

Jakub Gumprecht¹, Michał Długaszek¹, Agnieszka Niemczyk¹, Magdalena Pyryt¹,
Ewa Olszańska¹, Monika Gubała¹, Kinga Tyrała¹, Hanna Kwiendacz², Katarzyna Nabrdalik²

¹Studenckie Koło Naukowe Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii,

Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

²Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

Czy należy obawiać się niedoborów witaminy B₁₂ w trakcie leczenia metforminą?

Is it necessary to be afraid of vitamin B₁₂ deficiency during metformin treatment?

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Gumprecht J, Długaszek M, Niemczyk A et al. Is it necessary to be afraid of vitamin B₁₂ deficiency during metformin treatment? Clin Diabetol 2016; 5, 6: 195–198. DOI: 10.5603/DK.2016.0033.

Należy cytować wersję pierwotną.

STRESZCZENIE

Metformina, pochodna biguanidu, jest najczęściej stosowanym lekiem przeciwhyperglykemicznym na świecie. W trakcie farmakoterapii mogą wystąpić różne działania niepożądane. Jednym z nich jest niedobór witaminy B₁₂, który może być bezobjawowy (biochemiczny) lub prowadzić do zaburzeń neurologicznych i/lub hematologicznych. Diagnostykę przyczynową wymienionych zaburzeń utrudnia fakt, że objawy ze strony układu nerwowego mogą przypominać powikłania neurologiczne rozwijające się w przebiegu cukrzycy. Szacuje się, że od 5,8% do 33% chorych leczonych metforminą charakteryzuje się obniżonym, poniżej wartości referencyjnych, stężeniem witaminy B₁₂ w surowicy krwi. Związek występowania niedoboru witaminy B₁₂ w przebiegu leczenia metforminą znany jest już od kilkudziesięciu lat i w tym czasie przeprowadzono wiele badań, które niestety często miały charakter obserwacyjny, były retrospektywne i obejmowały niejednorodnie grupy pacjentów. Dopiero niedawno przeprowadzono metaanalizę badań obejmujących chorych na cukrzycę, w której wykazano obecność związku leczenia metforminą z występowaniem niedoboru witaminy B₁₂. Niezbędne są jednak dalsze, dobrze zaprojektowane, duże, randomizowane

badania, obejmujące jednorodnie grupy pacjentów oraz stosujące jednorodne kryteria rozpoznania niedoboru witaminy B₁₂ w celu oceny, czy niezbędne jest rutynowe oznaczanie stężenia witaminy B₁₂ u osób leczonych metforminą.

Słowa kluczowe: metformina, witamina B₁₂, cukrzyca typu 2

ABSTRACT

Metformin, a biguanide derivative, is the most frequently used antihyperglycaemic agent in the world. Various adverse effects can occur during the drug therapy. One of them is vitamin B₁₂ deficiency, which may be either asymptomatic (biochemical) or may lead to neurological and/or haematological disorders. Causal diagnosis of these disorders is hampered due to the fact that nervous system symptoms are similar to neurological complications developing over the course of diabetes mellitus. It is estimated that 5.8 to 33% of metformin treated patients have a low (below the reference level) serum vitamin B₁₂ concentration. The interrelation between vitamin B₁₂ deficiency and metformin usage has been known for decades and over that time many studies have been carried out to assess the issue. Unfortunately, these studies were mainly observational, retrospective and performed on nonhomogeneous groups of patients. Recently a meta-analysis of studies concerning only diabetic patients was performed and it demonstrated the existence of a relationship between metformin treatment

Adres do korespondencji:

dr n. med. Katarzyna Nabrdalik

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii

Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze,

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

e-mail: knabrdalik@yahoo.com

Nadesłano: 21.11.2016

Przyjęto do druku: 03.02.2017

and vitamin B₁₂ deficiency. Nevertheless, further well-designed, large-scale, randomized studies performed on a homogenous group of patients and employing homogenous criteria for diagnosing vitamin B₁₂ deficiency are necessary in order to decide whether serum vitamin B₁₂ concentration should be routinely checked among metformin treated patients.

Key words: metformin, vitamin B₁₂, type 2 diabetes mellitus

Wstęp

Metforminę, pochodną biguanidu, stosuje się w leczeniu cukrzycy typu 2 od ponad 50 lat, a jej skuteczność, bezpieczeństwo stosowania oraz korzystny wpływ między innymi na zaburzenia metaboliczne, układ sercowo-naczyniowy, sprzyjanie redukcji masy ciała czy postulowane działanie przeciwnowotworowe sprawiły, że obecnie w świetle aktualnych międzynarodowych i polskich wytycznych dotyczących postępowania u chorych na cukrzycę jest lekiem pierwszego wyboru, a tym samym należy do najczęściej stosowanych leków przeciwhiperlipidemicznych na świecie [1–3]. Działania niepożądane związane z metforminą obejmują występowanie zaburzeń żołądkowo-jelitowych oraz możliwość wystąpienia kwasicy mleczanowej, choć jej ryzyko jest niskie i wynosi około 3,3–4,3/100 000 pacjentolat. Ponadto możliwym skutkiem ubocznym związanym z przewlekłym stosowaniem tego leku jest potencjalne ryzyko wystąpienia niedoboru witaminy B₁₂ [4, 5]. Niedobór witaminy B₁₂ może być klinicznie istotny, gdy stężenie tej witaminy w surowicy krwi jest mniejsze niż 150 pmol/l. Za dolną granicę wartości referencyjnych stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi najczęściej przyjmuje się 150–220 pmol/l. W badaniu *UK National Diet and Nutrition Survey* z 2004 roku u 20% mężczyzn i 27% kobiet, mieszkańców Wielkiej Brytanii, w wieku 19–64 lat, stężenie witaminy B₁₂ wynosiło mniej niż 200 pmol/l [3]. Podobnie w badaniu *European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer* (EPIC) przeprowadzonym w 23 ośrodkach w 10 krajach Europy Zachodniej stężenie witaminy B₁₂ wynosiło mniej niż 175 pmol/l u 5% dorosłych w wieku poniżej 60. roku życia [6, 7]. Rozpuszczalna w wodzie witamina B₁₂, tzw. kobalamina, odgrywa decydującą rolę w procesie syntezy DNA, we właściwym funkcjonowaniu układu krwiotwórczego i nerwowego [5]. Klasyczna postać niedoboru witaminy B₁₂ objawia się występowaniem takich zaburzeń jak niedokrwistość makrocytarna, obwodowa neuropatia, depresja, upośledzenie funkcji poznawczych, jednak nie u wszystkich osób, u których występuje obniżenie stężenia witaminy B₁₂ w surowicy

krwi, pojawiają się objawy kliniczne jej niedoboru [8]. Niestety, w odniesieniu do metforminy, pomimo że związek niedoboru witaminy B₁₂ z tym lekiem znany jest już od ponad 40 lat, rozpowszechnienie i kliniczne znaczenie tego zjawiska nie jest do końca poznane. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych wśród chorych na cukrzycę typu 2 szacuje się, że stwierdzany w badaniach laboratoryjnych niedobór witaminy B₁₂ dotyczy od 5,8% do 33% pacjentów [9, 10]. Tak szeroki zakres wyniku najpewniej z tego, że w przeprowadzonych badaniach kryteria definiujące niedobór witaminy B₁₂ nie były jednorodne. W niniejszym opracowaniu podjęto próbę usystematyzowania dostępnych informacji na temat wpływu stosowania metforminy na niedobór witaminy B₁₂ i skali tego zjawiska.

Rola witaminy B₁₂ w organizmie człowieka

Witamina B₁₂ wywiera swoje działanie biologiczne poprzez dwa główne szlaki enzymatyczne, metylacji homocysteiny do metioniny i konwersji metylomalonylo-koenzymu A (CoA) do sukcylo-koenzymu A. W pierwszym z procesów witamina B₁₂ jest kofaktorem ułatwiającym metylację homocysteiny do metioniny, która następnie jest aktywowana do S-adenozylometioniny będącej dawcą grup metylowych ich akceptorom, takim jak mielina, neurotransmitery i fosfolipidy błonowe. Dlatego istotny metabolicznie niedobór witaminy B₁₂ skutkuje zaburzeniem procesu metylacji i zwiększeniem stężenia homocysteiny wewnątrz komórek i w surowicy krwi, a homocysteina z kolei wywiera niekorzystny wpływ na neurony i endotelium naczyniowe. W przypadku drugiego z wymienionych szlaków metabolicznych niedobór witaminy B₁₂ prowadzi do zwiększenia w surowicy krwi kwasu metylomalonowego (MMA) i powoduje nieprawidłową syntezę kwasów tłuszczowych błon neuronów [11]. Ponadto witamina B₁₂ jest niezbędna do syntezy monoamin lub neurotransmiterów, takich jak serotonina i dopamina, których synteza nie zachodzi prawidłowo w przypadku niedoborów witaminy B₁₂ [12]. Powyższe informacje tłumaczą, dlaczego niedobór witaminy B₁₂ skutkuje występowaniem objawów zaburzenia układu nerwowego, które mogą manifestować się występowaniem autonomicznej i obwodowej neuropatii, demencji i zaburzeń psychicznych [11]. Ponadto hiperhomocysteinemia wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zdarzeń sercowo-naczyniowych z powodu jej toksycznego wpływu na komórki i naczynia krwionośne [13, 14].

Potencjalne mechanizmy powstawania niedoboru witaminy B₁₂

Główne źródło witaminy B₁₂ dla człowieka stanowi białko zwierzęce, z którego po spożyciu jest ona

uwalniania przy udziale pepsyny i kwasu żołądkowego. Następnie witamina B₁₂ łączy się z białkiem R wydzielanym przez ślinianki i w dwunastnicy, w obecności środowiska zasadowego i proteaz trzustkowych, białko R jest hydrolizowane, a witamina B₁₂ jest uwalniania, łącząc się następnie z czynnikiem wewnętrznym (IF, *intrinsic factor*) wydzielanym przez komórki okładzinowe żołądka. Kompleks witaminy B₁₂-czynnika wewnętrznego jest oporny na degradację proteolityczną. Kompleks ten przyłącza się do specyficznego receptora w błonie śluzowej jelita końcowego, gdzie witamina B₁₂ zostaje wchłaniana, a w procesie tym pośredniczą jony wapnia. Następnie witamina B₁₂ jest uwalniana w następstwie degradacji IF. Wolna witamina B₁₂ przyłącza się do kolejnego białka transportowego, tzw. transkobalaminy II (TC-II), i następnie jest uwalniana do krwi. Kompleks złożony z witaminy B₁₂ i TC-II, nazywany też holo-TC-II, jest aktywnie wychwytywany przez wątrobę, szpik kostny i inne komórki organizmu. Wątroba stanowi główne źródło magazynowania witaminy B₁₂ wynoszące do 90% całkowitej zawartości witaminy B₁₂ w organizmie [5, 15]. Każdy czynnik, który zaburza jej wchłanianie żołądkowo-jelitowe, może przyczynić się do niedoboru witaminy B₁₂. Dochodzi do niego zatem między innymi na skutek zbyt małej podaży witaminy B₁₂ w diecie, co obserwuje się często u wegetarian czy alkoholików, lub zaburzenia wchłaniania żołądkowo-jelitowego tej witaminy mogącego wystąpić w przebiegu przewlekłego stanu zapalnego błony śluzowej żołądka, choroby trzewnej, przewlekłego zapalenia trzustki czy stosowania leków, takich jak metformina lub inhibitory pompy protonowej. Nie u wszystkich osób, u których ujawniony zostanie niedobór witaminy B₁₂ w surowicy krwi, będą występowały objawy niedoboru tej witaminy. Ujawniają się one zwykle dopiero po wyczerpaniu się jej zapasów zmagazynowanych w wątrobie, co może wynosić od roku do 5 lat od momentu wystąpienia obniżonego stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi [16].

Uważa się, że metformina może przyczynić się do zwiększenia ryzyka wystąpienia niedoboru witaminy B₁₂ na drodze kilku mechanizmów. Jednym z nich jest stymulacja przerostu bakteryjnego jelita cienkiego, powodującego zaburzenia trawienia i wchłaniania, które w konsekwencji prowadzą do niedoboru witaminy B₁₂. Postuluje się, że dysbakterioza przewodu pokarmowego wywołana jest zmianą perystaltyki przewodu pokarmowego bądź podwyższonym stężeniem glukozy w jelicie cienkim. Metformina może prowadzić także do kompetycyjnego hamowania lub inaktywacji absorpcji witaminy B₁₂ poprzez zmniejszenie ilości IF [17]. Ponadto wykazano, że metformina może hamować, zależnie od wapnia, wchłanianie kompleksu witaminy B₁₂ z czynnikiem wewnętrznym w dystalnej

części jelita krętego. Kationy wapniowe są czynnikiem obligatoryjnym w procesie przyłączania się kompleksu witaminy B₁₂-czynnika wewnętrznego do receptorów powierzchniowych enterocytów dystalnej części jelita krętego [18]. Dodatkowo ryzyko wystąpienia niedoboru witaminy B₁₂ wzrasta wraz z wiekiem, dobową dawką metforminy i czasem jej stosowania [19, 20].

Niedobór witaminy B₁₂ u pacjentów leczonych metforminą — skala problemu

Przez wiele lat badania nad związkiem metforminy z występowaniem niedoborów witaminy B₁₂ u chorych na cukrzycę typu 2 miały głównie charakter badań obserwacyjnych, kliniczno-kontrolnych, retrospektywnych, a badane grupy najczęściej były mało liczne i tylko niewiele z nich było prospektywnymi, kontrolowanymi placebo, badaniami randomizowanymi. Większość z badań randomizowanych charakteryzowała się niewielką grupą badaną i trwała zwykle mniej niż 6 miesięcy [20–22]. Niafar i wsp., autorzy jednej z niedawno przeprowadzonych metaanaliz powyższych badań, podkreślają, że istotnym czynnikiem ograniczającym możliwość porównania był brak jednorodności dawki stosowanej metforminy. W badaniach używano ponadto różnych punktów odcięcia definiujących niedobór witaminy B₁₂. W większości uznawano za niedobór witaminy B₁₂ wartość wynoszącą mniej niż 150 pmol/l, ale też kryteria te wahały się w zakresie stężenia witaminy B₁₂ mieszczącego się w przedziale 74–221 pmol/l. Z kolei niejednorodne kryteria rozpoznania niedoboru witaminy B₁₂ nieodzownie prowadzą do zaniżenia lub zawyżenia rzeczywistej częstości występowania tych niedoborów. Dodatkowo w większości badań nie uwzględniano informacji na temat wyjściowego stężenia witaminy B₁₂ przed rozpoczęciem leczenia metforminą [23]. Ponadto w badaniach tych grupy osób badanych nie były jednorodne, ponieważ niejednokrotnie uwzględniano nie tylko chorych na cukrzycę typu 2, ale też inne populacje chorych stosujących metforminę.

W 2016 roku Aroda i wsp. opublikowali wyniki wtórnej analizy badania *Diabetes Prevention Program (DPP)/Diabetes Prevention Program Outcomes Study (DPPOS)*, w którym oceniano ryzyko wystąpienia niedoborów witaminy B₁₂ u osób zagrożonych wystąpieniem cukrzycy typu 2 stosujących metforminę. Badanie to było największym i najdłuższym (średni okres obserwacji wynosił 13 lat) jak dotąd badaniem kohortowym oceniającym stężenie witaminy B₁₂ w trakcie leczenia metforminą. Autorzy wykazali, że stosowanie metforminy było związane z występowaniem ujawnionego w badaniach laboratoryjnych niedoboru witaminy B₁₂. Dodatkowo obserwowano zwiększone stężenie homocysteiny w surowicy krwi, co wskazuje

na tkankowy niedobór witaminy B₁₂. Ponadto, średnio po 5 latach od randomizacji, zauważono także częstsze występowanie niedokrwistości wśród osób leczonych metforminą. Co interesujące, niedobór witaminy B₁₂ obserwowano także przy braku niedokrwistości. Neuropatia obwodowa występowała częściej wśród osób z niedoborem witaminy B₁₂, ale należy zauważyć, że dotyczyło to małej grupy osób (13 osób z 56 leczonych metforminą), u których wystąpił niedobór witaminy B₁₂ po 9 latach obserwacji ponad 1000 osób otrzymujących metforminę [24].

De Fronzo i wsp. ponad 20 lat temu przeprowadzili jedno z pierwszych randomizowanych badań z udziałem chorych na cukrzycę typu 2, mające na celu ocenę występowania niedoboru witaminy B₁₂. Autorzy ci wykazali 22- i 29-procentową redukcję stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi u osób leczonych metforminą w porównaniu z odpowiednio grupami otrzymującymi placebo i gliburyd [25].

Największym do dnia dzisiejszego, prospektywnym badaniem randomizowanym przeprowadzonym wśród chorych na cukrzycę typu 2 oceniającym związek leczenia metforminą z wystąpieniem niedoborów witaminy B₁₂ było badanie przeprowadzone przez de Jager i wsp., którego wyniki wykazały, że w okresie ponad 4 lat obserwacji leczenie metforminą związane było ze zmniejszeniem stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi o 19%, zwiększeniem stężenia homocysteiny o 5% i 11-krotnym zwiększeniem ryzyka wystąpienia niskich stężeń witaminy B₁₂ w porównaniu z placebo [20]. Liu i wsp. w 2014 roku, a w 2015 roku Niafar i wsp. przeprowadzili metaanalizy badań, w których wykazali jednoznacznie, że istnieje związek występowania niedoboru witaminy B₁₂ ze stosowaniem metforminy, ale badania te przeprowadzone zostały na niejednorodnej grupie pacjentów (m.in. chorzy na cukrzycę, zespół policystycznych jajników) [23, 26].

Dopiero w 2016 roku Chapman i wsp. przeprowadzili przegląd systematyczny i metaanalizę wyników badań (obserwacyjnych i interwencyjnych) dotyczących związku metforminy z niedoborem witaminy B₁₂ przeprowadzonych w jednorodnej grupie osób chorych na cukrzycę typu 2 [27]. Wyniki analizowanych przez Chapman i wsp. badań obserwacyjnych wskazały na występowanie obniżonego stężenia witaminy B₁₂ i zwiększonego ryzyka wystąpienia granicznego stężenia witaminy B₁₂ w przypadku osób leczonych metforminą. Większość badań interwencyjnych charakteryzowała się krótkim okresem trwania badania (do 4 miesięcy), ale wyniki wskazywały na istotną redukcję stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi w trakcie leczenia metforminą. Metaanaliza 4 badań interwencyjnych wskazała na istotną redukcję stężenia witaminy B₁₂ o 57 pmol/l

[95-procentowy przedział ufności (CI, *confidence interval*) –35 do –79]. Taka redukcja stężenia witaminy B₁₂ mogłaby być istotna klinicznie, powodując jawny niedobór witaminy B₁₂ (< 150 pmol/l) lub graniczną wartość stężenia tej witaminy (150–220 pmol/l) w przypadku pacjentów, którzy charakteryzowali się wyjściowym stężeniem witaminy B₁₂ w zakresie 207–277 pmol/l. Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Chapman i wsp. pozostają w zgodzie z wynikami metaanaliz przeprowadzonych przez Niafar i wsp. i Liu i wsp., którzy analizowali badania przeprowadzone nie tylko wśród chorych na cukrzycę. Uzyskanie podobnych wyników badań w różnych grupach chorych świadczyć może o tym, że wpływ metforminy na niedobór witaminy B₁₂ nie różni się w zależności od populacji badanych pacjentów [27].

Podsumowanie

Aktualne zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę nie wskazują na konieczność wykonywania badań przesiewowych w kierunku niedoboru witaminy B₁₂ u osób leczonych pochodną biguanidu. W przypadku wystąpienia objawów klinicznych, takich jak między innymi niedokrwistość makrocytarna, neuropatia obwodowa czy zaburzenia psychiczne u osób stosujących przewlekłe metforminę, warto rozważyć wówczas oznaczenie stężenia witaminy B₁₂ w surowicy krwi [23].

PIŚMIENNICTWO

- Standards of Medical Care in Diabetes-2016: Summary of Revisions. *Diabetes Care* 2016; 39 (supl. 1): S4–S5.
- Polskie Towarzystwo Diabetologiczne. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2016 Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Clinical Diabetology* 2016; 5: (supl. A).
- Ruston D., Hoare J., Henderson L. i wsp. The National Diet & Nutrition Survey: adults aged 19 to 64 years: Nutritional status (anthropometry and blood analytes), blood pressure and physical activity. TSO, London 2004.
- Adams J.F., Clark J.S., Ireland J.T., Kesson C.M., Watson W.S. Malabsorption of vitamin B12 and intrinsic factor secretion during biguanide therapy. *Diabetologia* 1983; 24: 16–18.
- Andres E., Loukili N.H., Noel E. i wsp. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Canadian Medical Association Journal* 2004; 171: 251–259.
- Eussen S.J., Nilsen R.M., Midttun O. i wsp. North-south gradients in plasma concentrations of B-vitamins and other components of one-carbon metabolism in Western Europe: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Br. J. Nutr.* 2013; 110: 363–374.
- Wyckoff K.F., Ganji V. Proportion of individuals with low serum vitamin B-12 concentrations without macrocytosis is higher in the post folic acid fortification period than in the pre folic acid fortification period. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 86: 1187–1192.
- Carmel R. Mandatory fortification of the food supply with cobalamin: an idea whose time has not yet come. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2011; 34: 67–73.

9. Pflipsen M.C., Oh R.C., Saguil A., Seehusen D.A., Seaquist D., Topolski R. The prevalence of vitamin B(12) deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Journal of the American Board of Family Medicine* 2009; 22: 528–534.
10. Reinstatler L., Qi Y.P., Williamson R.S., Garn J.V., Oakley G.P., Jr. Association of biochemical B12 deficiency with metformin therapy and vitamin B12 supplements: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2006. *Diabetes Care* 2012; 35: 327–333.
11. Malouf R., Areosa Sastre A. Vitamin B12 for cognition. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003; 3: Cd004326.
12. Bottiglieri T., Laundry M., Crellin R., Toone B.K., Carney M.W., Reynolds E.H. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 2000; 69: 228–232.
13. Sadeghian S., Fallahi F., Salarifar M. i wsp. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovascular Disorders* 2006; 6: 38.
14. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. *Food and Nutrition Bulletin* 2008; 29 (supl. 2): S116–S125.
15. Oh R., Brown D.L. Vitamin B12 deficiency. *American Family Physician* 2003; 67: 979–986.
16. O’Leary F., Samman S. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients* 2010; 2: 299–316.
17. Andres E., Noel E., Goichot B. Metformin-associated vitamin B12 deficiency. *Arch. Int. Med.* 2002; 162: 2251–2252.
18. Bauman W.A., Shaw S., Jayatileke E., Spungen A.M., Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care* 2000; 23: 1227–1231.
19. Kos E., Liszek M.J., Emanuele M.A., Durazo-Arvizu R., Camacho P. Effect of metformin therapy on vitamin D and vitamin B12 levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract.* 2012; 18: 179–184.
20. de Jager J., Kooy A., Leher P. i wsp. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ* 2010; 340: c2181.
21. Leung S., Mattman A., Snyder F., Kassam R., Meneilly G., Nexo E. Metformin induces reductions in plasma cobalamin and haptocorrin bound cobalamin levels in elderly diabetic patients. *Clinical Biochemistry* 2010; 43: 759–760.
22. Wulffele M.G., Kooy A., Leher P. i wsp. Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J. Int. Med.* 2003; 254: 455–463.
23. Niafar M., Hai F., Porhomayon J., Nader N.D. The role of metformin on vitamin B12 deficiency: a meta-analysis review. *Internal and Emergency Medicine* 2015; 10: 93–102.
24. Aroda V.R., Edelstein S.L., Goldberg R.B. i wsp. Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2016; 101: 1754–1761.
25. DeFronzo R.A., Goodman A.M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *NEJM* 1995; 333: 541–549.
26. Liu Q., Li S., Quan H., Li J. Vitamin B12 status in metformin treated patients: systematic review. *PLoS One* 2014; 9: e100379.
27. Chapman L.E., Darling A.L., Brown J.E. Association between metformin and vitamin B12 deficiency in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes and Metabolism* 2016; 42: 316–327.