

**Klinik Araştırma**

## Vitiligolu Hastalarda Serum ADMA, MDA, Vitamin E ve Homosistein Düzeyleri

Dilara KAMAN<sup>a1</sup>, Betül DEMİR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Vitiligo, melanosit yıkımı ile seyreden kazanılmış bir depigmentasyon hastalığıdır. Vitiligonun gerçek etyopatogenezisi ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli gruplar, vitiligo patofizyolojisinde oksidatif stres katılımını göstermiştir. Bu çalışmanın amacı vitiligonun serum homosistein, asimetrik dimetilarginin (ADMA), vitamin A, vitamin E ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile ilişkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu randomize vaka kontrol çalışması 30 vitiligo hastası ve 20 sağlıklı kontrol olmak üzere 50 birey üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bireyden serum kan örnekleri vitamin A, vitamin E, MDA, ADMA ve homosistein düzeylerini belirlemek üzere toplanmıştır. Bu parametrelerin düzeyleri her iki grupta da High Performance Liquid Chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı kullanılarak çalışılmıştır.

**Bulgular:** Serum vitamin E düzeyleri vitiligolu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düşük iken ( $p=0.004$ ), serum MDA, homosistein ve ADMA düzeyleri anlamlı olarak artmıştı ( $p<0.0001$ ). Vitamin A düzeyleri ise kontrol ve hasta bireylerde hemen hemen benzerdi ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Biz vitamin E düzeylerinin azalmasının ve homosistein, MDA ve ADMA düzeylerinin artmasının vitiligoda belirgin bir özellik teşkil ettiği sonucuna vardık.

**Anahtar Kelimeler:** Vitiligo, homosistein, ADMA, MDA, vitamin A/E.

### ABSTRACT

#### Serum ADMA, MDA, Vitamin E and Homocysteine Levels in Vitiligo Patients

**Objective:** Vitiligo is an acquired depigmenting disorder caused by the destruction of melanocytes. The exact etiopathogenesis and mechanisms of vitiligo are not fully understood. Several groups have shown the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of vitiligo. The aim of this study was to study for any association of vitiligo with serum homocysteine, asymmetric dimethylarginine (ADMA), vitamin A, vitamin E and malondialdehyde levels (MDA).

**Material and Method:** This randomized case control study was performed on 50 subjects: 30 patients suffering from vitiligo and 20 healthy controls. Venous blood was collected from each subject to estimate the levels of vitamin A, E, MDA, ADMA and homocysteine. The serum levels of these parameters in both groups were measured using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

**Results:** The levels of serum vitamin E were significantly decreased in vitiligo patients ( $p=0.004$ ), while serum MDA, homocysteine and ADMA levels were significantly increased ( $p<0.0001$ ), and the levels of vitamin A were almost the same in patients as in the control subjects ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** According to our results, we conclude that reduced vitamin E levels and increased levels of homocysteine, MDA and ADMA may constitute a distinctive feature in vitiligo.

**Key Words:** vitiligo, homocysteine, ADMA, MDA, vitamin A/E

Vitiligo, farklı boyut ve şekilde depigmente beyaz yamalar ile karakterize bir cilt pigmentasyon anomalisi olup dünya nüfusunun % 1-4'ünü etkiler (1). Vitiligonun patofizyolojik mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Son zamanlarda, oksidatif stres ve etkilenen cildin epidermal tabakasında serbest radikallerin birikiminin, vitiligo patofizyolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (2).

Serbest radikaller; birçok fizyolojik ve patolojik işlemler sırasında meydana gelen atom ya da

moleküllerdir [süperoksit, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit (NO)] (3). Serbest radikaller; protein, karbonhidrat, DNA ve özellikle de lipid gibi hücrenel bileşiklere zarar verebilir. Asimetrik dimetilarginin (ADMA), endojen nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür. Endojen nitrik oksit sentaz, L-Arginin'den NO sentezinin sağlar (4). Nitrik oksit hem *de novo* hücre-hücre dışı matriks (ECM) etkileşimini modüle eder hem de apoptozda rol oynamaktadır (5-8). Melanositlerin inflamatuvar hücrelerin belirli bir alt kümesi (ör: sitotoksik T hücreleri, regülatuvar T

<sup>a</sup>Yazışma Adresi: Dr. Dilara KAMAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye  
Tel:0424 2370000  
Geliş Tarihi/Received: 18.03.2015

e-mail: drdilara\_76@hotmail.com  
Kabul Tarihi/Accepted: 18.05.2015

hücreleri gibi makrofajların alt kümeleri ve Langerhans hücreleri) tarafından tutulumu NO oluşumuna ve buna yanıt olarak melanosit kaybına yol açabileceği öne sürülmüştür (9-13). Homosistein metabolizması hem folik asit hem de vitamin B12'ye bağlıdır.

Hiperhomosisteinemi de ADMA yükselmektedir (14-15). Yaygın vitiligolu hastalarda homosistein seviyelerinde artış, folik asit ve vitamin B12 seviyelerinde azalış tespit edilmiştir (16).

Vitiligo patogenezindeki major hipotezlerden biri de oksidatif hasardır. Oksidatif hasar hipotezi, melanin biyosentezi sırasında oluşan bazı toksik metabolitlerin oluşumu gerçeğine dayanmaktadır (17). Artmış reaktif oksijen türevleri (ROT) nedeniyle oluşan biyomoleküler hasar, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu ya da kırılması, enzim aktivasyonu ya da inaktivasyonu, protein oksidasyonu ya da yıkılmasıyla sonuçlanır (18). Bu hasar sıklıkla hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA) gibi reaktif biyomoleküllerin üretimine ikincil oluşur (19). Oksidatif stresin vitiligo patogenezinde yer alan önemli bir mekanizma olması nedeniyle çeşitli antioksidan ürünler vitiligo tedavisinde çalışılmıştır (20). Bu amaçla vitiligo hastalığının tedavisinde kullanılan antioksidan bileşikler arasında vitamin E de bulunmaktadır (21). Khan ve ark.'nın çalışmasında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hem lokalize hem de jeneralize vitiligolu hastalarda serum vitamin E düzeyleri düşük olarak bulunmuştur ve düşük vitamin E'nin oksidatif strese yol açtığı ve vitiligo patogenezinde yer aldığı belirtilmiştir (22).

Vitiligo birbiriyle örtüşen genetik, otoimmün ve metabolik faktörlerin rol oynadığı karmaşık bir etyopatogeneze sahiptir. Bu çalışmada vitiligo ile ADMA, homosistein, MDA, vitamin A ve E arasındaki olası bir ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

## MATERYAL METOD

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji polikliniğine başvuran, 18 yaşından büyük, normal vücut kitle indeksine (VKİ) sahip, gebe olmayan, diabet, hipertiroidi ve hipotiroidisi bulunmayan, herhangi bir kanser öyküsü olmayan, alkol kullanmayan, herhangi bir sistemik ilaç tedavisi almayan ve gönüllü 30 vitiligo hastası ve aynı şartlara sahip 20 sağlıklı gönüllü kontrol grubu toplam 50 kişilik katılımcıdan oluşmaktadır. Çalışmaya katılan hastalar diğer otoimmün hastalıklar açısından dışlanmıştır. Kayıtlı her bir hasta ve sağlıklı kontrol bireyleri için Bilgilendirilmiş Hasta Onay formu doldurulmuştur. Çalışma Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kuruluna sunulmuş ve 08/01/2015 tarih ve 71055 sayılı karar numarası ile onay alınmıştır.

Çalışmaya alınan her bir katılımcıdan sabah aç karnına biyokimya tüplerine 5 ml venöz kan örneği

alınmış ve bu şekilde toplanan kan örnekleri derhal santrifüj edilerek elde edilen serumlar -20°C derecede buzdolabında çalışma gününe kadar saklanmıştır. Çalışma gününde serum örnekleri çözündürülerek MDA, ADMA, homosistein, vitamin A ve E düzeyleri çalışılmıştır. Aynı zamanda bu hastaların lipit düzeyleri, bel çevresi, boy ve VKİ ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

## Serum Vitamin A, Vitamin E, MDA, Homosistein ve ADMA Düzeyi Ölçümü

Serum vitamin A, vitamin E, MDA, Homosistein ve ADMA düzeyleri Shimatsu marka High Performance Liquid Chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı ile immuchrom GmbH (Hessen, Germany) kiti kullanarak kit prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır.

### Vitamin A/E Tayini

Analiz öncesinde numuneler oda sıcaklığına alındı. 250 µl serum üzerine 50 µl internal standard ve 500 µl çöktürme reaktifi ilave edilerek 30 dakika 2-8°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10.000g'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatandan 100µl HPLC sisteminde akış hızı: 0.8 ml/dk, dalga boyu vitamin A için 325, vitamin E için 300 nm'de C18 kolonu kullanılarak vitamin A ve E tayin edildi.

### MDA Tayini

Serum örneğinden 20 µl alınarak üzerine 1 ml türevlendirme solüsyonu ilave edilerek proteinler çöktürüldü. Sonra 60 dk 95°C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. 2-8°C'de örnekler soğutulduktan sonra 10.000g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatandan 500 µl alınıp aynı hacimde reaksiyon solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra HPLC sisteminde akış hızı: 0.8-1.0 ml/dk, eksitasyon 515, emisyon 553 nm dalga boyunda MDA tayin edildi.

### Homosistein Tayini

Serum örneğinden 50 µl alınarak üzerine 50 µl internal standart, 20 µl reduksiyon solüsyonu, 100 µl türevlendirme solüsyonu ilave edilerek 10 dk 60°C'de inkübe edildi. Örnekler 2-8°C'de soğutulduktan ve 100 µl çöktürücü ajan eklendikten sonra 10.000g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatandan 20 µl alınarak HPLC sisteminde akış hızı: 0.7-1.0 ml/dk, eksitasyon 385, emisyon 515 nm dalga boyunda homosistein düzeyi tayin edildi.

### ADMA Tayini

Asimetrik dimetilarginin tayini için özetle, 20 mg 5-sülfosalisilik asit 1 ml seruma eklendi ve karışım buz banyosunda 10 dakika bekletildi. Çökmüş olan protein 2000g'de 10 dk santrifüj ile uzaklaştırıldı. Süpernatantın 10 µl'si filtre edildikten sonra 100 µl türevlendirme reaktifi ile karıştırıldı ve kromatografik sisteme enjekte edildi. Asimetrik dimetilargininin ayırımı için 250 mm X 4.6 mm ölçülerinde Fenil kolon

kullanıldı. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi sisteminde akış hızı 1 ml/dk, eksitasyon 420, emisyon 483 nm dalga boyunda ADMA tayin edildi. Linearite  $> 16.0 \mu\text{mol/L}$ , sensitivite  $< 0.01 \mu\text{mol/L}$ 'dir.

### İstatistik

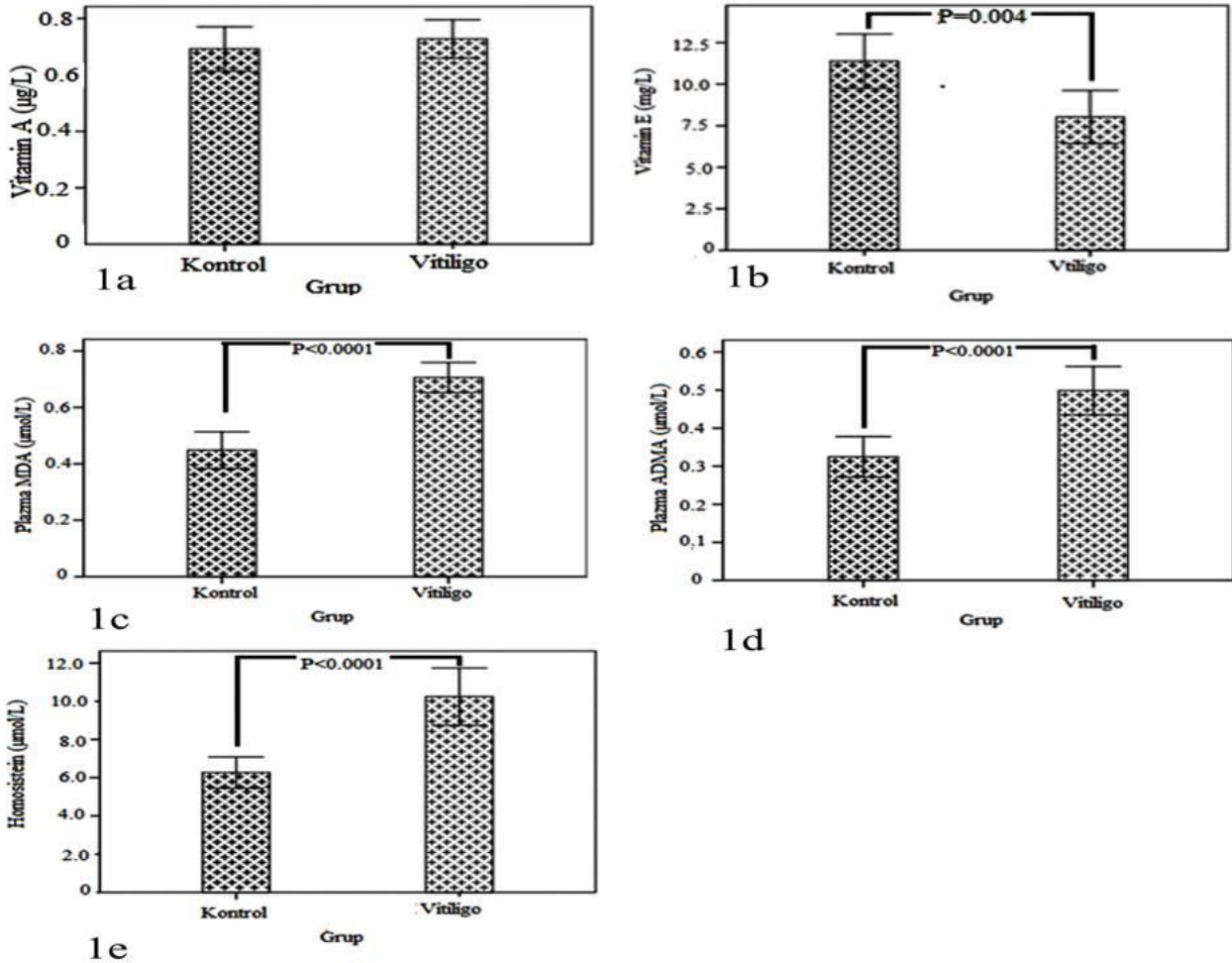
Tüm veriler SPSS 22.0 istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmada, normal dağılım gösteren parametreler için bağımsız örneklerde Student-t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak değerlendirildi.

### Sonuçlar

Çalışma gruplarının demografik özellikleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Gruplar arasında cinsiyet ve ortalama yaş açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı. Gruplar arasında bel çevresi, VKİ ve glukoz düzeyleri benzer bulundu. Vitiligo hastalarda serum kolesterol ve trigliserit düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuşken (sırasıyla;  $p=0.031$ ,  $p=0.019$ ),

serum HDL ve LDL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Vitiligo hastaların ve kontrol bireylerinin serum ADMA, MDA, Homosistein, vitamin A ve E düzeyleri Tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Serum vitamin A düzeyleri (Şekil 1a) kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. Serum vitamin E düzeyleri (Şekil 1b) kontrol bireylerde vitiligo hastaları ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p=0.004$ ). Serum MDA düzeyleri (Şekil 1c) gruplar arasında karşılaştırıldığında hasta grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p < 0.0001$ ). Serum ADMA (Şekil 1d) düzeyleri vitiligo grubunda hasta grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p < 0.0001$ ). Asimetrik dimetilarginin düzeylerine benzer şekilde homosistein düzeyleri de (Şekil 1e) hasta grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p < 0.0001$ ).



Şekil 1. Serum vitamin A (1a), vitamin E (1b), MDA (1c), ADMA (1d) ve Homosistein (1e) düzeyleri. MDA: Malondialdehit, ADMA: Asimetrik dimetilarginin

**Tablo 1.** Vitiligo ve kontrol guruplarının demografik ve laboratuvar bulguları.

Parametreler	Kontrol	Vitiligo	p
Erkek/Kadın	10/10	10/20	p>0.05
Yaş (yıl)	31.53±6.6	37.96±13.6	p>0.05
Bel Çevresi (cm)	82.05±7.8	82.8±9.2	p>0.05
VKI	22.99±1.4	23.10±1.3	p>0.05
Kolesterol (mg/dL)	147.88±32.2	171.74±35.5	<b>p=0.031</b>
Trigliserit (mg/dL)	92.31±28.4	120.44±68.4	<b>p=0.019</b>
HDL (mg/dL)	45.43±12.5	47.33±13.7	p>0.05
LDL (mg/dL)	94.88±18.2	102.70±35.5	p>0.05
Glukoz (mg/dL)	84.94±10.7	101.32±50.4	p>0.05
Vitamin A (µg/L)	0.69 ±1.7	0.72±4.0	p>0.05
Vitamin E (mg/L)	11.38±3.4	8.02±4.2	<b>p=0.004</b>
MDA (µmol/L)	0.44±0.1	0.70±0.1	<b>p&lt;0.0001</b>
ADMA (µmol/L)	0.32± 0.1	0.49 ±0.2	<b>p&lt;0.0001</b>
Homosistein (µmol/L)	6.2 ± 1.7	10.2± 4.0	<b>p&lt;0.0001</b>

## TARTIŞMA

Vitiligo çok yaygın bir hastalık olmasına rağmen patogenezi hala tam olarak anlaşılmış değildir. Oksidatif stres vitiligoda melanosit dejenerasyonunu tetikleyici bir olay olarak öne sürülmüştür (23-29). Bazı çalışmalarda melanogenezin, reaktif oksijen türlerinin düzeylerinde önemli değişikliğe yol açtığı gösterilmiştir (30). Reaktif oksijen türleri ve diğer radikaller oksidatif stresi indükleyebilir (31). Oksidatif stresin vitiligonun patogenezinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada serum MDA düzeylerini vitiligo hastalarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulduk. MDA lipid peroksidasyon reaksiyonunun son ürünü olup oksidatif stresin spesifik bir indikatörü olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmaların bazısında eritrositlerde normal MDA düzeyleri bulunmuşken (29,32), bazısında ise bizim çalışmamız ile uyumlu şekilde vitiligo hastalarında yüksek MDA düzeylerine rastlanmıştır (25,26). Malondialdehit, lipid peroksidasyonun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir.

Bizim çalışmamızda serum homosistein düzeyleri sağlıklı kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar vitiligo hastalarında yüksek homosistein değerlerini gösteren, Shaker ve ark. tarafından 26 vitiligo hastası ile yapılan pilot bir çalışmada da doğrulanmıştır (33). Ayrıca, homosistein metabolizmasının B12 ve folik asit metabolizmasına bağlı olması ve vitiligo hastalarında yapılan çalışmalarda B12 ve folik asit

düzeylerinin düşük olması (34-36), homosistein düzeylerinin yüksekliğini açıklayabilir. Bu sonuçlar ile zıt olacak şekilde Balci ve ark. (37) vitiligo hastaları ile kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmemişlerdir. Ayrıca Yaşar ve ark.'nın (38) 40 vitiligo hastası ve 40 kontrol birey üzerinde yaptıkları çalışmada homosistein düzeylerinin kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı farklılık göstermediği belirtilmiştir.

Homosistein düzeyi ile vitiligo arasında muhtemel ilişki birkaç deneysel çalışmada gösterilmiştir. Reish ve ark. (39) homosisteinin melanin sentezinde kritik bir role sahip olan tirozinaz enzimini inhibe ettiğini göstermiştir. Homosisteinin oksidasyonu tarafından toksik reaktif oksijen türlerinin oluşumu melanositotoksik bileşiklerin birikimine yol açtığı ileri sürülmüştür (40).

Antioksidanların psoriasis, vitiligo gibi bazı otoimmün hastalıkların gelişimde koruyucu bir rolü vardır. Antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısı olan vitamin E, hücre membranlarında ve dolaşımdaki lipoproteinlerde bulunup membranları serbest radikallerin hasar verici etkisinden korur (41). Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlardan beta karoten (vitamin A) ise lipid ve lipid olmayan hücrel kompartmanlarda oksijenin hasar yapıcı etkilerini azaltır. Bizim çalışmamızda vitamin E düzeyi vitiligolu hastalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuşken, vitamin A düzeyinde hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Vitamin E'nin düşük düzeyleri serbest radikallerin birikimine ve oksidatif sistemin artmasına sebep olabilir. Jain ve ark.'nın yaptığı çalışmada bizim çalışmamız ile uyumlu olacak şekilde vitiligo hastalarında serum vitamin E düzeyleri düşük bulunmuştur (42). Ancak Agrawal (43) tarafından yapılan bir çalışmada vitiligo hastaları ile sağlıklı bireyler arasında vitamin E düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir. Ines ve ark.'nın çalışmasında da vitiligo hastaları ile sağlıklı kontrol bireyleri arasında serum vitamin A düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gösterilmiştir (44). Asimetrik dimetilarginin, insan kanında ve idrarında saptanabilen endojen bir molekül olup endojen NOS inhibitörüdür. Nitrik oksit sentezinin vücuttaki fonksiyonu, L- Arginin'den nitrik oksit sentezinin sağlanmasıdır (4). Nitrik oksit serbest bir radikal olup hücrelerde NOS enzimi aracılığıyla L- arjininden sentezlenir (24,25). İnflamatuvar durumlarda NOS'da artış görülür, bu durum da normal insan melanosit etrafında inflamatuvar hücrel infiltratların sitotoksik etkisine katkıda bulunur (26). Yapılan çalışmalarda NO türlerinin in vivo anormal üretimi melanositlerin ekstraselüler matrikse yapışmasını azaltır ve bu da depigmentasyona yol açar (27). Literatür taramasında vitiligolu hastalarda ADMA düzeyini inceleyen bir

çalışmaya rastlayamadık Ancak NO ile ilişkisi bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda vitiligo hastalarında ADMA düzeyleri kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. ADMA, NOS aktivitesini inhibe ederek L-Argininin hücre içine alınımını engeller. Nitrik oksit fonksiyonu; vasküler homeostazın sağlanmasıdır. Asimetrik dimetilarginin düzeylerinde artış NO düzeylerinin azalmasına yol açar; ortamda NO azaldığında ise endotelde homeostaz, vazokonstriksiyon lehine bozulur ve endotelial disfonksiyon başlar (7). Bizim çalışmamızda vitiligolu hastaların kolesterol ve trigliserit düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan HMG CoA redüktaz aktivitesinin vitiligolu bireylerde arttığı gösterilmiştir (45). Çalışmamızdaki kolesterol düzeyindeki artış buna bağlı olarak yüksek bulunmuş olabilir. Fakat Karadağ ve ark.'nın 57 vitiligo ve 39 kontrol bireyde yaptığı bir çalışmada vitiligo hastaları

ile kontrol bireyler arasında kolesterol ve trigliserit düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (46).

Sonuç olarak bizim çalışmamız vitiligonun patogenezinde oksidan sistemin önemli rol oynadığını göstermektedir. Daha önce yapılmış çalışmalar antioksidan/oksidan sistemin vitiligoyu etkilediğini göstermektedir. Canlı organizmanın bir hastalığa maruziyetinden sonra oksidatif durum farklı şekillerde etkilenebilir. Hastalarda değişmiş antioksidan enzim aktiviteleri oksidatif stresde artışa yanıt olarak gelişebilir. Bizim çalışmamızda da artmış MDA düzeyleri ve azalmış vitamin E düzeyleri bu bulgular ile uyumlu şekilde gösterilmiştir. Ayrıca vitiligo hastalarında homosistein ve ADMA düzeylerinin artışı yine oksidatif stres ile ilişkili olarak açıklanabilir. Ancak bizim sonuçlarımızı doğrulamak ve antioksidan tedavilerin vitiligolu hastalarda yararlı olup olamayacağını göstermek için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Mosher DB. Hypomelanoses and hypermelanoses. In: Freedberg IM, Eisen AZ, WolV K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI et al (eds) Fitzpatrick's dermatology in general medicine. McGraw-Hill, New York, 1999; 945-1018.
2. Schallreuter KU, Wood JM, Berger J. Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 1081-1085.
3. Knight JA. Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab* 1995; 25: 111-121.
4. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.
5. Gong L, Pitari GM, Schulz A, Waldman SA. Nitric oxide signaling: systems integration of oxygen balance in defense of cell integrity. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 7-14.
6. Monteiro HP, Silva EF, Stern A. Nitric oxide: a potential inducer of adhesion-related apoptosis-anoikis. *Nitric Oxide* 2004; 10: 1-10.
7. Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 969-975.
8. Liu L, Stamler JS. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 937-942.
9. van den Wijngaard RM, Wankowicz-Kalinska A, Pals S, Weening J, Das PK. Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. *Lab Invest* 2001; 81: 1061-1067.
10. Wankowicz-Kalinska A, van den Wijngaard RM, Tigges BJ et al. Immunopolarization of CD4+ and CD8+ T cells to type-1-like is associated with melanocyte loss in human vitiligo. *Lab Invest* 2003; 83: 683-695.
11. Das PK, van den Wijngaard RM, Wankowicz-Kalinska A, Le Poole IC. A symbiotic concept of autoimmunity and tumour immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol* 2001; 22: 130-136.
12. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Das PK. Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance. *Am J Pathol* 1996; 148: 1219-1228.
13. Iuga AO, Qureshi AA, Lerner EA. Nitric oxide is toxic to melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 302-306.
14. Lentz SR, Rodionow RN, Dayal S. Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: the potential role of ADMA. *Atherosclerosis Suppl* 2003; 4: 61-65.
15. Boger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1467-72.
16. Silverberg JL, Silverberg NB. Serum homocysteine as a biomarker of vitiligo vulgaris severity: A pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: 445-447.
17. Hann SK. Autocytotoxic hypothesis for the destruction of melanocytes as the cause of vitiligo. In: Hann SK, Nordlund JJ (eds) Blackwell, Oxford: 2000: 137-41.
18. Miyachi Y. Biochemistry of the physiopathologic and clinical aspects of free radicals in skin diseases. *Nippon Rinsho* 1988; 46: 2252-6.
19. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1: 255-284.
20. Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: 493-514.
21. Akyol M, Celik VK, Ozcelik S, Polat M, Marufihah M, Atalay A. The effects of vitamin E on the skin lipid peroxidation and the clinical improvement in vitiligo patients treated with PUVA. *Eur J Dermatol* 2002; 12: 24-6.
22. Khan R, Satyam A, Gupta S, Sharma VK, Sharma A. Circulatory levels of antioxidants and lipid peroxidation in Indian patients with generalized and localized vitiligo. *Arch Dermatol Res* 2009; 301: 731-7.
23. Dell'anna ML, Urbanelli S, Mastrofrancesco A, et al. Alterations of mitochondria in peripheral blood mononuclear cells of vitiligo patients. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 553-9.

24. Dell'anna ML, Maresca V, Briganti S, et al. Mitochondrial impairment in peripheral blood mononuclear cells during the active phase of vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 908–13.
25. Yildirim M, Baysal V, Inaloz HS, et al. The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo. *J Dermatol* 2003; 30: 104–108.
26. Koca R, Armutcu F, Altinyazar HC, Gurel A. Oxidant-antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 406–409.
27. Jimbow K, Chen H, Park S, Thomas PD. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol* 2001; 44: 55–65.
28. Agrawal D, Shajil EM, Marfatia YS, Begum R. Study on the antioxidant status of vitiligo patients of different age groups in Baroda. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 289–94.
29. Picardo M, Passi S, Morrone A, et al. Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. *Pigment Cell Res* 1994; 7: 110–5.
30. Riley PA. Radicals in melanin biochemistry. *Ann NY Acad Sci* 1988; 55: 111–20.
31. Procter PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Physics Med NMR* 1984; 16: 175–95.
32. Tastan HB, Erol IE, Sayal A, Erbil AH. Vitiligoda eser element ve antioksidan düzeyleri. *T Klin J Dermatol* 2003; 13: 141–9.
33. Shaker OG, El-Tahlawi SM. Is there a relationship between homocysteine and vitiligo? A pilot study. *Br J Dermatol* 2008; 159: 720–724.
34. Montes LF, Dias ML, Lajous J, Garcia NJ. Folic acid and vitamin B12 in vitiligo: A nutritional approach. *Cutis* 1992; 50: 39–42.
35. Kim SM. Serum levels of folic acid and vitamin B12 in Korean patients with vitiligo. *Yonsei Med J* 1999; 40: 195–198.
36. El-Batawi MMY, El-Tawil NEA, El-Tawil AEA. Serum levels of vitamin B12 and folic acid in Egyptian patients with vitiligo. *Egypt J Derm Androl* 2001; 21: 77–80.
37. Balci DD, Yonden Z, Yenin JZ, Okumus N. Serum homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels in vitiligo. *Eur J Dermatol* 2009; 19: 382–3.
38. Yasar A, Gunduz K, Onur E, Calkan M. Serum homocysteine, vitamin B12, folic acid levels and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism in vitiligo. *Dis Markers* 2012; 33: 85–9.
39. Reish O, Townsend D, Berry SA et al. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 127–32.
40. Ortonne JP. Vitiligo and other disorders of hypopigmentation. In: *Dermatology*, 1st edn (Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds). New York: Mosby, 2003; 947–73.
41. Derviş E. Oral antioksidanlar. *Dermatoz* 2011; 2: 263–7.
42. Jain D, Misra R, Kumar A, Jaiswal G. Levels of malondialdehyde and antioxidants in the blood of patients with vitiligo of age group 11-20 years. *Indian J Physiol Pharmacol* 2008; 52: 297–301.
43. Agrawal S. Comparison of oxidant-antioxidant status in patients with vitiligo and healthy population. *KUMJ* 2014; 12: 132-136.
44. Ines D, Sonia B, Riadh BM, et al. A comparative study of oxidant-antioxidant status in stable and active vitiligo patients. *Arch Dermatol Res* 2006; 298: 147-152.
45. Dell'Anna ML, Ottaviani M, Bellei B, et al. Membrane lipid defects are responsible for the generation of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells from vitiligo patients. *J Cell Physiol* 2010; 223: 187-193.
46. Karadag AS, Tatal E, Ertugrul DT. Insulin resistance is increased in patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 541-544.