

Artikel asli

HUBUNGAN RESISTENSI INSULIN DENGAN KADAR NITRIC OXIDE PADA OBESITAS ABDOMINAL

Heru Cahjono, Anak Agung Gde Budhiarta
Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK Unud/RSUP Sanglah, Denpasar

ABSTRACT

ASSOCIATION BETWEEN INSULIN RESISTANCE AND NITRIC OXIDE LEVELS AT THE ABDOMINAL OBESITY

Numerous studies that confirmed the important link between central obesity and endothelial dysfunction (ED) is further supported by the concept that insulin sensitivity is partly determined by the ability of endothelium to produce nitric oxide (NO). In this condition, HOMA-IR, the model which is a convenient means of evaluating insulin resistance has thus far been related to ED. Nitric oxide plays important physiological roles in the endothelium, where free radical NO is synthesized from the amino acid L-arginine by endothelial constitutive NO synthase (eNOS) and released. Endothelium-derived NO is a potent vasodilator as well as an inhibitor of platelet aggregation and adhesion, and is associated with the development of cardiovascular disease (CVD) in the presence of endothelial dysfunction (ED), which plays an early and prominent role in atherosclerotic plaque formation. We raised the question as to whether insulin resistance in the abdominal obesity group had association with NO levels contribute to affect endothelial dysfunction. Cross sectional study had been conducted during January until March 2007. The study involved 67 employees at Sanglah Hospital with abdominal obesity using criteria for Asian people (male WC ≥ 90 cm; female WC ≥ 80 cm). Serum concentrations of NO metabolites were evaluated through the measurement of metabolic end products, ie, nitrite and nitrate, using enzymatic catalysis coupled with Griess reaction, Serum concentration of insulin was measured by immunoassay method. Plasma glucose, cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglicerydes were determined by enzymatic procedure after overnight fast. The study involved 45 female and 25 male subjects, 23-56 years of age. Insulin resistance had association with waist circumference ($r=0,511$; $p < 0,01$) and there was no association between insulin resistance and NO titer ($r=0,054$; $p < 0,664$) but after adjusted with ESR 20-30 mm/h $r=-0,486$; $p < 0,048$. However, serum concentrations of NO did not have association with component of metabolic syndrome and neither did insulin resistance. The present data indicate there is no association between insulin resistance and NO levels except for ESR 20-30 mm/h. This possibility is due to low grade chronic inflammation role on the pathogenesis of endothelial dysfunction in obesity

Keywords: NO, obesity, insulin resistance

PENDAHULUAN

Saat ini diperkirakan terdapat 1 milyar orang dewasa dengan berat badan berlebih dan 300 juta diantaranya adalah obes.¹ Masalah obesitas tidak hanya

di kota besar saja, pada penelitian di Purworejo didapatkan prevalensi 13%,² sedangkan di Desa Sangsit didapatkan prevalensi obesitas 27,4%.³

Obesitas merupakan keadaan inflamasi kronik yang ditandai peningkatan CRP dan IL-6 dan adanya

inflamasi kronik akan mengakibatkan disfungsi endotel.⁵ Disfungsi endotel didefinisikan sebagai penurunan sintesis dan sekresi NO meskipun pada angiografi belum ditemukan penyakit.⁶ Adanya lemak viseral akan meningkatkan pelepasan asam lemak bebas ke dalam sistem porta sehingga hasil akhirnya jaringan mengalami resistensi insulin.^{7,8} Sekresi insulin puasa berhubungan dengan lemak viseral, dan tiap peningkatan insulin puasa sebesar 5%/tahun berhubungan dengan penambahan lemak viseral 1 cm²/tahun ($p < 0,05$).^{9,10}

Insulin melalui mekanisme phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway akan merangsang produksi NO oleh endotel sedangkan pada keadaan resistensi insulin terjadi insulin-mediated glucose transport yang tidak efektif dan gangguan produksi NO akibat defek PI3-K signaling namun jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK) masih berfungsi normal.¹¹ Insulin melalui jalur MAPK bersifat proaterogenik karena meningkatkan potensi *platelet-derived growth factor* (PDGF) sehingga terjadi proliferasi sel otot polos vaskular dan merangsang produksi PAI-1.¹¹

Dengan latar belakang diatas, dapat dirumuskan masalah yaitu apakah terdapat hubungan resistensi insulin dengan kadar NO sebagai salah satu petanda fungsi endotel pada obesitas abdominal.

BAHAN DAN CARA

Penelitian ini menggunakan rancangan studi potong lintang analitik pada 67 subyek penelitian laki-laki usia 18-59 tahun dengan lingkar pinggang ≥ 90 cm dan perempuan usia 18 tahun sampai sebelum mengalami menopause dengan lingkar pinggang ≥ 80 cm dan meyetujui *informed consent*. Kriteria eksklusi adalah penyakit jantung koroner, gagal jantung, gangguan fungsi ginjal, penyakit hati akut maupun kronis, penyakit paru obstruktif menahun, penyakit kelenjar tiroid, menderita penyakit peradangan akut dan

kronis, menderita DM, penyakit keganasan, penyakit autoimun, telah mengalami menopause, memakai dan bekas memakai obat kontrasepsi pil dan suntikan, obat pengganti hormon lain seperti estrogen, pasca histerektomi, obat penurun kadar lemak darah seperti statin dan fibrat, obat antihipertensi, obat golongan nitrat, obat hipoglikemi oral dan suntikan insulin.

Analisis data yang digunakan adalah deskriptif untuk menggambarkan distribusi frekuensi berbagai variabel yaitu usia, jenis kelamin, tekanan darah, berat badan, tinggi badan, lingkar pinggang, status merokok, kadar insulin puasa dan kadar NO. Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, digunakan untuk menguji apakah data penelitian berdistribusi normal atau tidak. Analisis korelasi Pearson dan Spearman digunakan untuk menilai hubungan antara 2 variabel dengan nilai $p < 0,05$ sebagai batas kemaknaan dan semua data dianalisis memakai perangkat lunak komputer. Keterbatasan penelitian ini adalah:

- a. Penelitian ini dengan cuplikan tidak terandomisasi, oleh karena itu perlu hati-hati untuk menarik generalisasi ke arah populasi.
- b. Hubungan sebab akibat antara variabel yang diteliti pada penelitian ini tidak sekuat bila penelitian dilakukan secara kohort atau eksperimental.
- c. Penentuan obesitas abdominal dengan menggunakan lingkar pinggang bukan merupakan baku emas seperti halnya MRI atau CT setinggi L3/L4.
- d. Ada bermacam-macam mediator yang ikut terlibat pada proses disfungsi endotel yang tidak bisa dikendalikan peneliti. Hal ini disebabkan oleh karena keterbatasan biaya sehingga mediator tersebut tidak diperiksa.
- e. Produsen NO dalam tubuh tidak hanya eNOS, namun juga nNOS dan iNOS.

HASIL

Variabel yang diperiksa pada penelitian ini adalah umur, jenis kelamin, tinggi badan, berat badan, IMT, lingkar pinggang, tekanan darah sistolik dan diastolik, kadar lemak darah (kolestrol total, trigliserida, kolesterol-HDL, kolesterol-LDL), kadar glukosa darah puasa, kadar insulin puasa, resistensi insulin (HOMA-IR) dan kadar NO. Selain itu diperiksa variabel lainnya untuk persyaratan inklusi dan eksklusi seperti WBC, Hb, SGOT, SGPT, kreatinin serum dan LED. Untuk mengetahui apakah variabel berdistribusi normal dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov (KS). Variabel yang berdistribusi normal disajikan dalam rerata (mean) \pm simpang baku (SB) dan variabel yang tidak berdistribusi normal disajikan dalam median dan rentang interkuartil (persentil 25 dan 75). Variabel yang berdistribusi normal dilakukan uji statistik parametrik sedangkan yang tidak berdistribusi normal dilakukan uji statistik nonparametrik yang sesuai.

Karakteristik subyek penelitian

Telah dilakukan pemeriksaan terhadap 67 subyek penelitian yang terdiri dari 22 laki-laki dan 45 perempuan, dengan usia antara 23-56 tahun, IMT 23,34-40,56 kg/m², lingkar pinggang 80-126 cm, tekanan darah sistolik 78-120 mm Hg, tekanan darah diastolik 45-84 mm Hg, LED 4-52 mm/jam, glukosa puasa 71-138 mg/dl, insulin 2,3-21 mIU/ml, kolesterol total 121-272 mg/dl, kolesterol LDL 65-199 mg/dl, kolesterol HDL 29-76 mg/dl, trigliserida 52-626 mg/dl, NO 20,91-97,71 mM/L, HOMA-IR 0,4-5,6 Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Karakteristik subyek penelitian (n=67)

Variabel	Rerata \pm SB atau Median (rentang interkuartil)	Uji K-S
Umur (th)	40,86 \pm 8,17	p >0,05
IMT (kg/m ²)	28,84 \pm 3,45	p >0,05
LP (cm)	89,4 \pm 8,84	p >0,05
TD sistolik (mm Hg)	96,57 \pm 12,16	p >0,05
TD diastolik (mm Hg)	64,17 \pm 8,53	p >0,05
LED (mm/jam)	22,33 \pm 12,76	p >0,05
Glukosa puasa (mg/dl)	91,73 \pm 12,35	p >0,05
Insulin (μ IU/ml)	8,37 \pm 4,21	p >0,05
Kol-total (mg/dl)	188,43 \pm 31,34	p >0,05
Kol-LDL (mg/dl)	124,19 \pm 26,99	p >0,05
Kol-HDL (mg/dl)	47,63 \pm 10,48	p >0,05
Trigliserida (mg/dl)	119 (91-168)	P=0,01*
Log trigliserida	4,86 \pm 0,54	p >0,05
NO (μ M/L)	46,84 \pm 19,59	p >0,05
HOMA-IR	1,92 \pm 1,0	p >0,05

Keterangan: * = distribusi data tidak normal; LP = lingkar pinggang; TD = tekanan darah; Kol = kolesterol; Log = logaritma

Berdasarkan kriteria sm berdasarkan idf hasil penelitian menunjukkan 17,6% (12) dengan glukosa puasa >100 mg/dl, 30% dengan trigliserida \geq 150 mg/dl, 50% (11) laki-laki dengan kolesterol hdl <40 mg/dl dan 46,7% (21) perempuan dengan kolesterol hdl <50 mg/dl. Berdasarkan tabel diatas terlihat bahwa variabel yang akan dianalisis terdistribusi normal kecuali pada variabel trigliserida dilakukan transformasi dalam bentuk logaritma sehingga dapat dilakukan uji statistik parametrik.

Hubungan antara lingk pinggang dan resistensi insulin

Pada penelitian ini didapatkan hubungan antara lingk pinggang dan resistensi insulin ($r=0,511$; $p=0,001$). Hasil analisis korelasi bivariat antara lingk pinggang dan resistensi insulin terdapat dalam tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Korelasi antara resistensi insulin dengan lp

Variabel	N	Resistensi Insulin		Keterangan
		r	p	
LP	67	0,511	0,001	B

Keterangan: LP = lingk pinggang; B = bermakna

Hubungan antara resistensi insulin dengan berbagai komponen SM

Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan berbagai komponen SM yang meliputi tekanan darah sistolik dan diastolik, kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan logaritma trigliserida. Hasil analisis korelasi bivariat antara resistensi insulin dengan berbagai komponen SM terdapat dalam tabel 3 berikut ini:

Tabel 3. Korelasi antara resistensi insulin dengan komponen SM

Variabel	Resistensi Insulin		Keterangan
	r	p	
TD sistolik	0,108	0,382	TB
TD diastolik	0,145	0,243	TB
Kol-total	0,120	0,335	TB
Kol-LDL	0,136	0,273	TB
Kol-HDL	-0,062	0,616	TB
Log trigliserida	0,142	0,253	TB

Keterangan: TD = tekanan darah; Kol = kolesterol; Log = logaritma; TB = tak bermakna;

Hubungan antara kadar NO dengan berbagai komponen SM

Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan antara kadar NO dengan berbagai komponen SM yang meliputi lingk pinggang, tekanan darah sistolik dan diastolik, kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan logaritma trigliserida. Hasil analisis korelasi bivariat antara kadar NO dengan berbagai komponen SM terdapat dalam tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Korelasi antara kadar NO dengan komponen SM

Variabel	Kadar NO		Keterangan
	r	p	
LP	-0,092	0,457	TB
TD sistolik	-0,038	0,762	TB
TD diastolik	-0,060	0,632	TB
Kol-total	-0,040	0,748	TB
Kol-LDL	-0,039	0,755	TB
Kol-HDL	-0,141	0,256	TB
Log trigliserida	0,079	0,525	TB

Keterangan: LP = lingk pinggang; TD = tekanan darah; Kol = kolesterol; Log = logaritma; TB = tak bermakna

Hubungan antara resistensi insulin dan kadar NO

Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO. Hasil analisis korelasi bivariat antara resistensi insulin dan kadar NO terdapat dalam tabel 5 berikut ini.

Tabel 5. Korelasi antara resistensi insulin dengan kadar NO

Variabel	N	Kadar NO		Keterangan
		r	p	
Resistensi Insulin	67	0,054	0,664	TB

Keterangan: TB = tak bermakna

Batasan LED terhadap suatu kejadian kardiovaskular belum ada batasan baku seperti halnya pada CRP, namun penelitian ini merujuk pada penelitian yang dilakukan Erikssen, *et al.*¹³ terhadap 2.014 responden laki-laki sehat didapatkan peningkatan kejadian kardiovaskular hingga dua kali lipat pada LED 15-29 mm/jam (kuartil ketiga), selain itu batasan LED 20-30 mm/jam berada dalam pengelompokan kuartil ketiga.¹³ Pada penelitian ini didapatkan korelasi negatif yang bermakna antara resistensi insulin dengan kadar NO ($r=-0,486$; $p < 0,05$) pada LED 20-30 mm/jam sedangkan pada LED < 20 mm/jam dan LED > 30 mm/jam tidak didapatkan hubungan. Hasil analisis korelasi bivariat selengkapnya terdapat dalam tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Korelasi antara resistensi insulin dengan kadar NO pada beberapa subkelompok LED

Variabel	Subkelompok	N	KadarNO		Keterangan
			r	p	
Resistensi Insulin	LED 0 - < 20 mm/jam	36	0,062	0,719	TB
Resistensi Insulin	LED 20 - 30 mm/jam	17	-0,486	0,048	B
Resistensi Insulin	LED > 30 mm/jam	14	0,041	0,888	TB

Keterangan: B = bermakna; TB = tak bermakna

PEMBAHASAN

Hubungan antara obesitas abdominal dan resistensi insulin

Obesitas abdominal dapat dinilai dengan menggunakan lingkar pinggang, menurut IDF tahun 2006 untuk ras mongoloid menggunakan batasan > 90 cm untuk laki-laki dan > 80 cm untuk perempuan.¹⁴ Metode yang lebih baku dengan menggunakan MRI, CT setinggi L3/L4, atau *dual-energy x-ray absorptiometry* (DEXA) namun teknik dan caranya sulit untuk dipakai pada praktek sehari-hari.¹

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa lingkar pinggang berhubungan dengan resistensi insulin yang

dihitung dengan menggunakan HOMA-IR ($r=0,511$; $p < 0,01$). Hasil penelitian hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti lain yang terdapat dalam tabel 6 berikut ini.

Tabel 7. Hubungan antara obesitas dengan resistensi insulin

Peneliti	Jenis	Subyek	IMT	Lingkar pinggang
	Penelitian			
Ashley, <i>et al.</i> 2002 ¹⁵	Potong lintang	41 remaja laki-laki	$r=0,32$; $p < 0,05$	$r=0,42$; $p < 0,05$
Cleland, <i>et al.</i> 2000 ¹⁶	Kasus kontrol	9 DM tidak terkontrol, 9 hipertensi esensial, 9 subyek sehat	$r=0,67$; $p < 0,001$	
Schindler, <i>et al.</i> 2006 ¹⁷	Kasus kontrol	12 kontrol ($20 \leq \text{IMT} < 25$), 21 berat badan berlebih ($25 \leq \text{IMT} < 30$), 32 obes ($\text{IMT} > 30$)	$r=0,60$; $p < 0,001$	

Hubungan tersebut dapat dijelaskan bahwa pada obesitas terjadi pelepasan asam lemak bebas kedalam sirkulasi.¹⁸ Asam lemak bebas berasal dari lipolisis trigliserida jaringan adiposa. Makin banyak jaringan adiposa maka asam lemak bebas yang dilepaskan juga makin meningkat. Pada obesitas tetap terjadi pelepasan asam lemak bebas berlebih, meskipun kadar insulin juga meningkat. Hal ini disebabkan meski kadar insulin tinggi dapat menekan lipolisis jaringan adiposa namun tetap tidak mampu menekan pelepasan asam lemak hingga mencapai normal pada obesitas. Asam lemak bebas merupakan sumber utama energi pada keadaan puasa, pada obesitas masuknya asam lemak bebas ke jaringan melebihi dari kebutuhan. Masuknya asam lemak bebas berlebih kedalam otot mengakibatkan resistensi insulin. Mekanisme yang lengkap mengenai peningkatan asam lemak dalam otot sehingga berakibat resistensi insulin masih belum dimengerti, diduga bahwa masuknya asam lemak bebas menghambat oksidasi glukosa.¹⁹ Penelitian yang dilakukan Shulman (2000) menunjukkan bahwa

pada otot terjadi peningkatan kadar diasilgliserol yang akan merangsang fosforilasi serin reseptor insulin dan akhirnya akan menghambat kerja insulin normal. Resistensi insulin di otot merupakan faktor predisposisi hiperglikemia, yang akhirnya akan muncul gejala klinik pada orang yang mengalami defek sekresi insulin.²⁰

Saat ini masih menjadi perdebatan apakah inflamasi merupakan penghubung obesitas dengan resistensi insulin atau respon inflamasi terjadi setelah terjadi resistensi insulin. Bukti adanya peran inflamasi dibuktikan dengan infus protein inflamasi atau lipid dapat menyebabkan resistensi insulin pada hewan coba dan penghilangan mediator inflamasi seperti TNF- α dapat memperbaiki sensitifitas insulin pada tikus obes.²¹ Hubungan antara insulin dan inflamasi kronik bersifat timbal balik, adanya inflamasi kronik akan menurunkan kerja insulin dan adanya resistensi insulin akan memperburuk keadaan inflamasi.²²

Hubungan antara resistensi insulin dan kadar NO dengan berbagai komponen SM

a. Hubungan antara resistensi insulin dengan berbagai komponen SM

Menurut Polonsky, *et al.*²³ dan Jones, *et al.*²⁴ tingkat sekresi insulin basal dan 24 jam akan meningkat 3-4 kali lipat pada subyek obes dan sangat berhubungan dengan IMT dan pada penelitian ini tidak dijumpai korelasi yang bermakna antara tekanan darah sistolik, diastolik, kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan logaritma trigliserida ($r=0,382$; $r=0,243$; $r=0,335$; $r=0,273$; $r=0,616$; $r=0,253$ dengan $p > 0,05$).

Pada penelitian ini tidak dapat membuktikan adanya hubungan resistensi insulin dengan komponen SM oleh karena adanya koefisien variasi intra subyek hingga sebesar 10,3% pada pengambilan sampel tunggal dibandingkan dengan 5,8% pada pengambilan sampel sebanyak 3 kali dengan interval 5 menit kemudian dihitung reratanya sesuai dengan sekresi insulin yang

pulsatil. Meski demikian pemeriksaan sampel tunggal telah dipakai pada >150 penelitian epidemiologi.²⁵ Berikut adalah penelitian yang menghubungkan resistensi insulin dengan komponen SM.

Tabel 8. Hubungan antara resistensi insulin dengan komponen SM

Peneliti	Jenis Penelitian	Subyek	HDL	Tg
Gower, <i>et al.</i> (1999) ²⁶	Kasus kontrol	38 Afrika-Amerika ($\sigma:\varphi=21:17$)	$r=0,08$; $p>0,05$	$r=-0,29$; $p>0,05$
Gower, <i>et al.</i> (1999) ²⁶	Kasus kontrol	23 Kaukasoid ($\sigma:\varphi=14:9$)	$r=0,24$; $p>0,05$	$r=-0,34$; $p>0,05$
Schindler, <i>et al.</i> (2006) ¹⁷	Kasus kontrol	7.212 kontrol (20 \leq IMT <25), 21 berat badan berlebih (25 \leq IMT <30), 32 obes (IMT >30)	$r=-0,33$; $p<0,01$	

b. Hubungan antara kadar NO dengan berbagai komponen SM

Kadar NO tidak berkorelasi dengan lingkaran pinggang, tekanan darah sistolik dan diastolik, kadar insulin, kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan logaritma trigliserida ($r=-0,92$; $r=-0,38$; $r=-0,60$; $r=-0,67$; $r=-0,40$; $r=-0,39$; $r=-1,41$; $r=0,79$ dengan $p > 0,05$). Hasil penelitian ini mirip dengan yang dilaporkan oleh Ferlito dan Gallina²⁷ bahwa pada kelompok diabetes dengan berat badan berlebih dan peningkatan tekanan darah tidak mengalami peningkatan produksi NO dibandingkan dengan kontrol sehat meskipun populasi subyek penelitian ini adalah DM tipe 1 dan 2.27 Sedangkan Andersson, *et al.*²⁸ tidak menemukan perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan perempuan obes yang telah mengalami menopause, demikian pula pada penelitian yang dilakukan Kondo, *et al.*²⁹ tidak menemukan perbedaan kadar NO pada batas trigliserida 150 mg/dl dan lingkaran pinggang 85 cm pada laki-laki maupun 90 cm pada perempuan.²⁹ Penelitian

yang dilakukan oleh Choi, et al.³⁰ tidak menemukan perbedaan profil lipid yang bermakna antara kelompok subyek dengan kadar NO <20 µM/l dengan ≥80 µM/l. Berikut adalah hasil penelitian yang menghubungkan antara kadar NO dengan komponen SM:

Tabel 9. Hubungan antara kadar NO dengan komponen SM

Peneliti	Jenis Penelitian	Subyek	Kolesterol total	IMT	Lingkar pinggang	Tekanan darah
Choi, et al. (2001) ³⁰	Potong lintang	41 DM tipe 2 tidak terkontrol	r=0,32; p<0,05	p r=-0,40; p=0,009	r=-0,41; p=0,008	
Jeerooburkhan, et al. (2001) ³²	Potong lintang	3 laki-laki	3.052	r=0,02; p=0,64		r=-0,02; p>0,05

Peningkatan kolesterol serum berhubungan dengan terganggunya vasodilatasi sel endotel^{33,34} tetapi pada penelitian ini tidak dapat membuktikan adanya hubungan tersebut, penyebabnya diduga bahwa kolesterol mempengaruhi fungsi endotel tidak melalui sintesis NO tetapi melalui sistem dilatasi endotel yang lain atau dengan peningkatan radikal bebas oksidatif. Kemungkinan pengaruh diet nitrat pada penelitian ini sudah dapat disingkirkan karena subyek puasa 12 jam sebelumnya.³⁴ Pada penelitian ini juga tidak menemukan hubungan antara tekanan darah dengan kadar NO, temuan ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Node, et al.³⁴ pada subyek bangsa Jepang dengan hipertensi esensial. Hipertensi diketahui mampu menekan endothelium-dependent vasodilation³⁵ namun pada penelitian Cockroft, et al.³⁷ tidak terbukti, hal ini menunjukkan bahwa pengaruh tekanan darah terhadap fungsi endotel bervariasi dan bisa tergantung atau tidak tergantung sintesis NO oleh sel endotel.

c. Hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO

Insulin merupakan vasodilator potensi sedang dan dengan diperantarai oleh PI3-K *pathway* merangsang produksi NO di sel endotel dan sebagai perantara insulin untuk menstimulasi transpor glukosa ke jaringan termasuk jaringan otot dan jaringan lemak. Pada keadaan resistensi insulin terjadi *insulin-mediated glucose transport* yang tidak efektif dan gangguan produksi NO akibat defek PI3-K *signaling*, namun jalur MAPK masih berfungsi normal.¹¹ Insulin melalui jalur MAPK bersifat proaterogenik karena meningkatkan potensi *platelet derived growth factor* (PDGF) sehingga terjadi proliferasi sel otot polos vaskular dan merangsang produksi PAI-1.¹¹ Manifestasi awal terjadinya peningkatan stres oksidan vaskular ditandai dengan penurunan ketersediaan NO akibat penghambatan terhadap eNOS dan katabolisme cepat NO oleh *reactive oxygen species* (ROS) menjadi peroksinitrit dan hidrogen peroksida yang dapat meningkatkan stres oksidatif vaskular. Akibatnya terjadi kelainan aktifitas vasomotor, pembentukan prokoagulan pada permukaan endotel, inflamasi dan pembentukan plak.³⁸ Pengukuran kadar NO adalah sulit karena cepat teroksidasi,³⁹⁻⁴¹ namun demikian beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengukuran kadar NO setelah puasa semalaman (12-14 jam) mencerminkan produksi NO dalam keadaan basal. Diet yang mengandung nitrit/nitrat dapat menjadi faktor pengganggu yang potensial, namun hal ini sudah dapat disingkirkan dengan subyek puasa semalaman.^{40,42} Jungersten et al.⁴³ berpendapat bahwa asupan makanan mengandung nitrat sebaiknya dibatasi minimal 48 jam, namun peneliti lain berpendapat bahwa pengaruh nitrat dalam diet sudah dapat disingkirkan oleh karena akan dieliminasi dari darah melalui urin dalam 12-16 jam.^{40,42}

Perlu diperhatikan bahwa pembatasan asupan makanan akan membuat kondisi yang tidak mencerminkan keadaan sebenarnya dan tidak

menggambarkan kondisi fisiologi aterogenesis normal yang merupakan proses kronik dan sudah dimulai sejak awal kehidupan. Pada penelitian Wang, *et al.*⁴¹ disimpulkan bahwa asupan makan tidak berpengaruh terhadap variasi kadar NO plasma.

Kelemahan pengukuran kadar NO pada penelitian ini adalah tidak dapat membedakan produksi NO dari eNOS atau iNOS dengan reaksi Griess.⁴⁴ Menurut Elizalde, *et al.*⁴⁵ disimpulkan bahwa jaringan adiposa subkutan manusia memiliki NOS yang terdiri dari eNOS dan iNOS, bukan nNOS. Pada analisis genetik yang dilakukan oleh Wang, *et al.*⁴¹ ditemukan bahwa 30% varian kadar NO setelah puasa 12 jam disebabkan oleh gen (rasio odds= 16,06; $p < 0,001$) dan ditemukan beda rerata kadar NO antara genotip eNOS4A dan eNOS4a ($64,9 \pm 7,8$ mM/l dan $30,21 \pm 3,1$ mM/l; $p < 0,001$) namun pada penelitian ini tidak dapat diukur mengenai pengaruh genotip terhadap kadar NO masing-masing subyek.

Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO ($r = -0,050$, $p = 0,689$) bila tanpa memperhitungkan faktor lain, demikian pula penelitian yang dilakukan Mather, *et al.*⁴⁶ dengan hasil tidak ada perbedaan fungsi endotel meskipun terjadi resistensi insulin pada sindrom polikistik ovarium.⁴⁶ Menurut Piatti, *et al.*⁴⁷ diduga oleh karena adanya variasi respon endotel terhadap insulin, defek sintesis NO, peningkatan produksi NO₂-/NO₃- oleh jaringan yang tidak sensitif terhadap insulin (hepar dan ginjal) dan adanya peningkatan laju katabolik c-GMP, namun dalam penelitian ini belum bisa dibuktikan faktor yang mempengaruhi hasil penelitian. Selain itu NO merupakan hasil produksi endotel yang bersifat parakrin (berasal dari endotel pembuluh darah) dan parakrin (diproduksi dalam serabut otot)⁴⁸ dan adanya kemungkinan bahwa kadar NO ekuivalen dengan kadar endotelin dalam darah merupakan indikator perubahan dalam hal sintesis dan sekresi.⁴⁹ Penyebab lain adalah gen eNOS bersifat polimorfik yang penting dalam hal ekspresi gen dan aktifitas enzim.⁵⁰

Peran inflamasi terhadap hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO

Laju Endap Darah (LED) merupakan salah satu pengukuran tidak langsung terhadap protein inflamasi fase akut selain CRP. LED dipengaruhi oleh fibrinogen, IgM, α 2-makroglobulin. Perubahan protein inflamasi menunjukkan keberadaan dan intensitas inflamasi.⁵¹ Kelemahan pengukuran LED adalah perubahannya lebih lambat dibandingkan dengan CRP dan dipengaruhi oleh usia. LED tidak dipengaruhi merokok, kolesterol serum total, maupun jenis kelamin.⁵² Pada usia < 60 tahun batasan LED normal laki-laki dan perempuan masing-masing 15 mm/jam dan 20 mm/jam atau dengan formula $\text{usia}/2$ pada laki-laki dan $(\text{usia}+10)/2$ pada perempuan.⁵³ Obesitas merupakan keadaan inflamasi kronik subklinis,⁵⁴ yang ditandai peningkatan CRP, 4,19 IL-6, 4 fibrinogen⁵⁵ maupun peningkatan sintesis TNF- α oleh jaringan adiposa.⁵⁶ Adanya inflamasi kronik akan mengakibatkan disfungsi endotel⁵ dan pada penelitian ini dilakukan dengan mengukur kadar NO. Pada keadaan resistensi insulin terdapat variasi respon kadar NO yang juga dapat dipengaruhi oleh variasi polimorfisme genetik yang menghasilkan TNF- α dan IL-6.²¹ Jadi adanya polimorfisme akan mempengaruhi kadar protein inflamasi basal dan respon inflamasi.⁵⁷

Berdasarkan telaah kepustakaan sampai saat ini belum ditemukan pembahasan mengenai batasan LED yang berhubungan dengan inflamasi kronik pada obes maka pembahasan berikutnya diasumsikan LED hampir sama dengan hasil penelitian CRP, hal ini didukung oleh penelitian dengan hasil log LED berhubungan dengan log CRP ($r = 0,27$; $p = 0,013$),⁵⁸ sedangkan penelitian Samocha-Bonet, *et al.*⁵⁹ mendapatkan hubungan $r = 0,55$; $p < 0,01$. Fibrinogen sebagai salah satu protein yang terukur dalam LED berdasarkan penelitian Fibrinogen Studies Collaboration⁶⁰ berhubungan dengan log CRP $r = 0,47$; $p < 0,05$. Produksi protein fase akut CRP oleh hepar secara dominan dipengaruhi oleh IL-6, TNF- α

dan IL-1. Selain itu CRP mempunyai waktu paruh 19 jam dan dapat menetap hingga 2 minggu. Kadar protein fase akut CRP >3 mg/l disepakati sebagai batas inflamasi pada obes, sedangkan pada CRP >10 mg/l tidak dapat digunakan untuk menilai risiko kardiovaskular oleh karena disebabkan proses inflamasi aktif yang lain seperti trauma atau infeksi.^{61,62} Pada orang normal hanya 10% yang mempunyai CRP >3 mg/l.⁵⁶ CRP berhubungan dengan penurunan mRNA dan protein yang diperlukan eNOS, dan pada CRP >10 mg/l menunjukkan adanya peningkatan iNOS.⁶¹

Batasan LED >21 mm/jam dilaporkan berhubungan dengan penyakit kardiovaskular dan pada penelitian ini didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO pada subkelompok LED 20-30 mm/jam dengan $r = -0,486$; $p = 0,048$. Hasil ini mirip dengan hasil penelitian Erikssen, *et al.*¹³ terhadap 2.014 responden laki-laki sehat didapatkan peningkatan kejadian kardiovaskular hingga dua kali lipat pada LED 15-29 mm/jam (kuartil ketiga) dibandingkan dengan LED <15 mm/jam. Pada penelitian ini batasan LED 20-30 mm/jam juga berada dalam pengelompokan kuartil ketiga. Penelitian lain yang dilakukan oleh Piatti, *et al.*⁴⁷ pada 62 subyek didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO adalah $r = -0,35$; $p < 0,01$. Penelitian oleh de Jong, *et al.*⁶³ dengan menggunakan infus sodium nitroprusside melihat respon vasodilatasi endotel kulit dengan iontoforesis didapatkan hubungan dengan sensitifitas insulin $r = 0,58$; $p < 0,05$. Adanya hubungan antara resistensi insulin dengan NO antara lain oleh karena penurunan produksi NO oleh endotel dalam keadaan basal dan akibat penurunan sensitifitas terhadap insulin sehingga terjadi penurunan insulin-mediated vasodilatation di otot rangka. Data dalam penelitian ini tidak dapat mengetahui sebab dari penurunan produksi NO akibat resistensi insulin.

Pendapat lain dikemukakan oleh Stuhlinger, *et al.*⁶⁴ bahwa pada resistensi insulin terjadi peningkatan ADMA yang beredar dalam darah. ADMA bekerja

sebagai penghambat kompetitif eNOS, dan adanya enzim *dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH) akan meningkatkan metabolisme ADMA sedangkan pada resistensi insulin terjadi penurunan kadar DDAH dan peningkatan aktifitas stres oksidatif.⁶⁵ Pada hewan coba tikus DM tipe 2 peningkatan kadar ADMA berhubungan dengan penurunan aktifitas DDAH.⁶⁶

Pada LED <20 mm/jam resistensi insulin tidak berhubungan dengan kadar NO, hal ini dapat disebabkan oleh karena pada kondisi normal oksihemoglobin dalam eritrosit dengan cepat segera menetralkan NO dengan membentuk methemoglobin dan nitrat, sedangkan reagen Griess tidak dapat mendeteksi methemoglobin.⁶⁷ Pada LED >30 mm/jam juga tidak didapatkan hubungan antara resistensi insulin dengan kadar NO, hal ini menurut Dallaire, *et al.*⁶¹ dan Jialal, *et al.*⁶⁸ pada kondisi tersebut produksi NO didominasi oleh iNOS. Ekspresi iNOS dipicu oleh sitokin proinflamasi, namun demikian mekanisme yang terjadi masih belum jelas. Terdapat bukti bahwa produksi NO berlebih oleh iNOS secara kronik dapat mengakibatkan resistensi insulin di jaringan perifer.⁶⁹

Meskipun mekanisme yang mendasari disfungsi endotel adalah eNOS dan NO namun demikian masih terdapat hal lain yang dapat menurunkan bioaktifitas endotel dalam memproduksi NO karena tidak ada mekanisme tunggal yang dapat menjelaskan disfungsi endotel.⁷⁰ Aktifitas eNOS dipengaruhi juga oleh *shear stress*, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TNF α , LDL teroksidasi, polimorfisme, substrat arginin dan adanya ADMA yang merupakan penghambat endogen eNOS.⁵⁰

Hasil penelitian ini mendukung peran insulin dalam mempertahankan fungsi endotel pembuluh darah dan adanya kelainan aksi insulin dapat menyebabkan disfungsi endotel seperti pada resistensi insulin. Vasodilatasi yang diperantarai insulin berhubungan dengan sensitifitas insulin dan fungsi endotel basal, oleh

karena itu patut diduga bahwa aksi insulin pada pembuluh darah tidak bekerja langsung. Nampaknya insulin bukan sebagai vasodilator yang utama secara fisiologis namun berperan dalam mempertahankan rangsangan terhadap endotel untuk memproduksi NO, mempertahankan fungsi dan integritas endotel.¹⁵ Bukti yang mendukung adalah bahwa sel endotel mempunyai reseptor insulin (in vitro), insulin merangsang pelepasan NO dari sel endotel yang dikultur.⁷¹ Bukti kedua adalah gangguan vasodilatasi endotel pada tikus berhubungan dengan reseptor insulin yang menurun.⁷² Bukti ketiga adalah pendapat Jiang, *et al.* bahwa terdapat kelainan komplek pada jalur sinyal insulin terhadap jaringan pembuluh darah tikus Zucker yang mengalami resistensi insulin.

KESIMPULAN

Dari hasil-hasil dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa resistensi insulin tidak berhubungan dengan kadar NO kecuali pada subkelompok LED 20-30 mm/jam, resistensi insulin berhubungan dengan lingkaran pinggang dan kadar NO tidak berhubungan dengan komponen SM.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai seberapa besar peran inflamasi terhadap NO pada subyek obes dan subyek normal atau subyek obes dengan subyek yang sudah terjadi DM atau kelainan kardiovaskular dengan parameter yang lebih peka yaitu dengan CRP.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi kadar NO selain protein inflamasi pada manusia.

DAFTAR RUJUKAN

1. WHO. The World Health report 2002-reducing risks, promoting healthy life. France: Sasag; 2002.
2. Nawi Ng, Stenlund H, Bonita R, Hakimi M, Wall S, Weinehall L, 2006. Preventable risk factors for noncommunicable diseases in rural indonesia: prevalence study using WHO STEPS approach. Bulletin of the World Health Organization 84:305-13.
3. Suastika K, Budhiarta AAG, Sutanegara IN, Aryana IGPS, Saraswati IMR, Gotera W, et al. Epidemiology study of metabolic syndrome in rural population in Bali. International Journal of Obesity 2004;28:s55.
4. Ritchie SA, Ewart MA, Perry CG, Connell JMC, Salt IP. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. Clinical Science 2004;107:519-32.
5. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. Circulation 2003;108:2054-9.
6. Liao JK. Endothelium and acute coronary syndrome. Clin Chem 1998;44(8):1799-808.
7. Williamson JR, Kreisberg RA, Felts PW. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. Proc Natl Acad Sci USA 1966;56:247-54.
8. Eckel R, Grundy S. Insensitivity to insulin and obesity: the underlying cause. Diabetes Voice 2006;51:28-30.
9. Huang TK, Johnson MS, Gower BA, Goran MI. Effect of changes in fat distribution on the rates of change of insulin response in children. Obes Res 2002;10:978-84.

10. Bruns CM and Kemnitz JW. Sex hormones, insulin sensitivity, and diabetes mellitus. *ILAR journal* 2004;45(2):160-9.
11. Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR- γ -a new approach to the macrovascular complication of diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:392-7.
12. Brownlee M, Aiello LP, Friedman E, Vinik AI, Nesto, Boulton AJM. Complication of diabetes mellitus. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Buse JB, Polonsky KS, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.p.1509-83.
13. Erikssen G, Liestol K, Bjornholt JV, Stormorken H, Thaulow E, Erikssen J. Erythrocyte sedimentation rate: a possible marker of atherosclerosis and strong predictor of coronary heart disease mortality. *European Heart Journal* 2000;21:1614-20.
14. Zimmet P dan Alberti G. The IDF definition: why we need a global consensus. *Diabetes Voice* 2006;51:11-4.
15. Ashley MA, Buckley AJ, Criss AL, Ward JA, Kemp A, Garnett S, et al. Familial, anthropometric and metabolic associations of intramyocellular lipid levels in prepubertal males. *Pediatr Res* 2002;51:81-6.
16. Cleland SJ, Petrie JR, Small M, Elliott HL, Connell JMC. Insulin action is associated with endothelial function in hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension* 2000;35(1):507-11.
17. Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, Facta AD, Kreissl MC, Zhang XL. Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(6):1188-95.
18. Heptulla R, Smitten A, Teague B, Tamborlane WV, Ma YZ, Caprio S. Temporal patterns of circulating leptin levels in lean and obese adolescents: relationships to insulin, growth hormone, and free fatty acids rhythmicity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:90-6.
19. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2595-600.
20. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171-6.
21. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-9.
22. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine Reviews* 2003;24(3):278-301.
23. Polonsky K, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988;81:435-41.
24. Jones CN, Pei D, Staris P, Kenneth S, Polonsky YD, Chen I, Reavenet GM. Alterations in the glucose stimulated insulin secretory dose-response curve and in insulin clearance in nondiabetic insulin-resistant individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1834-8.
25. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modelling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-95.
26. Gower BA, Nagy TR, Goran MI. Visceral fat, insulin sensitivity, and lipids in prepubertal children. *Diabetes* 1999;48:1515-21.

27. Ferlito S, Gallina M. Nitrite plasma levels in type 1 and 2 diabetics with and without complications. *Minerva Endocrinol* 1999;24:117-21.
28. Andersson B, Wikstrand J, Ljung T, Bjork S, Wennmalm A, Bjorntorp P. Urinary albumin excretion and heart rate variability in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:399-405.
29. Kondo T, Ueyama J, Imai R, Suzuki K, Ito Y. Association of abdominal circumference with serum nitric oxide concentration in healthy population. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2006;11:321-5.
30. Choi JW, Pai SH, Kim SK, Ito M, Park CS, Cha YN. Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese human. *Clin Chem* 2001;47:1106-9.
31. Choi JW, Pai SH, Kim SK, Ito M, Park CS, Cha YN. Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese human. *Clin Chem* 2001;47:1106-9.
32. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension* 2001;38:1054-61.
33. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR, Brett SE, Ritter JM. Sex differences in endothelial function in normal and hypercholesterolaemic subjects. *Lancet* 1994;344:305-6.
34. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1997;30:405-8.
35. Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial ng-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 1992;10:1025-31.
36. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1994;330:1036-40.
37. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 1997;349:837-42.
38. Cohn JN, Quyyumi AA, Hollenberg NK, Jamerson KA. Surrogate markers for cardiovascular disease - functional markers. *Circulation* 2004;109(suppl IV):IV31-46.
39. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-6.
40. Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate: a 2-year follow-up study. *Hypertension* 1995;25:848-53.
41. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Blangero J, Almasy L, et al. Genetic contribution of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level. *Arteriosler Thromb Vasc Biology* 1997;17:3147-53.
42. Hibbs JB Jr, Westenfeldeer C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, et al. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992;89:867-77.
43. Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analysis of kinetics and

- confounding factors. *Clin Physiol* 1996;16:369-79.
44. Henningsson R, Salehi A, Lundquist I. Role of nitric oxide synthase isoforms in glucose-stimulated insulin release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:296-304.
 45. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 2000;41:1244-51.
 46. Mather KJ, Verma S, Corenblum B, Anderson TJ. normal endothelial function despite insulin resistance in healthy women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1851-6.
 47. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, Valsecchi G, Van Phan C, Costa S et al. Alterations in nitric oxide/cyclic-gmp pathway in nondiabetic siblings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 2416-20.
 48. Kingwell BA, Formosa M, Muhlmann M, Bradley SJ, McConell GK. Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. *Diabetes* 2002;51:2572-80.
 49. Kurita A, Matsui T, Ishizuka T, Takase B, Satomura K. Significance of plasma nitric oxide/ endothelial-1 ratio for prediction of coronary artery disease. *Angiology* 2005;56:259-64.
 50. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:216-29.
 51. Epstein FH, Gabay C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-54.
 52. Natali A, L'abbate A, Ferrannini E. Erythrocyte sedimentation rate, coronary atherosclerosis, and cardiac mortality. *European Heart Journal* 2003;24:639-48.
 53. Ravel R. *Clinical laboratory medicine: clinical applications of laboratory data*. 6th ed. New York: Mosby; 1995.
 54. Caballero AE. endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity Research* 2003;11(11): 278-89
 55. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
 56. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.
 57. Hirschfield GM, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJ Med* 2003;96:793-807.
 58. Lopez-Bermejo A, Hernandez-Aguado L, Jaririn Vera I, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R, et al. Sex-specific, independent associations of insulin resistance with erythrocyte sedimentation rate in apparently healthy subjects. *Thromb Haemos* 2007;97:240-4.
 59. Samocha-Bonet D, Lichtenberg D, Tomer A, Deutsch V, Mardi T, Goldin Y, et al. Enhanced erythrocyte adhesiveness/aggregation in obesity corresponds to low-grade inflammation. *Obesity Research* 2003;11:403-7.
 60. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality - an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1799-809.
 61. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-Reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004;44:6-11.
 62. Nystrom T. C-reactive protein: a marker or a player. *Clinical Science* 2007;113:79-81.
 63. Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, Elliott HL, Connell JMC. Endothelial nitric oxide production and

- insulin sensitivity – a physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 1996; 93:1331-3
64. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002;287:1420-6.
65. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 2001;8:679–83
66. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002;106:987–92
67. Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA. Nitric oxide regulation of free radical and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1707-15.
68. Dallaire P, Marette A. Obesity-linked insulin resistance: is nitric oxide the missing link. *Canadian Journal of Diabetes* 2004;28(1):59-66.
69. Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest* 1997;100:290-5.
70. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clinical Medicine & Research* 2006;4(1):53-65.
71. Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. *J Clin Invest* 1996;98:894-8.
72. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, et al. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest* 1998;101:1784-8.
73. Jiang ZY, Lin Y-W, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1999;104:447-57.
-