

PENURUNAN SINTESIS NITRIC OXIDE PADA KULTUR HUVECs DALAM KONDISI HIPERGLIKEMIA AKUT

DECREASING NITRIC OXIDE SYNTHESIS IN HUVECS CULTURE WITH ACUTE HYPERGLYCEMIA CONDITIONS

I Putu Dedy Arjita

Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Al-Azhar, Mataram, Nusa Tenggara Barat
Korespondensi: I Putu Dedy Arjita. Email: ipdedyarjita@unizar.ac.id, iputudedyarjita@gmail.com

ABSTRAK

Diabetes mellitus merupakan penyakit metabolik dengan hiperglikemia yang cenderung mengakibatkan disfungsi sel endotel, akibat adanya mekanisme sintesis nitric oxide (NO). Penelitian ini bertujuan untuk mengukur produksi NO dari kultur Human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) yang terpapar glukosa pada beberapa variasi konsentrasi dengan menggunakan teknik bioassay. Penelitian ini menggunakan desain Randomized Control Trial (RCT) 3 kelompok. Kultur HUVECs yang dipaparkan glukosa selama 3 hari. Kelompoknya yaitu kelompok normal (glukosa 5 mM), keadaan hiperglikemi akut dengan variasi glukosa 22mM, dan glukosa 33 mM. Produksi NO diukur dengan membandingkan efek relaksasi pemberian larutan HUVECs terpapar glukosa pada aorta marmut pra-kontraksi fenilefrin (10^{-6} M) dengan efek isosorbid dinitrat pada aorta marmut pra-kontraksi fenilefrin. Kontraktilitas dicatat dengan menggunakan Mc Lab Computer. Penurunan sintesis NO pada kultur HUVECs terendah terjadi pada perlakuan dengan pemaparan konsentrasi glukosa tertinggi (33 mM) dengan nilai rata-rata $0.17 \times 10^{-7} \pm 0.09 \times 10^{-7}$ dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ada keterkaitan antara kondisi hiperglikemia akut dengan penurunan kultur HUVECs untuk mensintesis NO.

Kata Kunci: Nitric Oxide, HUVECs, Hiperglikemia Akut

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disease with hyperglycemia that tends to cause endothelial cell dysfunction, due to the mechanism of decreasing nitric oxide (NO) synthesis. This study aimed to measure NO production from human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) cultures exposed to glucose at various concentrations using bioassay techniques. This study used a 3 group Randomized Control Trial (RCT) design. Culture of HUVECs exposed to glucose for 3 days. The groups were the normal group (glucose 5 mM), acute hyperglycemia with variations in glucose 22 mM, and glucose 33 mM. NO production was measured by comparing the relaxing effect of glucose-exposed HUVECs solution on the aorta of pre-contracted phenylephrine guinea pigs (10^{-6} M) with the effect of isosorbide dinitrate on the aorta of pre-contracted phenylephrine guinea pigs. Contractility was recorded using a Mc Lab Computer. The lowest reduction in NO synthesis in HUVECs culture occurred in the treatment with the highest glucose concentration exposure (33 mM) with an average value of $0.17 \times 10^{-7} \pm 0.09 \times 10^{-7}$ with a significance value < 0.05 . So it can be concluded that there was a relationship between acute hyperglycaemia with decreased NO synthesis in HUVECs culture.

Keywords: Nitric Oxide, HUVECs, Acute Hyperglycemia

How To Cite: Arjita, I. (2022). PENURUNAN SINTESIS NITRIC OXIDE PADA KULTUR HUVECs DALAM KONDISI HIPERGLIKEMIA AKUT. Biomedika, 14(1), 1-9. doi:<https://doi.org/10.23917/biomedika.v14i1.13279>

DOI: <https://doi.org/10.23917/biomedika.v14i1.13279>

PENDAHULUAN

World Health Organization (WHO) telah melaporkan bahwa ada sekitar 422 juta orang di seluruh dunia menderita diabetes mellitus (DM), mayoritas penderita tinggal di negara berpenghasilan rendah dan menengah, dan 1,6 juta kematian telah secara langsung dikaitkan dengan diabetes setiap tahun (WHO, 2020).

Peningkatan ini terjadi pada DM tipe 1 dan tipe 2. Secara global, menurut International Diabetes Federation (IDF), terdapat 352 juta orang dewasa dengan gangguan toleransi glukosa yang berisiko tinggi terkena diabetes pada tahun 2045 (Bommer *et al.*, 2018).

Diabetes mellitus adalah sekelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat cacat sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Hiperglikemia kronis pada DM dikaitkan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ, terutama mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah (American Diabetes Association, 2010).

Komplikasi diabetes dibagi menjadi komplikasi makro vaskuler yaitu penyakit arteri koroner, penyakit vaskuler perifer dan stroke serta komplikasi mikro vaskular yaitu nefropati diabetikum, retinopati dan neuropati (Adela *et al.*, 2015). Jika dibandingkan dengan semua

komplikasi, disfungsi endotel adalah masalah umum pada pasien diabetes. Sel endotel mengeluarkan mediator yang berbeda seperti vasodilator: oksida nitrat dan vasokonstriktor (endotelin-1). Hiperglikemia dan perubahan metabolisme lainnya dapat menyebabkan gangguan produksi oksida nitrat (NO) (Avogaro *et al.*, 2011).

Salah satu penelitian meta-analisis telah melaporkan bahwa adanya peningkatan konsentrasi NO pada pasien DM tipe 1 dan 2, meningkatkan kejadian klinis merugikan yang diamati pada pasien diabetes, seperti disfungsi endotel, resistensi insulin dan beta pankreas. disfungsi sel (Assmann *et al.*, 2016). Pada umumnya pasien DM dan hiperglikemia kronis menyebabkan munculnya gangguan produksi dan aktivitas oksida nitrat (NO) (Avogaro *et al.*, 2011). NO adalah gas tidak berwarna dan tidak berbau yang larut dalam pelarut berair dan organik dan merupakan produk dekomposisi dari banyak senyawa nitro dan nitro yang tidak stabil (Ignarro, 2014).

Nitric Oxide (NO) kemungkinan memiliki efek yang menguntungkan dan merugikan tergantung pada konsentrasinya (Adela *et al.*, 2015). Di satu sisi, NO menyebabkan relaksasi pembuluh darah sehingga menurunkan tekanan

darah, mencegah agregasi dan adhesi platelet, membatasi timbulnya oksidasi kolesterol LDL, menghambat proliferasi sel otot polos, dan menurunkan ekspresi gen proinflamasi yang berhubungan dengan aterogenesis. Di sisi lain, NO berinteraksi dengan O_2 menyebabkan inaktivasi NO dan produksi *peroxynitrite*, yang dimodifikasi *pasca-transkripsi*, yang menyebabkan kondisi patologis (Förstermann, 2010; Pacher *et al.*, 2007), diantaranya menyebabkan disfungsi endotel dengan merangsang produksi mediator inflamasi dan peroksidasi lipid sehingga terjadi peningkatan permeabilitas sel (Ishii *et al.*, 2001).

Pada pasien diabetes, hiperglikemia merangsang produksi *advanced glycation end* (AGEs), dan meningkatkan poliol, protein kinase C (PKC) dan hexosamine jalur, yang dapat menyebabkan stres oksidatif (Brownlee, 2005; Pitocco *et al.*, 2010). Kemudian, spesies oksigen reaktif berlebihan (ROS), seperti anion superoksida (O_2^-), bereaksi cepat dengan radikal NO, membentuk anion peroksinitrit, yang merupakan oksidan toksik yang mampu merusak beberapa molekul-molekul biologis, sehingga terjadi kerusakan jaringan (Beckman and Crow, 1993; Förstermann, 2010; Honing *et al.*, 1998). Penelitian ini bertujuan untuk mengukur produksi NO pada kultur *Human umbilical vein endothelial*

cell (HUVECs) yang telah diinduksi glukosa dengan variasi konsentrasi menggunakan teknik bioassay.

METODE

Penelitian ini menggunakan *Randomized Control Trial* rancangan acak lengkap pada kultur sel HUVECs yang diinkubasi dengan 3 variasi konsentrasi glukosa.

Penelitian pendahuluan dose-response curve antara isosorbide dinitrate dengan phenylephrine 10^6 M untuk mengetahui dan mengkuantifikasi sintesa NO pada kultur HUVECs kondisi normal maupun kultur HUVECs yang diperlukan dengan paparan berbagai konsentrasi glukosa dilakukan sebelum penelitian utama.

Pemaparan kondisi hiperglikemia biasanya dilakukan selama 48 jam (Curcio, 1992; Parzer, 1995; Sharpe, 1998), peneliti memilih 3 hari (72 jam), dengan 3 kelompok penelitian, yaitu: kelompok normal (konsentrasi glukosa 5 mM), kelompok perlakuan I (konsentrasi Glukosa 22 mM), dan kelompok perlakuan II (konsentrasi glukosa 33 mM).

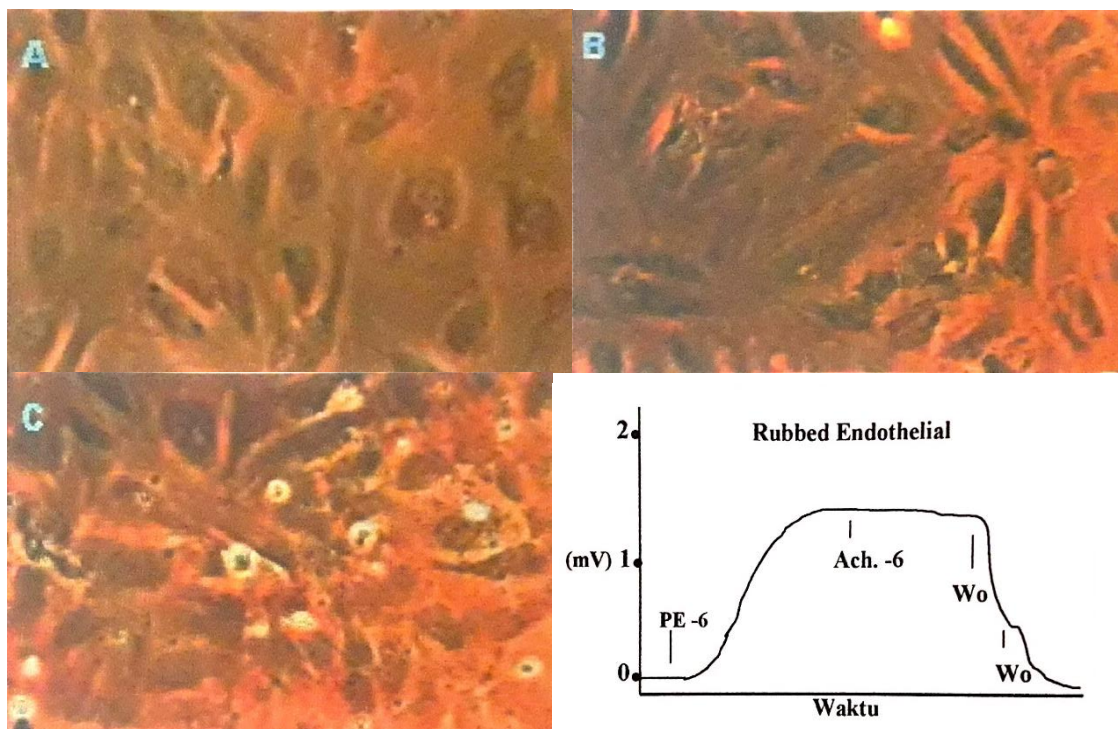
Pengukuran sintesis nitric oxide dilakukan dengan cara: kultur HUVECs yang telah dalam keadaan monolayer di dalam flask 25 cm^2 , dicuci dua kali dengan menggunakan medium serum free dengan volume setiap pencucian masing-masing

adalah 2 mL, kemudian kultur HUVECs ditambah larutan Krebs's 400 uL sebagai larutan fisiologis, kemudian digoyangkan untuk sebaran yang merata. Kemudian ditambahkan dengan 10 uL *super oxide dismutase* (SOD) konsentrasi 15 units/mL. Diinduksi dengan neurohumoral *adenosin diphosphate* (ADP) 10^{-8} M (dalam pelarut Krebs's) dengan volume 600 uL, untuk mencapai volume akhir 1 mL. Digoyang dan diratakan, kemudian diinkubasi selama 3 menit. Larutan dipipeting dengan *pipet volume*, kemudian diteteskan secara perlahan ke dalam jaringan aorta marmut yang sudah terpisah, yang sebelumnya telah dikontraksikan dengan phenylephrine 10^{-6} M,

selanjutnya dicatat responnya. Setelah pipeting larutan dari flask kultur HUVECs, kultur sel segera diberi medium serum free sebanyak 2 mL, kemudian dikembalikan untuk inkubasi selama 25 menit. Selanjutnya langkah percobaan ini diulangi sebanyak 3 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hilangnya kemampuan respon relaksasi aorta marmut terhadap asetilkolin 10^{-6} M yang diprekontraksikan dengan phenylephrine 10^{-6} M setelah HUVECs dipermukaan intima dihilangkan (*rubbed endothelial*). Kemampuan respon tersebut disajikan dalam grafik pada Gambar 1 D.



Gambar 1. A, B, dan C merupakan kultur HUVECs selama 3 hari dengan kondisi normal glukosa 5mM (A), kondisi konsentrasi glukosa 22 mM (B), dan kondisi konsentrasi glukosa 33 mM (C). Gambar 1 D merupakan grafik yang menunjukkan hilangnya respon relaksasi aorta marmut tanpa endotel terhadap asetil kolin

Gambar 1 A. menunjukkan Kultur HUVECs dalam kondisi normal memiliki bentuk sel cable stone dengan spesifisitas sel pada bagian tengah tampak bulat dan jelas. Bentuk sel pipih, jarak anjar sel teratur dan permukaan sel smooth ditandai oleh kejelasan inti sel, membran plasma, sitoplasma dan *extra cellular matrix* (ECM).

Dijelaskan Sumitro (2001) bahwa terdapat hubungan antara bentuk yang dalam hal ini adalah struktur sel dan fungsi, artinya setiap perubahan ke arah perbedaan struktur dapat diterjemahkan sebagai perubahan sifat dan fungsi sel. Hal ini berkaitan dengan struktur dan fungsi HUVECs normal.

Gambar 1 B. menunjukkan Kultur HUVECs kondisi konsentrasi glukosa 22 mM selama 3 hari menunjukkan adanya ECM dan sitoplasma yang jelas, permukaan sel mulai kurang rata, sitoskeleton nampak memendek dan sel menjadi memadat dan rapat. Disamping itu juga tampak terjadi beberapa membran blebbing dan shrinkage. Sepintas terlihat tidak jauh berbeda dengan kultur HUVECs kondisi normal.

Gambar 1 C. menunjukkan Kultur HUVECs dalam kondisi konsentrasi glukosa 33 mM selama 3 hari tampak ditandai dengan adanya kerusakan pada struktur membran plasma yang diawali dengan membran *blebbing* yang semakin banyak, peningkatan shrinkage dan permukaan sel yang menjadi semakin kasar (tidak rata). Disamping itu juga terjadi pemendekan sitoskeleton dan kerusakan pada ECM sehingga nampak menjadi sangat kasar.

Dari *dose-response curve* didapatkan suatu persamaan regresi kemudian selisih antara peningkatan kontraksi oleh phenylephrine 10^{-6} M dengan besarnya relaksasi yang ditimbulkan oleh kultur HUVECs dengan konsentrasi masing-masing perlakuan diukur sehingga kuantifikasi sintesa NO dapat diukur.

Selanjutnya dilakukan uji *Analysis of Variance* dan uji lanjut dengan Uji Beda Nyata Terkecil dengan *confidence interval* 95%. Tabel 1. menunjukkan hasil yang diperoleh yaitu bahwa sintesa NO pada kultur HUVECs terendah terjadi pada perlakuan dengan pemaparan konsentrasi glukosa 33 mM dengan nilai rata-rata $0.17 \times 10^{-7} \pm$

0.09×10^{-7} dan tertinggi pada perlakuan dengan pemaparan konsentrasi glukosa 22 mM selama 3 hari, dengan nilai rata-rata $2.91 \times 10^{-7} \pm 0.20 \times 10^{-7}$

⁷. Sedangkan nilai rata-rata sintesa NO pada kondisi normal adalah $1.45 \times 10^{-7} \pm 0.30 \times 10^{-7}$.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Sintesa NO Pada Kultur HUVECs

Perlakuan	Mean \pm SD	<i>p</i>
Normal	$1.45 \times 10^{-7} \pm 0.30 \times 10^{-7}$	<0.05
Perlakuan I	$2.91 \times 10^{-7} \pm 0.20 \times 10^{-7}$	
Perlakuan II	$0.17 \times 10^{-7} \pm 0.09 \times 10^{-7}$	

Berdasarkan analisa statistik, didapatkan bahwa kondisi konsentrasi glukosa tinggi pada kultur HUVECs yang diperlakukan dengan pemaparan glukosa konsentrasi tinggi. Hal ini membuktikan bahwa ada keterkaitan antara tingginya konsentrasi glukosa dengan kemampuan sintesa NO pada kultur HUVECs.

Pada penelitian ini, hasil pengukuran sintesa NO pada kultur HUVECs kondisi normal distimulasi dengan menggunakan neurohormonal *adenosin diphospat* (ADP) untuk mengetahui sintesa NO yang secara teknik bioassay dapat merelaksasikan aorta marmot terpisah. Sintesa NO yang diperoleh dapat dilihat seperti pada penggunaan adenosin diphospat untuk menginduksi sintesa NO dari HUVECs didasarkan pada pertimbangan ketersediaan di laboratorium relatif murah dan mudah diperoleh. Disamping itu kemampuan untuk merangsang sintesis NO dengan kandungan substansi P-nya juga relatif

tidak berbeda dengan mediator neurohumoral lainnya.

Dalam kondisi konsentrasi glukosa normal kultur HUVECs memperlihatkan bentuk sel *cable stone* dengan membran sel yang nampak nyata, *smooth* dan teratur, yang menunjukkan bahwa belum terjadi kerusakan struktur maupun fungsinya secara fisiologis.

Pada kondisi konsentrasi glukosa tinggi yang memicu proses stres oksidatif melalui jalur reaksi glukosa autooksidasi, sorbitol-myoinositol dan glikasi non-enzimatik, ternyata memberikan pengaruh nyata terhadap sintesa dan *release* NO. Hal ini terlihat pada perlakuan dengan adanya pemaparan glukosa konsentrasi 33 mM selama 3 hari. Proses stress oskidatif yang dipicu oleh meningkatnya generasi radikal bebas pada keadaan konsentrasi glukosa tinggi, khususnya melalui *polyol-pathway* dan glukosa autooksidasi diduga menyebabkan rusaknya molekul reseptor membran sel.

Penelitian lainnya meneliti pelepasan NO diperiksa dengan kontrol (5,5 mM) dan level glukosa tinggi menunjukkan bahwa glukosa tinggi meningkatkan ekspresi protein eNOS, tetapi akhirnya menurunkan pelepasan NO. Penurunan bioavailabilitas NO tampaknya terkait dengan kelebihan produksi superoksida dan *L*-defisiensi-arginine. Hal ini memperjelas dasar molekuler dari mekanisme dimana peningkatan glukosa menyebabkan ketidak seimbangan antara NO dan superoksida yang mengakibatkan gangguan fungsi dari setiap endotel. Selain itu, pemulihan fungsi NO dengan administrasi *L*-arginine dan asupan antioksidan yang memadai menunjukkan pengobatan suportif potensial untuk pasien dengan nefropati diabetic (Hoshiyama *et al.*, 2004).

Perlakuan pemaparan glukosa dengan konsentrasi 22 mM pada HUVECs selama 3 hari ternyata justru menimbulkan peningkatan sintesa NO yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan keadaan glukosa normal (5 mM). Meningkatnya sintesa NO pada HUVECs yang diperlakukan dengan pemaparan konsentrasi glukosa 22 mM selama 3 hari diduga terjadi sebagai proses kompensasi atas terjadinya deaktivasi NO oleh adanya peningkatan dari pembentukan generasi radikal bebas superoksida. Demikian pula, kultur primer HUVECs yang diperoleh dari kehamilan

diabetes gestasional menunjukkan peningkatan sintesis NO (Di Fulvio *et al.*, 2006). Hasil ini berbeda karena kultur HUVECs yang digunakan diperoleh dari kehamilan diabetes gestasional, bukan HUVECs yang dibiakkan dalam glukosa tinggi.

Berdasarkan pengamatan struktur pada kondisi konsentrasi glukosa 22 mM selama 3 hari, sepiintas tampak relatif tidak jauh berbeda dengan kultur HUVECs kondisi normal. Namun pada perlakuan ini terjadi pemendekan sitoskeleton, jarak antar sel semakin rapat, beberapa *shrinkage* dan sedikit membran *blebbing*. Terbentuknya radikal superoksida pada perlakuan ini akan dapat berinteraksi dengan NO membentuk peroksinitrit (ONOO). Pada konsentrasi rendah peroksinitrit dapat bersifat dan berfungsi seperti NO, sehingga tampak terjadi peningkatan sintesa NO akibat vasodilatasi yang ditimbulkannya (Ridnour *et al.*, 2004). Di samping itu, peningkatan sintesa NO diduga pula sebagai akibat meningkatnya aktivitas protein kinase-C.

SIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulannya, terjadi penurunan sintesa NO sebagai proses kompensasi terhadap deaktivasi NO oleh generasi radikal bebas pada kultur HUVECs yang terpapar glukosa konsentrasi tinggi (hiperglikemia akut). Penelitian lebih lanjut

diharapkan dapat mengamati kemampuan sintesis

<https://doi.org/10.2337/dc17-1962>

NO dengan melihat variasi lama induksi glukosa tinggi pada kultur HUVECs.

Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615–1625. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>

DAFTAR PUSTAKA

Adela, R., Nethi, S. K., Bagul, P. K., Barui, A. K., Mattapally, S., Kuncha, M., Patra, C. R., Reddy, P. N. C., & Banerjee, S. K. 2015. Hyperglycaemia Enhances Nitric Oxide Production in Diabetes: A Study from South Indian Patients. *PLoS One*, 10(4), e0125270. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125270>

Di Fulvio, P., Formoso, G., Di Silvestre, S., Di Tomo, P., Giardinelli, A., La Sorda, R., Di Pietro, N., Piantelli, M., Consoli, A., & Pandolfi, A. 2006. Mo-W2:5 Increased vascular wall endothelial nitric oxide synthase (ENOS) levels in umbilical cords from gestational diabetic women. *Atherosclerosis Supplements*, 7(3), 14. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1567-5688\(06\)80034-6](https://doi.org/10.1016/s1567-5688(06)80034-6)

American Diabetes Association. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In *Diabetes Care* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1, p. S62). American Diabetes Association. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>

Förstermann, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 459, Issue 6, pp. 923–939). Springer. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0808-2>

Assmann, T. S., Brondani, L. A., Bouças, A. P., Rheinheimer, J., de Souza, B. M., Canani, L. H., Bauer, A. C., & Crispim, D. 2016. Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 61, 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.009>

Honing, M. L. H., Morrison, P. J., Banga, J. D., Stroes, E. S. G., & Rabelink, T. J. 1998. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. In *Diabetes/Metabolism Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 241–249). John Wiley & Sons, Ltd. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0895\(199809\)14:3<241::AID-DMR216>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0895(199809)14:3<241::AID-DMR216>3.0.CO;2-R)

Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., De Kreutzenberg, S., & Fadini, G. P. 2011. Endothelial dysfunction in diabetes: The role of reparatory mechanisms. In *Diabetes Care* (Vol. 34, Issue SUPPL. 2, pp. S285–S290). American Diabetes Association. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc11-s239>

Hoshiyama, M., Li, B., Yao, J., Harada, T., Morioka, T., & Oite, T. 2004. Effect of High Glucose on Nitric Oxide Production and Endothelial Nitric Oxide Synthase Protein Expression in Human Glomerular Endothelial Cells. *Nephron Experimental Nephrology*, 95(2), e62–e68. Available at: <https://doi.org/10.1159/000073673>

Beckman, J. S., and Crow, J. P. 1993. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochemical Society Transactions*, 21(2), 330–334. Available at: <https://doi.org/10.1042/bst0210330>

Ignarro, L. J. 2014. Nitric Oxide. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00245-2>

Bommer, C., Sagalova, V., Heesemann, E., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., Davies, J., & Vollmer, S. 2018. Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030. *Diabetes Care*, 41(5), 963–970. Available at:

Ishii, N., Patel, K. P., Lane, P. H., Taylor, T., Bian, K., Murad, F., Pollock, J. S., & Carmines, P. K. 2001. Nitric Oxide Synthesis and Oxidative Stress in the Renal Cortex of Rats with Diabetes Mellitus. *Journal of the American Society of*

Nephrology, 12(8).

- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. In *Physiological Reviews* (Vol. 87, Issue 1, pp. 315–424). American Physiological Society. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. A., Zuppi, C., & Ghirlanda, G. 2010. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. In *Review of Diabetic Studies* (Vol. 7, Issue 1, pp. 15–25). Available at: <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.15>
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., & Wink, D. A. 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. In *Biological Chemistry* (Vol. 385, Issue 1, pp. 1–10). Biol Chem. Available at: <https://doi.org/10.1515/BC.2004.001>
- WHO. 2020. *Diabetes*. World Health Organization. Available at: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1 (Accessed: 28 December 2020)