

مقاله اصلی

نقش مصرف فولات بر سطح سرمی هموسیستئین و ویتامین B12 در بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۵

خلاصه

مقدمه

بیماری دیابت دارای عوارض زیادی است. متفورمین در بیماران دیابتی به طور گسترده مصرف می شود که عوارضی همچون کاهش ویتامین B12 و افزایش هموسیستئین دارد. افزایش هموسیستئین می تواند ریسک بیماری های قلبی عروقی را بالا ببرد. درمان با اسیدفولیک از این افزایش جلوگیری کرده و باعث افزایش ویتامین B12 نیز می شود.

روش کار

این مطالعه کارآزمای بالینی در بیمارستان امام رضا مشهد در سال ۱۳۹۰ الی ۱۳۹۱ انجام شد. تعداد ۴۵ بیمار مبتلا به دیابت تیپ ۲ تحت درمان با متفورمین به دو گروه اسیدفولیک و پلاسبو تقسیم شدند. ۲۴ بیمار روزانه ۱ میلی گرم اسیدفولیک برای مدت ۳ ماه دریافت کردند. ۲۱ بیمار دیگر پلاسبو دریافت کردند. بیماران با $GFR > 60$ وارد مطالعه شدند. جهت هر بیمار آزمایشات پایه هموسیستئین، B12، CBC و بیوشیمی چک شد و بعد از درمان سطوح B12، هموسیستئین و CBC مجدداً چک شده و تأثیرات دارو مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات با نرم افزار SPSS و آزمون های تی و کای اسکوئر بررسی و تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

در گروه اسیدفولیک هموسیستئین از $12/8$ به $12/4$ بعد درمان تقلیل یافت ($p=0/06$) و ویتامین B12 از $244/87$ به $285/54$ افزایش داشت ($p=0/025$). درمان با اسیدفولیک تأثیر معنی داری بر هموگلوبین و (پلاکت) (بیماران نداشت. اما WBC در این گروه دچار کاهش از $7/27$ به $6/62$ ($p=0/005$) شده بود. همچنین MCV نیز افزایش داشت که از $86/64$ به $88/81$ رسیده بود ($p=0/002$). در گروه پلاسبو افزایش هموسیستئین از $14/4$ به $17/1$ وجود داشت ($p=0/007$) و B12 از $211/8$ به $187/04$ کاهش داشت. ($p=0/063$) در این گروه نیز تغییر معنی داری بر WBC، MCV و Platelet بیماران مشاهده نشد. اما هموگلوبین از $14/94$ به $14/72$ کاهش داشت ($p=0/36$).

نتیجه گیری

درمان با اسیدفولیک در بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین باعث جلوگیری از افزایش هموسیستئین می شود. این درمان سطوح ویتامین B12 را نیز افزایش می دهد. در این طرح افرادی که اسیدفولیک دریافت میکردند نسبت به گروه پلاسبو کاهش در هموسیستئین و افزایش در B12 داشتند بنابراین شایسته است در این بیماران مورد مصرف قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اسیدفولیک، دیابت، متفورمین، ویتامین B12، هموسیستئین

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع است.

۱ زهره موسوی

۲ جواد مظلوم خراسانی

۳ محمد تقی شاکری

۴ زهرا مظلوم خراسانی*

۱-دانشیار غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات

غدد درون ریز، دانشگاه علوم پزشکی مشهد،

مشهد، ایران

۲-پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی

مشهد، مشهد، ایران

۳-دانشیار گروه آمار زیستی، دانشگاه علوم

پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- استادیار غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات

غدد درون ریز، دانشگاه علوم پزشکی مشهد،

مشهد، ایران

*مشهد- بیمارستان قائم، مرکز تحقیقات غدد

درون ریز، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۸۵۰۰۰۰-۹۸

email:mazloomz1@mums.ac.ir

مقدمه

همچنین بیان شده است که درمان مکمل با فولات می تواند در افزایش اثرات مفید متفورمین بر اندوتلیوم عروق مفید باشد و فولیک اسید می تواند یک درمان بی خطر و ارزان برای هیپرهومیستئینیا باشد (۱۸).

با توجه به شیوع نسبتاً بالای بیماریهای متابولیک و همچنین استفاده از متفورمین، به نظر می رسد بررسی تأثیر متفورمین بر سطح سرمی هموسیستئین و متعاقباً ریسک بیماریهای کاردیوواسکولار مورد لزوم باشد.

لذا در این مطالعه اثر درمانی فولات جهت پیشگیری از هیپرهومیستئینمی در بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

نوع مطالعه انجام شده یک مطالعه کارآزمایی بالینی از نوع کاربردی است.

این مطالعه به صورت مداخله ای دوسو کور بوده به طوری که تعداد ۵۰ بیمار ۲۵ - ۷۰ سال با تشخیص دیابت تیپ ۲ که طی دو سال اخیر تشخیص داده شده است با GFR^1 بالاتر از ۶۰ در مراجعه به کلینیک غدد درون ریز بیمارستان امام رضا انتخاب شدند که در انتها ۵ بیمار ریزش داشته و گروه ۴۵ نفری مورد بررسی قرار گرفتند.

کلیه بیماران دیابتی تیپ ۲ تحت درمان بیشتر از یکسال با متفورمین و با GFR بیشتر از ۶۰ در گروه سنی ۲۵ تا ۷۰ سال می باشند که فاقد معیارهای زیر بودند:

GFR کمتر از ۶۰

آزمی

بیماران دریافت کننده ترکیبات فولات در طی ماه گذشته

بیماران دریافت کننده داروهای مؤثر بر سطح هموسیستئین (

نیاسین- فیبرات - انسولین - داروهای ضد تشنج - داروهای RA

خانمهای باردار و خانمهای شیرده

بیماران دریافت کننده ویتامین B12

بیماران دریافت کننده مولتی ویتامین

متفورمین به طور گسترده در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ استفاده می شود (۱-۵). اما ممکن است سطح سرمی ویتامین B12 را کاهش دهد (۶،۷). همچنین باعث افزایش سطح هموسیستئین و متعاقباً افزایش ریسک بیماریهای میکروواسکولار و ماکروواسکولار شود (۸-۱۱). و همین طور می تواند در کاهش سطح فولات نیز مؤثر باشد (۱۲).

همچنین استرس های اکسیداتیو و هیپرهومیستئینیا ریسک فاکتورهای شناخته شده ای برای بیماریهای کاردیوواسکولار هستند (۱۳). بسیاری از مطالعات طی دو دهه گذشته نشان داده اند که درمان های دارویی مختلف و برخی فاکتورها مانند سن، جنس، وضعیت تغذیه ای، سیگار و برخی بیماری ها می تواند تأثیرات متفاوتی بر سطح سرمی هموسیستئین ایجاد کنند (۱۴، ۱۵). مکانیسم اثر این دارو ها بر سطح سرمی هموسیستئین اغلب ناشناخته است همانطور که ممکن است مکانیسم اثر خود دارو نیز مشخص نباشد و نیز به دلیل اینکه ممکن است در همراهی با داروهای دیگر تجویز شود. در مورد برخی از داروها اعتقاد بر این است که از طریق دخالت بر متابولیسم فولات، ویتامین B12، ویتامین B6 و یا تغییر عملکرد کلیوی بر سطح سرمی هموسیستئین اثر می گذارند. اما مکانیسم دقیق اثر داروها بر هموسیستئین باید مورد ارزیابی قرار گیرد. داروهای پرمصرف مثل داروهای کاهنده چربی خون (مثل فیبرات و نیاسین)، داروهای کاهنده قند خون (مثل متفورمین)، انسولین، داروهای که در درمان روماتوئید آرتریت کاربرد دارند و داروهای ضد تشنج می توانند سطح سرمی هموسیستئین را افزایش دهند (۱۲).

- زنان مبتلا به PCOS (سندرم تخمدان پلی کیستیک) و همچنین بیماران PCOS تحت درمان با متفورمین سطح هموسیستئین بالاتری دارند. متفورمین دارویی است که می تواند سطح هموسیستئین را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶).

- از طرفی در برخی مطالعات بیان شده است که متفورمین می تواند اثرات مفیدی در بیماران لاغر مبتلا به PCOS داشته باشد به این نحو که باعث منظم شدن و یا شروع قاعدگی می شود و در عین حال اثرات قابل توجهی بر روی متابولیسم و بیماریهای کاردیوواسکولار ندارد (۱۷).

¹ Glomerular Fibratation Rate

جدول ۱ - مشخصات پایه دموگرافیک و آزمایشگاهی بیماران

Minimum	Maximum	میانگین \pm SD	متغیر
۳۸	۷۵	$۵۶/۶۹ \pm ۱۰/۲۶۶$	سن (سال)
۵/۱	۲۴/۸	$۱۳/۵۹۱ \pm ۴/۳۱۵۱$	سطح هموسیستین (میکرومول بر لیتر)
۹۱	۴۵۳	$۲۲۹/۴۴۷ \pm ۹۷/۵۳۵۹$	سطح ویتامین B12 (پیکوگرم بر میلی لیتر)
۵/۴۵	۱۳/۷	$۷/۴۱۴۲ \pm ۱/۶۱۷۲۰$	WBC ($1000/\mu l$)
۱۱/۳	۱۸/۲	$۱۴/۸۱۳ \pm ۱/۵۵۸۲$	Hemoglobin (گرم بر دسی لیتر)
۷۶/۲	۹۷/۹	$۸۷/۵۵۳ \pm ۵/۰۰۴۶$	MCV (فمتولیترا)
۱۱۸	۴۲۷	$۲۵۰/۴۷ \pm ۶۱/۹۳۳$	Platelet ($1000/\mu l$)
۸	۳۳	$۱۵/۸۰ \pm ۵/۲۰۸$	BUN (میلی گرم بر دسی لیتر)
۰/۵	۱/۵	$۰/۸۸۷ \pm ۰/۲۲۳۲$	Creatinin (میلی گرم بر دسی لیتر)
۹۷	۲۴۳	$۱۸۶/۷۳ \pm ۳۶/۰۵۴$	Cholesterol (میلی گرم بر دسی لیتر)
۷۸	۳۸۰	$۱۶۶/۴۷ \pm ۵۸/۳۴۴$	Triglyceride (میلی گرم بر دسی لیتر)
۶۵	۱۸۱	$۱۲۰/۵۸ \pm ۲۴/۸۳۶$	LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
۲۹/۶	۶۸/۷	$۴۳/۸۴۶۷ \pm ۸/۷۲۹۷۷$	HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
۵/۲	۱۰/۱	$۷/۳۲۲ \pm ۱/۲۲۲۷$	HbA1C (درصد)

مشخصات پایه آزمایشگاهی و سنی بیماران در هر دو گروه اسید فولیک و پلاسبو با استفاده از آزمون تی مستقل بررسی شد که تفاوت معنی داری نداشت و بیماران در این موارد نیز در دو گروه از توزیع طبیعی برخوردار بودند.

تعداد ۴۵ بیمار با میانگین سنی $۵۶/۶۹ \pm ۱۰/۲۶۶$ وارد این مطالعه شدند. سایر مشخصات دموگرافیک پایه در جدول شماره ۱ ثبت شده است.

در جدول شماره ۲ مشخصات پایه بالینی بیماران ثبت شد. بیماران به دو گروه تقسیم شدند. میزان توزیع مذکر و مؤنث در دو گروه با استفاده از آزمون کای اسکوئر مورد بررسی قرار گرفت که دارای توزیع طبیعی بود. در گروه اسید فولیک به مدت سه ماه بیمار روزانه ۱ میلی گرم اسید فولیک دریافت می کرد و در گروه پلاسبو بیماران روزانه یک قرص پلاسبو دریافت می کردند.

بیماران مبتلا به بیماری کبدی، بیماران با کاهش شدید تا متوسط ویتامین B12.

جهت هر بیمار پرسشنامه ای تکمیل شد. بعد از یک ناشتا شبانه (۸ ساعت) 5CC خون لخته از ورید براکیال جهت بررسی BUN, Vit B12, و هموسیستین و کراتینین 1CC خون سیترا ته جهت بررسی CBC به آزمایشگاه ارسال شد. ۲۵ بیمار تحت درمان با 1 mg اسید فولیک قرار گرفته (گروه مداخله) و ۲۵ بیمار Placebo (دارو نما) دریافت کردند (گروه کنترل). بیماران توسط دانشجو تحت نظر مجری طرح هر ماه ویزیت شده و تأکید بر مصرف دارو و در صورت مصرف منظم ماه قبل داروی ماه بعدی به وی داده شد. دوز و نوع مصرف دارو در طول درمان ثابت بوده است. پس از سه ماه آزمایشات ذکر شده تکرار شد. در این مدت درمان استاندارد بیماران نیز ادامه یافت. با استفاده از BUN و CrT بیمار که در آزمایشات می باشد GFR وی محاسبه شده و در صورتی که بالای ۶۰ بود در مطالعه شرکت داده می شد.

شرط ورود به این مطالعه رضایت آگاهانه از شرکت در این طرح بود. در مورد چگونگی پاسخ به پرسشها اطلاع رسانی و حق انصراف و خروج از مطالعه برای بیمار محفوظ نگه داشته شده بود. این طرح به تصویب کمیته اخلاق نیز رسیده بود.

اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS در رایانه ثبت و تجزیه و تحلیل شد. توصیف داده ها با استفاده از جدول و ساختارهای میانگین و انحراف معیار صورت گرفت.

با استفاده از آزمون تی مستقل دو گروه مداخله و کنترل با هم مقایسه شدند. برای مقایسه داخل گروهها (قبل و بعد) از آزمون t زوج نمونه ای استفاده شده و برای مقایسه جنس در دو گروه از آزمون کای اسکوئر استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه که به روش مداخله ای به منظور بررسی اثرات مفید اسید فولیک در بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین صورت گرفته است نتایج قابل توجهی به دست آمد که در جدول زیر مشخصات توزیع جنسی و تعداد بیماران آورده شده است و با استفاده از آزمون کراس تب توزیع آنها طبیعی مشخص شد.

در گروه دریافت کننده اسید فولیک بعد از درمان با اسید فولیک سطح ویتامین B12 به طور معنی داری افزایش یافته بود و نیز سطح هموسیستئین نیز دچار کاهش شده بود. ($p < 0/05$)

جدول ۴ - مقایسه متغیرهای کمی قبل و بعد از درمان در

گروه دریافت کننده پلاسبو

نتیجه آزمون P	میانگین \pm انحراف استاندارد		متغیر
	قبل درمان	بعد درمان	
0/007	17/100 \pm 4/0130	14/462 \pm 4/7089	سطح هموسیستئین
0/063	187/048 \pm 1/17	211/810 \pm 91/0542	سطح ویتامین B12
0/075	6/9138 \pm 0/997	7/5681 \pm 1/83932	WBC
0/036	14/724 \pm 1/3889	14/948 \pm 1/4239	هموگلوبین
0/897	90/819 \pm 4/6131	90/738 \pm 4/9145	MCV
0/805	247/15 \pm 47/459	248/24 \pm 64/566	Platelet

در گروه دریافت کننده پلاسبو شاهد افزایش سطح هموسیستئین در بیماران بوده ایم و سطح ویتامین B12 نیز دچار کاهش شده است. ($p < 0/05$)

بحث

این مطالعه به منظور بررسی اثرات مفید درمان با اسید فولیک در بیماران دیابتی تیپ ۲ که متفورمین دریافت می کنند انجام شده است. از آنجا که دیابت یکی از شایع ترین بیماریها در تمامی جوامع است و مصرف متفورمین در بیماران دیابتی نیز بالا است و نیز خود دیابت شیوع زیادی در بین بیماران دارد، این مطالعه به منظور کاهش اثرات جانبی دیابت و عوارض ناشی از آن و نیز متفورمین انجام شد.

بررسی ها حاکی از آن بود که میانگین آزمایشات بیماران در سطح پایه در محدوده طبیعی بود. گرچه بسیاری از افراد از سطح بالای هموسیستئین و نیز پایین بودن سطح ویتامین B12 برخوردار بودند.

نقش متفورمین در افزایش سطح هموسیستئین و نیز کاهش سطح ویتامین B12 در مطالعات قبلی ذکر شده بود (۱۸).

همچنین اثرات مفید اسید فولیک در کاهش هموسیستئین خون و نیز افزایش سطح ویتامین B12 نیز در مطالعات زیادی بررسی شده بود که حاکی از اثرات مثبت مصرف فولیک اسید در بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین بوده است (۱۹).

در مطالعه حاضر نیز بیماران دیابتی تحت درمان با متفورمین که اسید فولیک دریافت کردند به طور میانگین سطح هموسیستئین

جدول ۲ - مقایسه متغیرهای کمی قبل درمان در دو گروه

اسید فولیک و پلاسبو

نتیجه آزمون P	میانگین \pm SD		متغیر
	گروه پلاسبو	گروه اسید فولیک	
0/744	10/734 \pm 56/14	57/17 \pm 10/046	سن (سال)
0/216	47/089 \pm 14/462	12/829 \pm 3/8784	سطح هموسیستئین (میکرومول بر لیتر)
0/258	1/83932 \pm 7/5681	1/42158 \pm 7/2796	WBC (μ l/1000)
0/564	1/4239 \pm 14/948	14/696 \pm 1/6884	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)
0/59	4/9145 \pm 90/738	86/642 \pm 4/3291	MCV (فمتولیت)
0/21	64/566 \pm 248/24	252/42 \pm 60/863	Platelet (μ l/1000)
0/825	16 \pm 5/486	15/62 \pm 5/063	BUN (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/814	0/948 \pm 0/24	0/833 \pm 0/1971	کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/092	185 \pm 37/963	188/25 \pm 35/048	کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/768	66/715 \pm 168/67	164/54 \pm 51/318	تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/819	22/810 \pm 122/37	119/02 \pm 26/872	LDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/653	9/55665 \pm 43/9524	8/14584 \pm 43/7524	HDL (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/941	1/0928 \pm 7/229	7/404 \pm 1/3441	HbA1C (درصد)

با توجه به نتایج به دست آمده توسط آزمون تی مستقل میانگین متغیرها در دو گروه اسید فولیک و پلاسبو قبل درمان مشابه یکدیگر بوده است

جدول ۳ - مقایسه متغیرهای کمی قبل و بعد از درمان

نتیجه آزمون P	میانگین \pm انحراف استاندارد		متغیر
	قبل درمان	بعد درمان	
0/6	12/829 \pm 3/8784	12/479 \pm 3/3397	سطح هموسیستئین
0/025	244/879 \pm 1/0226	285/542 \pm 1/1720	سطح ویتامین B12
0/005	7/2796 \pm 1/42158	6/6258 \pm 0/99144	WBC
0/075	14/696 \pm 1/6884	14/479 \pm 1/6665	هموگلوبین
0/002	86/642 \pm 4/3291	88/812 \pm 3/2214	MCV
0/945	252/42 \pm 60/863	251/88 \pm 45/162	Platelet

نتیجه گیری

به طور کلی بیماران ما در ابتدا به طور میانگین دارای سطوح ویتامین B12 و هموسیستین در محدوده نرمال بوده اند اما مصرف سه ماهه فولیک اسید باعث کاهش سطح هموسیستین که یک عامل خطر ساز به جهت بروز بیماری های آترواسکلروتیک و قلبی می باشد شده است. همچنین سطح ویتامین B12 افراد دریافت کننده اسید فولیک در مقایسه با گروه دریافت کننده پلاسبو دچار افزایش شده بود که این امر موجب تغییر در سطح هموگلوبین در این نشده بود اما در گروه پلاسبو شاهد کاهش سطح هموگلوبین که به همراه افزایش MCV بود، بودیم. MCV در گروه پلاسبو دچار افزایش شده بود.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از اساتید محترم اندوکرینولوژی مرکز تحقیقات غدد دانشگاه علوم پزشکی مشهد و پرسنل محترم آزمایشگاه پر دیس که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند.

خون نشان دچار کاهش شد که در سطح معنی دار نیز می باشد که این روند در بیماران دریافت کننده پلاسبو وجود نداشت و آنها به طور معنی دار دچار افزایش سطح هموسیستین خون شده بودند. سطح ویتامین B12 نیز در مطالعه انجام شده در افراد دریافت کننده اسید فولیک به طور میانگین افزایش داشت که این افزایش نیز در محدوده معنی دار بود. و در افراد دریافت کننده پلاسبو به طور مشخص دچار کاهش سطح این ویتامین شده بودند. سطح هموگلوبین و MCV بیماران قبل از درمان در محدوده طبیعی قرار داشت.

درمان با اسید فولیک تأثیر معنی داری بر هموگلوبین بیماران نداشت اما در افراد دریافت کننده پلاسبو کاهش میانگین هموگلوبین مشاهده می شد.

گرچه در بسیاری از مطالعات انجام شده ذکر شده است که کاهش سطح هموگلوبین در بیماران دریافت کننده متفورمین چشمگیر نمی باشد (۲۰).

MCV در افراد دریافت کننده اسید فولیک دچار کاهش شده بود و در افراد دریافت کننده پلاسبو افزایش. اما در سطح معنی داری نبود که مشابه با نتایج برخی از مطالعات قبلی بود (۲۰).

درمان با اسید فولیک تأثیر معنی داری بر روی سطح پلاکت خون این افراد نداشت و همین طور افراد دریافت کننده پلاسبو نیز تغییر معنی داری در سطح پلاکت خون نشان نداشتند.

References:

1. Tomkin GH, Hadden DR, Weaver JA, Montgomery DA. Vitamin-B12 status of patients on long-term metformin therapy. Br Med J 1971 Jun 19;2(5763):685-687.
2. Ting RZ, Szeto CC, Chan MH, Ma KK, Chow KM. Risk factors of vitamin B(12) deficiency in patients receiving metformin. Arch Intern Med 2006 Oct 9;166(18):1975-1979.
3. de Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffelé MG, van der Kolk J, Bets D, et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. BMJ 2010 May 20;340:c2181.
4. Reinstatler L, Qi YP, Williamson RS, Garn JV, Oakley GP 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 Feb;35(2):327-333.
5. Mazokopakis EE, Starakis IK. Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency. Diabetes Res Clin Pract 2012 Sep;97(3):359-367.
6. Bauman WA, Shaw S, Jayatilleke E, Spungen AM, Herbert V. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. Diabetes Care 2000 Sep;23(9):1227-1231.
7. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012 May 1;9(6):345-354.
8. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. Am J Clin Nutr 1992 Jan;55(1):131-138.

9. Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor?. *Cleve Clin J Med* 2004 Sep;71(9):729-734.
10. Lippi G, Plebani M. Hyperhomocysteinemia in health and disease: where we are now, and where do we go from here ?. *Clin Chem Lab Med* 2012 Dec;50(12):2075-2080.
11. Satyanarayana A, Balakrishna N, Pitla S, Reddy PY, Mudili S, Lopamudra P, et al. Status of B-vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: association with vitamin-B12 deficiency and hyperhomocysteinemia. *PLoS One* 2011;6(11):e26747.
12. Corominas-Faja B, Quirantes-Piné R, Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Martin-Castillo B, et al. Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)* 2012;4(7):480-498.
- 13-Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost* 2005 Nov;94(5):907-915.
- 14- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004 Jan;50(1):3-32.
- 15- Lin JS, Shen MC, Cheng WC, Tsay W, Wang YC, Lin BB, et al. Age, sex and vitamin status affect plasma level of homocysteine, but hyperhomocysteinemia is possibly not an important risk factor for venous thrombophilia in Taiwanese Chinese. *Br J Haematol* 2002 Apr;117(1):159-163.
- 16-. Grodnitskaya EE, Kurtser MA. Homocysteine metabolism in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2012 Mar;28(3):186-189.
- 17-Pasquali R, Gambineri A. Insulin sensitizers in polycystic ovary syndrome. *Front Horm Res* 2013;40:83-102.
18. de Groot-Kamphuis DM, van Dijk PR, Groenier KH, Houweling ST, Bilo HJ, Kleefstra N. Vitamin B12 deficiency and the lack of its consequences in type 2 diabetes patients using metformin.. *Neth J Med* 2013 Sep;71(7):386-390.
19. Aarsand AK, Carlsen SM. Folate administration reduces circulating homocysteine levels in NIDDM patients on long-term metformin treatment. *J Intern Med* 1998 Aug;244(2):169-174.
20. Sato Y, Ouchi K, Funase Y, Yamauchi K, Aizawa T. Relationship between metformin use, vitamin B12 deficiency, hyperhomocysteinemia and vascular complications in patients with type 2 diabetes. *Endocr J* 2013;60(12):1275-1280.