantitatif bir değerlendirme yapabilmek için her hayvan için hazırlanan preparatlardan en az beş farklı alan taranmış ve toplamda 50'şer çekirdeğin çapı ölçüldükten sonra ortalama değerleri alınmıştır. Buna göre kontrol grubu verilerinden elde edilen hepatosit çekirdeklerinin ortalama çapları 7.50 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 1 b).

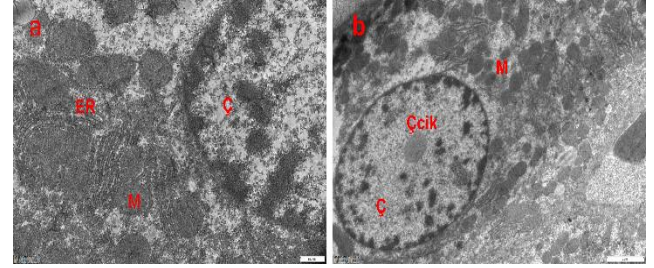
Metformin uygulanan örneklerde ise koful oluşumu fazladır, çekirdek yapıları daha düzensiz olup genellikle küçülme göstermiştir. Bazı hepatositler çift çekirdeklidir. Bol miktarda kan damarı, hepatosit stoplazmasında homojenite kayıpları ve düzensizlikler izlenmiştir. Eritrosit miktarındaki artış dikkat çekicidir ve nekrotik bir görünüm vardır (Şekil 2 a). Deney grubu verilerinden elde edilen hepatosit çekirdeklerinin ortalama çapları ise ortalama 5.3 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 2 b).



Şekil 2a. Metformin uygulanan sıçan karaciğer biyopsi örneklerinden elde edilen ve çekirdek küçülmesi, hepatosit düzensizlikleri ve nekrotik görünüm içeren demonstratif ışık mikroskobu görüntüsü, Ç: Çekirdek, K: koful oluşumu, KD: Kan damarları; b. Değerlendirmeye alınan hepatosit çap ölçümlerine ait demonstratif resim. Toluidin mavisi, 10 µm.

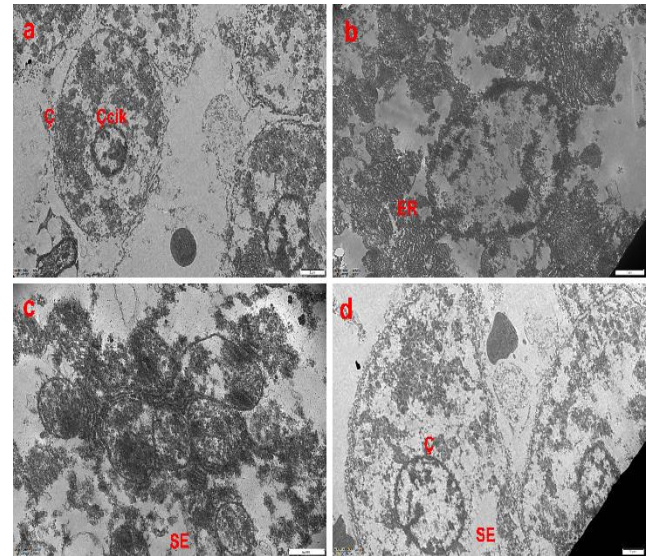
3.2. Geçirimli Elektron Mikroskopik Veriler (TEM)

Karaciğer örneklerinde kontrol ve metformin uygulamasının ultayapısal analizi TEM ile yapılmıştır. Kontrol grubunu içeren TEM mikrografları sağlıklı bir histolojik görünüme sahiptir. Çekirdek yuvarlak ve ökromatik bir görünümde; çekirdekçik merkezi yerleşimlidir. Stoplazmada yuvarlak ya da oval şekilli mitokondriler ile düzenli bir dağılım gösteren granüllü endoplazmik retikulum yapıları izlenmiştir. Sitoplazmada az sayıda yağ damlacıkları mevcuttur (Şekil 3 a-b).



Şekil 3 a-b. Kontrol grubundan elde edilen ve sağlıklı sıçan karaciğer morfolojisi içeren demonstratif TEM görüntüleri; ER: Endoplazmik retikulum, M: Mitokondri, Ç: Çekirdek. Çcik: Çekirdekçik. Skala bar a. 500 nm, b. 2 µm.

Deney grubu örneklerinde ise hepatositlerde küçülme ve hücre hasarları görülmüştür. Çekirdek yapıları da buna paralel olarak küçüktür ve düzensiz görünümündedir. Stoplazma köpüksü görünüm denilen bir morfolojide olup bu durum genellikle glikojen birikimi ya da düzensiz endoplazmik retikulumun genişlemesi ile ortaya çıkmaktadır. Mitokondriler yer yer birbirine çok yakın halde bir arada ve düzensiz morfolojidedir, krista hasarı ve ER kırıkları da gözlenmiştir. Yer yer nekrotik alanlar ve yağ damlacıkları bulunmaktadır. Az sayıda hücre ise normal morfolojisini korumuştur (Şekil 4 a-b-c-d).



Şekil 4 a-b-c-d. Metformin uygulanan gruptan elde edilen, hepatosit ve çekirdek küçülmesi, mitokondri ve ER hasarı içeren ve nekrotik bir görünüm sergileyen demonstratif TEM görüntüleri; ER: Endoplazmik retikulum, M: Mitokondri, Ç: Çekirdek. Çcik: Çekirdekçik, SE: Sitoplazma erimesi. Skala bar a. 500 nm, b. 2 µm.

4. Tartışma

Metformin, son yıllarda dünyada en yaygın reçetelenen ilaçlardan biri haline gelmiştir (Foretz ve ark., 2014). Genellikle güvenli bir ilaç olarak kabul edilir, ancak birçok vaka raporunda hepatotoksik etkisi olabileceği bildirilmektedir (Kutoh, 2005; Cone ve ark., 2010, Hashmi, 2011; Zheng, 2016). Hepatotoksisite, genellikle halsizlik ve yorgunluk belirtilerini takiben sarılıkla ortaya çıkmaktadır. Metformin tedavisi durdurulduktan sonra hızla iyileşme olduğu belirtilmektedir (Livertox, 2020). Çalışmamızda, sıçanlara üç hafta süreyle metformin uygulanmış, bir hafta ilaçsız dönem bırakılmış ve sıçan karaciğer dokularında kontrol grubuna göre herhangi bir ultrayapısal değişim olup olmadığı ışık ve geçirimli elektron mikroskopik yöntemlerle araştırılmıştır. İlaçsız döneme rağmen metforminin mitokondri ve hepatosit yapıları üzerinde belirgin etkilerinin olduğu görülmüştür. Metformin uygulanan sıçanların karaciğer örneklerinde dejeneratif ve hasarlı bulgular izlenmiş; hepatosit ve çekirdek düzensizlikleri, mitokondriyal hasarlar ve bütünlük bozulması gibi temel bulgular tespit edilmiştir.

Metformin, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'i inhibe ederek, ATP sentezini azaltır ve hücrel AMP: ATP oranında bir artışa yol açar (Brunmair ve ark., 2004). Asıl etkisini ise, AMP ile aktifleştirilmiş protein kinazı aktive ederek glukoz sentezini inhibe ettiği karaciğerde gösterir (Rena ve ark., 2017). Bununla beraber metforminin etki mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir.

Metforminin, Tip 2 DM'den başka, kanser, metabolik sendrom, obezite, NAFLD ve PCOS gibi hastalıkların tedavisinde de yararlı etkileri olduğu söylenmektedir (Zhou ve ark., 2018). Hepatositlerde trigliserit (TG) birikimi NAFLD'nin ayırt edici özelliğidir. Metformin, in vivo ve in vitro yüksek glukozlu ya da yüksek yağlı diyetle (HFD) indüklenen hepatik TG birikimini baskılamıştır (Song ve ark., 2013). Obez farelerde hepatik ve plazma TG düzeyleri metformin ile doza bağımlı bir şekilde azaltılmıştır (Li ve ark., 2016; Lin ve ark., 2017). Ayrıca serum alanin transaminaz seviyelerinde iyileşme yaptığı da bildirilmiştir (Doycheva ve ark. 2014). Bununla birlikte, NAFLD'nin tedavisinde metforminin terapötik etkinliği ile ilgili klinik kanıt bulunmamaktadır. Uygun ve arkadaşlarının çalışmasında, 6 aylık metformin tedavisi, alkolsüz steatohepatiti olan hastalarda insülin direnci ve karaciğer enzimlerinde iyileşme sağlamış, fakat bazı hastalarda steatohepatitin şiddetini artırmıştır (Uygun ve ark., 2004). Deney hayvanları kullanılarak yapılan bir çalışmada HFD ile indüklenen NAFLD, metformin tedavisi ile ancak kısmen azaltılmıştır. Metformin, karaciğerde ve hepatosit kültürlerinde pro-enflamatuar sitokinleri artırmış, hatta karaciğer inflamasyonuna yol açmıştır (de Souza Teixeira ve ark., 2018). Bu çalışmaların sonuçları, bizim çalışmamızın sonuçları ile de tutarlıdır. Metformin hepatositlerde beklenen etkisini göstermiş, TG birikimini azaltmıştır, fakat hepatositlerdeki steatohepatit belirtilerini ve inflamasyonu iyileştirememiş, hatta artırmıştır.

Gopal ve arkadaşları, streptozosinle indüklenmiş diyabetli ratlarda 250mg/kg metforminin diyabete bağlı oluşan anormal karaciğer hücrelerinin oluşumunu baskıladığını rapor etmişlerdir (Gopal ve ark., 2014). Al Hashem ve arkadaşları thioacetamide ile indüklenmiş hepatik hasarda 200mg/kg/gün metforminin koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Metforminin karaciğer fibrozunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve karaciğerin yapısını kısmen koruduğunu bildirmişlerdir (Al-Hashem ve ark., 2018). Her iki çalışmada kullanılan metformin dozları bizim çalışmamızdan farklıdır. Ayrıca, bizim çalışmamızda olduğu gibi sağlam karaciğerde metforminin etkileri araştırılmamış, karaciğerde hasar oluşturulup metforminin bu hasara karşı koruyucu etki gösterip göstermeyeceği değerlendirilmiş ve sadece kısmi bir korumadan bahsedilmiştir.

Metformin, temel olarak hepatik glukoz üretimini azaltarak glisemik kontrolü geliştirmektedir. Aynı zamanda periferik insülin duyarlılığını artırır, gastrointestinal glukoz absorpsiyonunu engeller, barsak mikrobiyotasını modüle eder ve incretin aksisini uyandır (Tang ve ark., 2016). Bu nedenlerle obezitede kilo kaybetme amaçlı olarak giderek artan biçimde kullanılmaktadır (Tang ve ark., 2016). Ayrıca, doğurgan çağıdaki kadınların yaklaşık %4-12 sini etkileyen PCOS'da oluşan insülin direncini engellemekte de kullanılmaktadır. (Lashen ve ark., 2010).

Karaciğer hastalıklarının teşhisinde çeşitli biyokimyasal belirteçler ya da görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Bununla beraber, karaciğer patolojisinin tayini ya da teşhisinde karaciğer biyopsi örnekleri altın standart olarak kabul edilmektedir (Ahishali ve ark., 2010). Karaciğerle ilgili morfoloji ve ultrayapı çalışmalarında değerlendirilen kriterler başlıca hepatosit yapıları, çekirdek ve organel hasarları, kollagen birikimleri, mitokondri hasarları ve yağ damlacıklarının bulunuşu olarak sıralanabilir (Soliman ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da temel olarak bu bulgular değerlendirilmiştir. Metformin uygulanan örneklerde ultrayapısal farklılıklar tespit edilmiştir. TEM verileri ile farklı organel ve hücrel yapıların ultrayapısal analizi gerçekleştirilmiş, fakat en belirgin etkilerin mitokondri ve hepatosit yapıları üzerine olduğu görülmüştür. Metformin uygulanan gruplarda dejeneratif ve hasarlı bulgular izlenmiş; hepatosit ve çekirdek düzensizlikleri, mitokondriyal hasarlar ve bütünlük bozulması gibi temel bulgular tespit edilmiştir.

Metformin kullanımıyla ilişkilendirilen vakalarda, akut hepatik hasarın idiyosenkratik reaksiyona işaret ettiği öngörülmektedir (Cone ve ark., 2010). Hastalar için önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan idiyosenkratik ilaç reaksiyonlarının en yaygın hedeflerinden biri de karaciğerdir (Utrecht ve Naisbitt, 2013). İdiyosenkratik reaksiyonlar doz ile ilişkili değildir ve kişiye bağlı değiştiği için önceden tahmin edilemez. Ortaya çıkışında eş zamanlı kullanılan diğer ilaçların, yaşın, cinsiyetin ve çevresel faktörlerin etkisi olabileceği düşünülmekte, aynı zamanda genetik faktörlerin üzerinde durulmaktadır. İlaçları metabolize eden enzimler, antioksidan enzimler, ilaç taşıyıcıları, inflamasyon yanıtı

ve ana histo-uyumluluk kompleksi protein sınıfında genetik farklılıklar bu reaksiyonun oluşumuna katkıda bulunabilir (Chalasanı ve Björnsson, 2010; Ng ve ark., 2012). Verilerimiz, metformin kullanımına bağlı hücre ultrayapısındaki değişimleri göstermekle birlikte olası mekanizmaların ortaya konulabilmesi için kapsamlı yolak deneylerinin yapılması gerekmektedir.

Çok yönlü etkilere sahip bir ilaç olan metformin, faydalı etkileri nedeniyle potansiyel olarak yeni klinik uygulamalar için önerilmektedir. Bununla birlikte, tüm bu yeni tedavi endikasyonlarını destekleyen çok az klinik kanıt bulunmaktadır. Metformin kullanımına bağlı karaciğer hasarı bildiriminin az olmasının nedeni, metforminin genellikle diğer ilaçlarla birlikte kullanılması ve hasarın metforminden mi, yoksa yanında kullanılan başka bir ilaçtan mı kaynaklandığını belirlemenin zor olması da olabilir. Tüm bu nedenlerle metforminin kullanımıyla ilgili hepatotoksitenin araştırılması önem taşımaktadır (Gharbaran, 2014).

Çalışmamızın bulguları, metforminin uzun süreli kullanımda hepatositler üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, metforminin birçok potansiyel yararlılıkları olmasına rağmen, güvenilirlikle ilgili problemleri de olabileceği görülmektedir. Metforminin terapötik uygulamasının genişletilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Teşekkür Bu çalışmanın, Deney hayvanlarına ilaç uygulanması aşaması Balıkesir Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Bakım, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BAUN-DEHAM), Işık ve Elektron mikroskopik incelemeleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) yapılmıştır.

Kaynaklar

- Ahishali E, Demir K, Ahishali B, Akyuz F, Pinarbasi B, Poturoglu S, İbrism D, Gulluoglu M, Ozdil S, Besisik F, Kaymakoglu S. 2010. Electron microscopic findings in non-alcoholic fatty liver disease: Is there a difference between hepatosteatosis and steatohepatitis? *Gastroenterol Hepatol.* 25(3): 619-626
- Al-Hashem F, Al-Humayed S, Amin SN, Kamar SS, Mansy SS, Hassan S, Abdel-Salam OL, Ellatif MA, Alfaifi M, Haidara MA, Al-Ani B. 2019. Metformin inhibits mTOR-HIF-1 α axis and profibrogenic and inflammatory biomarkers in thioacetamide-induced hepatic tissue alterations. *J Cell Physiol.* 234(6): 9328-9337
- Brunmair B, et al. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhäusl W, Fürsinn C. 2004. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes.* 53(4):1052-9
- Chalasanı N, Björnsson E. 2010. Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gastroenterology.* 138(7):2246-2259. doi:10.1053/j.gastro.2010.04.001

- Cone CJ, Bachyrycz AM, Murata GH. 2010. Hepatotoxicity associated with metformin therapy in treatment of type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Pharmacother.* 44(10):1655-9. doi: 10.1345/aph.1P099
- de Souza Teixeira AA, Souza CO, Biondo LA, Sanches Silveira L, Lima EA, Batatinha HA, Araujo AP, Alves MJ, Hirabara SM, Curi R, Neto JCR. 2018. Short-term treatment with metformin reduces hepatic lipid accumulation but induces liver inflammation in obese mice. *Inflammopharmacology.* 26(4):1103-1115. doi:10.1007/s10787-018-0443-7
- Doycheva I, Loomba R. 2014. Effect of metformin on ballooning degeneration in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): When to use metformin in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) *Adv Ther.* 31:30-43. doi: 10.1007/s12325-013-0084-6.
- Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcărea VL, Hudita D. 2015. Metformin-clinical pharmacology in PCOs. *J Med Life.* 8(2):187-92
- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20(6):953-66. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018
- Gharbaran R. 2014. Metformin Induces Ultrastructural Alterations in Hepatocytes of Spontaneously Hypertensive Rats. *Int J Morphol.* 32(3):839-843
- Gopal V, Mandal V, Tangjang S, Mandal SC. 2014. Serum Biochemical, Histopathology and SEM Analyses of the Effects of the Indian Traditional Herb Wattakaka Volubilis Leaf Extract on Wistar Male Rats. *J Pharmacopuncture.* 17(1):13-19. doi:10.3831/KPI.2014.17.002
- Hashmi T. 2011. Probable hepatotoxicity associated with the use of metformin in type 2 diabetes. *BMJ Case Rep.* 13:2011. doi:10.1136/bcr.04.2011.4092
- Iranshahy M, Rezaee R, Karimi G. 2019. Hepatoprotective activity of metformin: A new mission for an old drug? *Eur J Pharmacol.* 850:1-7. doi:10.1016/j.ejphar.2019.02.004
- Kutoh E. 2005. Possible metformin-induced hepatotoxicity. *Am J Geriatr Pharmacother.* 3(4):270-3
- Lashen H. 2010. Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 1(3): 117-128
- Li R, Chen LZ, Zhao W, Zhao SP, Huang XS. 2016. Metformin ameliorates obesity-associated hypertriglyceridemia in mice partly through the apolipoprotein A5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:1173-1178. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.087
- Lin MJ, Dai W, Scott MJ, Li R, Zhang YQ, Yang Y, Chen LZ, Huang XS. 2017. Metformin improves nonalcoholic fatty liver disease in obese mice via down-regulation of apolipoprotein A5 as part of the AMPK/LXR α signaling pathway. *Oncotarget.* 8:108802-108809
- LiverTox. 2020. Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Metformin. [Updated 2020 Jan 21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548726/> Accessed 30 Mar 2020
- Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel

- VT, Kibbey RG, Shulman GI. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 510(7506):542-6. doi: 10.1038/nature13270
- Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 4:2192. doi: 10.1038/ncomms3192
- Meng XM, Ma XX, Tian YL, Jiang Q, Wang LL, Shi R, Ding L, Pang SG. 2017. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 21(9):2232-2237
- Ng W, Lobach AR, Zhu X, Chen X, Liu F, Metushi IG, Sharma A, Li J, Cai P, Ip J, Novalen M, Popovic M, Zhang X, Tanino T, Nakagawa T, Li Y, Uetrecht J. 2012. Animal models of idiosyncratic drug reactions. *Adv Pharmacol*. 63:81-135. doi:10.1016/B978-0-12-398339-8.00003-3
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. 2019. Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 157:107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
- Soliman HM, Wagih HM, Algaidi SA, Hafiz AH. 2013. Histological evaluation of the role of atypical antipsychotic drugs in inducing non-alcoholic fatty liver disease in adult male albino rats (light and electron microscopic study). *Folia biol*. 59(5): 173
- Song YM, Lee YH, Kim JW, Ham DS, Kang ES, Cha BS, Lee HC, Lee BW. 2015. *Autophagy*. 11(1):46-59
- Tang X, Li J, Xiang W, Cui Y, Xie B, Wang X, Xu Z, Gan, L. 2016. Metformin increases hepatic leptin receptor and decreases steatosis in mice. *J Endocrinol*. 230(2):227-37. doi: 10.1530/JOE-16-0142.
- Uetrecht J, Naisbitt DJ. 2013. Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts. *Pharmacol Rev*. 65(2):779-808. doi:10.1124/pr.113.007450
- Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Gulsen K, Dagalp K. 2004. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 19(5): 537-544
- Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tian L, Huang Q. 2017. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther*. 22(11):2421-2429. doi: 10.2147/DDDT.S141675
- Zheng L. 2016. Metformin as a Rare Cause of Drug-Induced Liver Injury, a Case Report and Literature Review. *Am J Ther*. 23(1):315-7. doi:10.1097/MJT.000000000000007
- Zhou J, Massey S, Story D, Li L. 2018. Metformin: An Old Drug with New Applications. *Int J Mol Sci*. 19(10):2863. doi: 10.3390/ijms19102863