

Review Article

Bioinformatic analysis of gene networks and transcriptional pathway analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in response to exercise training

Zahra Asheghi[✉], Sayed Mohammad Marandi^{*✉}

Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common causes of liver dysfunction, and its prevalence has increased significantly. Based on the research conducted, physical activity while increasing the expression of proteins such as peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) with increasing energy consumption causes a decrease in the accumulation of fat in the liver and thus affects NAFLD. The goal of the present study is to identify critical genes and key pathways associated with NAFLD, and to analyze the gene networks involved in this disease, alongside the impact of exercise on these pathways. Furthermore, bioinformatics analyses have been conducted to clarify the interactions between these genes and pathways. We determined the pathways by using the analyzed transcriptional data and hub genes involved in NAFLD-related pathways. Network cluster analysis confirmed the result of Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis. The discovered genes are fatty acid synthase (FASN), acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1), Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (SREBF1-c), PPAR α , which are involved in the processes of pathogenesis or resistance to NAFLD. The results of this study provide a list of hub genes, important pathways and new insights for the future development of NAFLD treatment and elucidate the underlying mechanism of liver response to exercise.

Keywords: Bioinformatics, Protein-protein interaction, Gene networks, Non-alcoholic fatty liver, Exercise

How to cite this article: Asheghi Z, Marandi M. Bioinformatic analysis of gene networks and transcriptional pathway analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in response to exercise training. J Sport Exerc Physiol. 2025;17(4):115-138.

* Corresponding Author's E-mail: mmarandi@ut.ac.ir

<https://doi.org/10.48308/joeppa.2024.236599.1288>

Received: 14/08/2024

Revised: 09/10/2024

Accepted: 30/10/2024



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

تحلیل بیوانفورماتیکی شبکه‌های ژنی و تحلیل مسیر رونویسی کبد چرب غیرالکلی در پاسخ به تمرین ورزشی

زهرا عاشقی^۱، سید محمد مرندی^{۲*}

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) از شایع‌ترین علل اختلال عملکرد کبد است و شیوع آن به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. بر پایه پژوهش‌های انجام‌گرفته فعالیت بدنی ضمن افزایش بیان پروتئین‌هایی مانند PPAR α با افزایش هزینه انرژی سبب کاهش انباشت چربی در کبد می‌شود و از این راه بر NAFLD تأثیر می‌گذارد. هدف پژوهش حاضر، شناسایی ژن‌های حیاتی و مسیرهای کلیدی وابسته به NAFLD و بررسی شبکه‌های ژنی درگیر در این بیماری، به‌همراه تأثیر فعالیت ورزشی بر این مسیرهاست. همچنین تحلیل‌های بیوانفورماتیکی انجام‌گرفته به شفاف‌سازی ارتباطات و تعاملات میان این ژن‌ها و مسیرها کمک می‌کند. مسیرها را با استفاده از داده‌های رونویسی تحلیل و ژن‌ها درگیر در مسیرهای وابسته به NAFLD تعیین کردیم. تجزیه و تحلیل خوشه شبکه نتیجه تجزیه و تحلیل GO و کیوتو دایره‌المعارف ژن و ژنوم (KEGG) را تأیید کرد. ژن‌های کشف‌شده، FASN, ACOX1, SREBF1-c, PPARA هستند که در فرایندهای بیماری‌زایی یا مقاومت در برابر NAFLD نقش دارند. نتایج این پژوهش فهرستی از ژن‌های هاب، مسیرهای مهم و بینش‌های جدید برای توسعه آتی درمان NAFLD ارائه کرده و سازوکار اساسی پاسخ کبد را به فعالیت ورزشی روشن می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، تعامل پروتئین-پروتئین، شبکه‌های ژنی، کبد چرب غیرالکلی، فعالیت ورزشی

نحوه استناد به این مقاله: عاشقی ز، مرندی م. تحلیل بیوانفورماتیکی شبکه‌های ژنی و تحلیل مسیر رونویسی کبد چرب غیرالکلی در پاسخ به تمرین ورزشی. نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی. ۱۴۰۳؛ ۱۷(۴): ۱۱۵-۱۳۸.

* رایانامه نویسنده مسئول: mmarandi@ut.ac.ir

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یک مسئله مهم بهداشت همگانی در سراسر جهان و شایع‌ترین بیماری کبدی در کشورهای غربی است و شیوع جهانی آن روی هم رفته حدود ۲۵ درصد برآورد می‌شود، اما این آمار شاید در گروه‌های سنی خاص مانند افراد میانسال و بالاتر یا افراد مبتلا به چاقی، به دلیل عوامل وابسته به سبک زندگی و سوخت‌وساز، بیشتر باشد (۱). اگر سایر عوامل، مانند الکل یا مواد مخدر را نادیده بگیریم، NAFLD با انباشت چربی بیش از ۵ درصد در سلول‌های کبدی مشخص می‌شود. شیوع NAFLD بیشتر به دلیل وجود همه‌گیری چاقی در حال افزایش است (۲). بررسی پژوهش‌های پیشین نشان داده است که مصرف رژیم غذایی پرچرب (HFD) سبب افزایش وزن و چاقی و همچنین القای فشار اکسایشی، ناهنجاری‌های سوخت‌وسازی لیپیدها (هیپرلیپیدمی)، مقاومت به انسولین، التهاب مزمن، مقاومت به گلوکز و تغییرات التهابی در کبد می‌شود که از ویژگی‌های پاتولوژیک است که همواره در NAFLD دیده می‌شود (۳،۴). ویژگی‌های پاتولوژیک اولیه NAFLD، استئاتوز ساده است

منظور از 'استئاتوز ساده' تجمع چربی در کبد بدون التهاب یا آسیب بافتی جدی است که در بسیاری از بیماران مبتلا به NAFLD مشاهده می‌شود. بر اساس شواهد موجود، حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد از این بیماران ممکن است به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) پیشرفت کنند، که در آن علاوه بر استئاتوز، التهاب و آسیب به بافت کبد نیز وجود دارد.

و پس از آن به فیروز کبدی، سیروز و در نهایت نارسایی کبد یا سرطان کبد تبدیل می‌شوند (۵). پاتوژنز NAFLD پیچیده است و در حال حاضر هیچ درمان دارویی قابل قبولی وجود ندارد. تغذیه بیش از اندازه عامل اصلی محرک NAFLD در نظر گرفته

می‌شود. تغذیه مفرط به گسترش ذخایر چربی و ایجاد حالت پیش‌التهابی منجر می‌شود که به نوبه خود به مقاومت به انسولین (IR) می‌انجامد. در شرایط IR، اختلال در سوخت‌وساز لیپیدهای کبدی به تشکیل لیپیدهای لیپوتوکسیک منجر می‌شود که به فشارآفرین‌های سلولی (فشار اکسایشی و فشارآفرینی شبکه آندوپلاسمی)، فعال شدن التهاب، مرگ سلولی آپوپتوز و تأثیر بر بازسازی بافت کبد و فیبروز منجر می‌کند (۶). پاتوژنز NAFLD همچنان بحث‌برانگیز است، در حال حاضر فرضیه «عوامل‌های موازی چندگانه» (به تأثیر متقابل عوامل ژنتیکی و محیطی مانند رژیم غذایی، میکروبیوتای روده و اجزای هورمونی اشاره دارد) (۲) مطرح شده است، که بیان می‌کند پاتوژن‌های گوناگون آسیب کبدی را به صورت موازی و نه متوالی ترویج می‌کنند (۷). پیشرفت‌های اخیر در درک سازوکارهای مولکولی درگیر در NAFLD، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو را هدف قرار می‌دهند (۸). برای نمونه تعامل عوامل رونویسی عملکرد انسولین یا سایر ویژگی‌های سوخت‌وسازی را تعیین می‌کند. به بیان دقیق‌تر، این گروه از ژن‌ها در این نوع تعاملات نقش دارند. شناسایی این گروه‌های ژنی با بازسازی مسیرها و شبکه‌ها از داده‌های رونویسی، پروتئوم و متابولوم می‌تواند ابزاری قدرتمند برای الگوسازی پاسخ‌های عوامل رونویسی گوناگون باشد و درک بهتری از نحوه واکنش این عوامل ارائه دهد. در این بررسی، همچنین نقش فعالیت ورزشی بررسی شد، زیرا یافته‌های بی‌شمار نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند به کاهش عوارض NAFLD کمک کند. فعالیت ورزشی از طریق بهبود حساسیت به انسولین، کاهش فشار اکسایشی و تنظیم مثبت سوخت‌وساز لیپیدها تأثیرات مثبتی بر پیشگیری از NAFLD دارد. در واقع، فعالیت ورزشی می‌تواند با

روش پژوهش

جمع‌آوری داده‌های ژن‌های دخیل در NAFLD

ژن‌های ارائه‌شده در این پژوهش با تغییر برابر < 2 و > 2 با استفاده از ژن‌های شناسایی‌شده برای تجزیه و تحلیل شبکه برگزیده شدند (جدول ۱) (۱۱).

شبکه‌های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

برای ارزیابی برهمکنش بین ژن‌های فهرست‌شده (جدول ۱)، تجزیه و تحلیل‌ها در برنامه مبتنی بر وب STRING ویراست ۱۲ (<http://string-db.org>) انجام گرفت. با حداقل امتیاز تعامل مورد نیاز 0.150 (اطمینان کم) و فهرست PPI ایجاد شد. سپس فهرست PPI به Cytoscape (ویراست ۳.۱۰.۱) وارد شد. نرم‌افزار CytoHubba (ویراست ۰.۱) یک برنامه افزودنی در Cytoscape است که برای شناسایی ژن‌های هاب از شبکه ساخته‌شده با استفاده از Cytoscape برای شناسایی پروتئین‌های هاب بین تمام گره‌ها استفاده می‌شود. چهار الگوریتم محاسباتی از Cyto-Hubba شامل MCC، DEGREE، DMNC و MNC برای شناسایی و رتبه‌بندی ژن‌های هاب استفاده شد و پنج پروتئین برای هر الگوریتم به‌عنوان پروتئین هاب برگزیده شدند. ژن هاب و برهمکنش آنها در یک زیرشبکه نشان داده شد.

هستی‌شناسی ژن و تجزیه و تحلیل

غنی‌سازی مسیر ژن‌های بیان‌شده

KEGG برای تجزیه و تحلیل غنی‌سازی ژن‌های زیرشبکه هاب، و کاربرد مبتنی بر وب STRING برای GO، از جمله عملکرد مولکولی (MF)، اجزای سلولی (CC) و فرایند زیستی (BP) استفاده شد.

تحلیل خوشه‌های شبکه

CytoCluster (ویراست ۲.۱.۰) برای خوشه‌بندی گره‌های شبکه استفاده شد. الگوریتم شناسایی مجموع پروتئین (IPCA) (۱۰) برای تجزیه و تحلیل خوشه‌ای زیرشبکه استفاده شد. آستانه روی 10 تنظیم شد و

بهبود شرایط کبد و کاهش التهاب وابسته به NAFLD، نقش پیشگیرانه و درمانی مهمی ایفا کند. این پژوهش‌ها نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند با تغییرات ژنتیکی و سوخت‌وسازی وابسته به مسیرهای لیپیدی و التهابی در کبد مقابله کرده و از پیشرفت بیماری جلوگیری کند (۹). تجزیه و تحلیل شبکه تنظیمی برهمکنش‌های عوامل رونویسی را در طول بیماری NAFLD را نشان داد و ژن‌های کلیدی SREBF1-c و PPAR α را شناسایی کرد که می‌توانند سوخت‌وساز لیپید را تنظیم کنند (۱۰). این پژوهش، mRNAها را با بیان و مسیرهای گوناگون درگیر در NAFLD و تغییرات در نیمرخ mRNA شناسایی می‌کند. برای درک بهتر پاسخ کبد به عوامل التهابی، نیمرخ mRNAها در کبد سالم و بیمار تجزیه و تحلیل و سپس بر رونویسی‌های وابسته به مسیر برهمکنش عوامل التهابی-کبد تمرکز شد. در پژوهش حاضر، تحلیل توالی RNAهای پژوهش‌های پیشین را بر روی نمونه‌های کبدی از موش‌های C57BL/6 انجام می‌دهیم که با فعالیت ورزشی و مداخلات رژیم غذایی پرچرب ارائه شده‌اند که توسط انسان قابل ترجمه هستند و نشانه ژنتیکی فعالیت ورزشی را در شروع NAFLD تعیین می‌کنند. در این تحقیق نشان می‌دهیم که فعالیت ورزشی بر ژن‌ها و مسیرهای وابسته به سوخت‌وساز کبد، برای مقابله با NAFLD تأثیر می‌گذارد. در این پژوهش، از رویکرد زیست‌شناسی نظام‌مند برای بررسی ژن‌های دخیل در NAFLD که در پژوهش‌های پیشین ارائه شده بود (تا پنج سال اخیر)، استفاده شد. اصطلاحات تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی، مسیرهای کیوتو از ژن‌ها و ژنوم‌ها (KEGG) و شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) بررسی شد، به‌طور ویژه روی قطب‌های ژنی بالقوه و زیرخوشه‌هایی که شاید در NAFLD نقش داشته باشند، تمرکز شد.

معمولی NAFLD را نشان می‌دهند (۱۳-۱۸).

شبکه‌های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

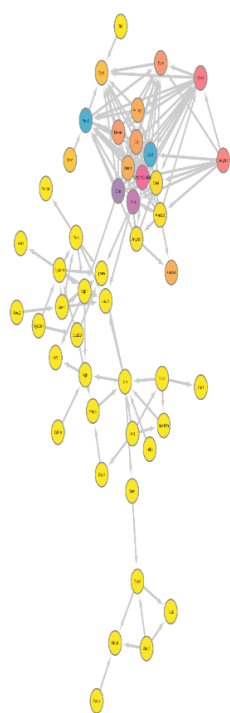
در تحقیق حاضر ۴۷ ژن تحت رویکرد زیست‌شناسی نظام‌مند DEGs مشتق از پژوهش‌های پیشین قرار گرفتند. شماری از ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) استفاده شد. شبکه‌های PPI با استفاده از STRING و Cytoscape ترسیم شدند (شکل ۱). db.org یک پایگاه داده از برهمکنش‌های پروتئینی پیش‌بینی‌شده و شناخته‌شده است (۱۹) که اگر تحت روش‌های درست ارائه شود، بهترین گزینه است. Cytoscape یک پلتفرم (سکوی) رایگان برای تجسم شبکه تعامل مولکولی و یکپارچه‌سازی داده‌هاست (۲۰).

ژن‌های هر خوشه در ویراست ۱۲ STRING برای یافتن مسیرهای KEGG وابسته به این ژن‌ها تجزیه و تحلیل شدند (۱۲).

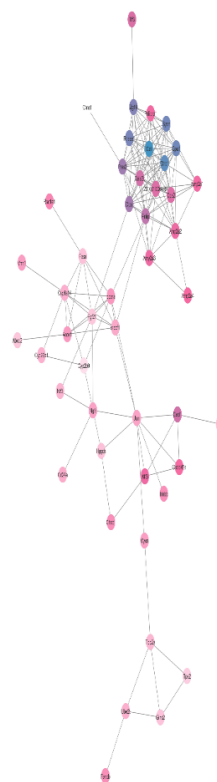
نتایج

نقش HFD در NAFLD

گروه HFD چاقی آشکار ناشی از رژیم غذایی را با بیشترین افزایش وزن، به‌ویژه در مراحل بعدی نشان دادند. افزون بر این، اندازه بزرگ شده و ظاهر رنگ‌پریده در کبد موش‌های تغذیه‌شده با HFD در مقایسه با موش‌های سالم با چشم غیرمسلح آشکار بود. روی هم‌رفته، نتایج پژوهش‌های استفاده‌شده نشان داد که کبد موش‌های تغذیه‌شده با HFD ویژگی‌های



(الف)



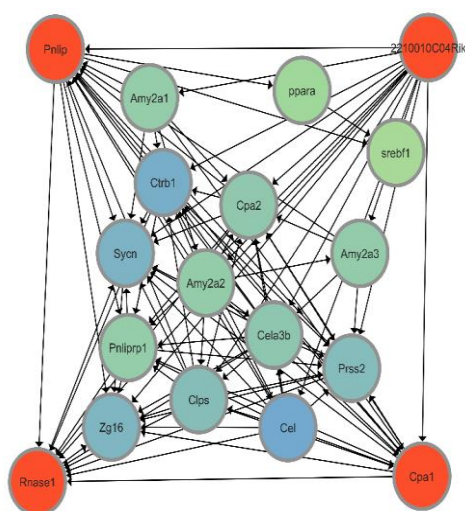
(ب)

شکل ۱ (الف). شبکه PPI ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در NAFLD با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape. آبی و بنفش: ژن‌های با تنظیم بالا، زرد: تنظیم پایین و صورتی: ژن‌های با تنظیم متوسط. (ب) شبکه PPI ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در NAFLD همراه با فعالیت ورزشی را نشان می‌دهد: آبی: بیان بالا، صورتی: بیان متوسط، سفید: بیان پایین. آمار خلاصه، تعداد گره: ۴۷، تعداد یال: ۱۵۴، میانگین: تعداد همسایگان: ۶/۵۵۳، طول مسیر مشخصه: ۱/۷۷۴، ضریب خوشه‌بندی: ۰/۲۶۰، تراکم شبکه: ۰/۰۷۱.

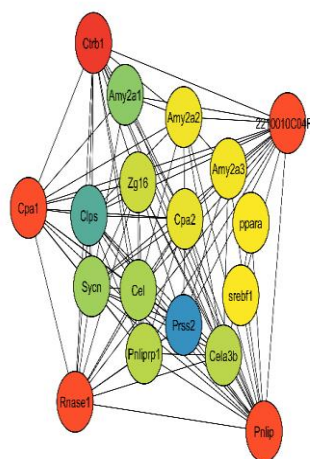
را افزایش می‌دهد. در تحقیق حاضر استفاده از چهار الگوریتم مختلف (MNC، DMNC، DEGREE و MCC) برای شناسایی پروتئین‌های در Cyto-Hubba رویکرد معقولی است؛ چهار الگوریتمی که ما انتخاب کردیم تا رویکردهای متفاوتی برای شناسایی پروتئین‌های داشته باشیم و نتایج را افزایش دهیم. MNC و DMNC بر اساس بیشترین دسته‌های شبکه، DEGREE بر اساس شمار یال‌های متصل به یک گره، و MCC بر اساس شمار کوتاه‌ترین مسیرهای عبور از یک گره است. استفاده از الگوریتم‌هایی با رویکردهای گوناگون به جذب جنبه‌های مختلف شبکه کمک می‌کند و می‌تواند به درک جامع‌تری از پروتئین‌های هاب منجر شود (۲۱). با به‌کارگیری چهار الگوریتم یادشده در مواد و روش‌ها، پنج پروتئین‌های با بیشترین برهمکنش‌ها و نقش‌های چشمگیر در شبکه در بین تمامی برهمکنش‌های پروتئینی شناسایی شدند (شکل ۲). شرح پروتئین‌های هاب در جدول ۱ نشان داده شده است. زیرشبکه تشکیل‌شده توسط این ژن‌های هاب شناسایی شده در شکل ۲ نشان داده شده است.

شکل ۱ شبکه PPI ژن‌هایی را نشان می‌دهد که در طول NAFLD و NAFLD همراه با فعالیت ورزشی تنظیم شده‌اند. انتخاب آستانه امتیاز اطمینان کمتر به این معناست که تعامل‌های بیشتری در شبکه گنجانده می‌شود، حتی اگر پشتیبانی ضعیف‌تری در داده‌های اساسی داشته باشند. این می‌تواند برای کاوش برهمکنش‌های بالقوه بین ژن‌هایی مفید باشد که شاید به‌خوبی بررسی نشده یا سطح بیان پایینی داشته باشند. تعامل‌های با امتیاز اطمینان پایین‌تر شاید به شناسایی روابط نظارتی جدیدی کمک کند که می‌تواند بیشتر بررسی شود. این شکل نشان می‌دهد که در اثر مصرف HFD پروتئین‌های سنتز لیپید شبکه‌ای می‌سازند که برای چرب شدن کبد ضروری است. به‌عبارت دیگر، مفاهیم جدید نظریه «شبکه برای شبکه» را در تعامل عوامل اپی‌ژنتیک-میزبان تأیید می‌کند.

استفاده از الگوریتم‌های فراوان برای شناسایی پروتئین‌های هاب یک روش معمول در تحلیل شبکه است، زیرا به کاهش سوگیری که شاید توسط یک الگوریتم معرفی شود، کمک می‌کند و اعتماد به نتایج



(ب)



(الف)

شکل ۲. ژن‌های زیرشبکه ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در (الف) NAFLD (ب) NAFLD همراه با فعالیت ورزشی. افزون بر این، همسایگان شناخته‌شده آنها بر اساس داده‌های ارائه‌شده در پژوهش ما با استفاده از برنامه CytoHubba. قرمز: ژن‌های هاب، زرد: ژن‌های با تنظیم پایین، سبز: ژن‌های با تنظیم متوسط، آبی: بسیار با تنظیم بالا. آمار خلاصه، شمار گره‌ها: ۱۸، تعداد یال‌ها: ۱۰۱، میانگین. شمار همسایگان: ۱۱/۲۲۲، طول مسیر مشخصه: ۱/۳۲۱، ضریب خوشه‌بندی: ۰/۴۴۷، تراکم شبکه: ۰/۳۳۰.

جدول ۱. رتبه‌بندی ژن‌های هاب شناسایی شده در NAFLD با استفاده از CytoHubba

رتبه	ژن	روش رتبه‌بندی	Fold change	توضیحات ژن
۱	Pnlip	MCC MNS DEGREE	۴۲۱۸/۴۱ ۲/۱۵۵E	تری آسیل گلیسرول لیپاز پانکراس؛ نقش مهمی در سوخت‌وساز چربی دارد. ترجیحاً استرهای اسیدهای چرب با زنجیره بلند را در موقعیت‌های ۱ و ۳ تقسیم کرده و بیشتر ۲-مونوآسیل گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد تولید می‌کند و فعالیت چشمگیری در برابر بسترهای امولسیون‌شده نامحلول نسبت به سوبسترهای محلول نشان می‌دهد (بر اساس شباهت) (465 aa).
۱	Rnase1	DMNC	۱۸۴۴/۴۸ ۳/۴۵۰E	ریبونوکلئاز پانکراس؛ اندونوکلئازی که برش RNA را در سمت ۳ نوکلئوتیدهای پیریمیدین کاتالیز می‌کند. روی RNA تک‌رشته‌ای و دورشته‌ای (بر اساس شباهت) عمل می‌کند. متعلق به خانواده ریبونوکلئاز پانکراس است. (aa ۱۴۹)
۲	C04Rik۲۲۱۰۰۱۰	MCC MNS Degree	۳۰۹۹/۵۲ ۱/۵۵۸E	ژن RIKEN cDNA 2210010C04؛ متعلق به خانواده پپتیداز S1 است. (aa ۲۴۷)
۳	Ctrl1	MCC MNS Degree	۶۶۸۶/۴۸	کیموتریپسین B زنجیره A، متعلق به خانواده پپتیداز S1 است. (aa ۲۶۳)
۳	Cpa1	Degree MNS MCC	۲۵۹۷/۳۳ ۳/۶۱۳E	کربوکسی پپتیداز A1؛ کربوکسی پپتیداز که آزاد شدن یک اسید آمینه C ترمینال را کاتالیز می‌کند، اما با -Glu، -Arg، -Lys یا Pro اثر کمی دارد یا هیچ اثری ندارد. (aa ۴۱۹)

است. در تجزیه و تحلیل BP، MF و GO، در محصولات ژنی توضیح داده شده است (۲۲). در پژوهش حاضر، فقط روی برخی گره‌های زیرشبکه (۱۸ گره) تمرکز کردیم که در زیست‌شناسی نظام‌مند نقش داشته و با ژن‌های هاب در شبکه ژنی در طول NAFLD تعامل دارند. این نتیجه می‌تواند تجزیه و تحلیل جامع‌تر و عمیق‌تری از داده‌های رونویسی را با تمرکز بر الگوسازی شبکه ژنی و تحلیل مسیر با استفاده از ابزارهای مختلف بیوانفورماتیک ارائه دهد.

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های زیرشبکه با استفاده از ابزار مبتنی بر وب STRING و KEGG نشان داد که ($\leq 50\%$ ژن‌های دیده شده) GO یافت شده برای MF به‌طور چشمگیری در فعالیت‌های مختلف،

همه ژن‌های هاب در طول NAFLD و همراه NAFLD با فعالیت ورزشی تنظیم مثبت شدند (جدول ۱). برخی ژن‌ها علی‌رغم نقش مهمی که در تعامل کبد چرب دارند، شاید بالاترین سطح بیان را نداشته باشند. تجزیه و تحلیل شبکه PPI می‌تواند ژن‌های کلیدی را در فرایند زیستی کشف کند.

هستی‌شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر ژن‌های زیرشبکه در NAFLD و فعالیت ورزشی ژن‌های زیرشبکه ژن‌هایی هستند که با ژن‌های هاب تعامل دارند تا بتوانند مسیرهای کلیدی و فرایندهای مهم پاسخ به NAFLD را روشن کنند. در این پژوهش، در پی تعیین این مسیرها و فرایندهای زیستی با استفاده از تحلیل مسیرهای GO و KEGG هستیم. GO مدلی برای توصیف محصولات ژنی موجودات

را تشدید می‌کند (۲۴). هیدرولازها آنزیم‌هایی هستند که در تجزیه ترکیبات پیچیده به اجزای ساده‌تر نقش دارند و فعالیت هیدرولازی در بافت کبد می‌تواند تأثیر چشمگیری بر پیشرفت NAFLD داشته باشد. به تازگی یافته‌ها نشان داده‌اند که اختلال در فعالیت‌های هیدرولازهای خاص مانند اتوفازی هیدرولازها، می‌تواند به انباشت چربی در سلول‌های کبدی و بروز استئاتوز منجر شود که از نشانه‌های اصلی NAFLD است. به‌طور خاص، اتوفازی نقش مهمی در تجزیه قطرات چربی در سلول‌های کبدی دارد و نقص در این مسیر می‌تواند به پیشرفت NAFLD کمک کند. افزون بر این، در مسیرهای هیدرولازی دیگر، مانند فعالیت لیپازهای سلولی، دیده شده که تغییرات در سطح فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند به افزایش انباشت تری‌گلیسرید در کبد و بروز استئاتوز کمک کند. این تغییرات در نهایت می‌تواند به التهاب کبدی، فیبروز و پیشرفت به سمت استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) منجر شود (۲۵).

فعالیت هیدرولاز، فعالیت تری‌گلیسرید لیپاز، فعالیت آلفا آمیلاز و اتصال یون کلرید به‌کار برده شده است (شکل ۳).

همبستگی بین یون کلرید و NAFLD به پژوهش‌های بستگی دارد که نشان می‌دهند تغییرات در تعادل الکترولیت‌ها، از جمله سطوح کلرید، می‌تواند در پیشرفت و تشدید این بیماری نقش داشته باشد. برای نمونه بررسی‌ها نشان داده‌اند که اختلال در تعادل کلرید شاید بر فرایندهای سوخت‌وسازی کبد تأثیر بگذارد و به افزایش التهاب و فیبروز کبدی در مراحل پیشرفته بیماری کمک کند (۲۳).

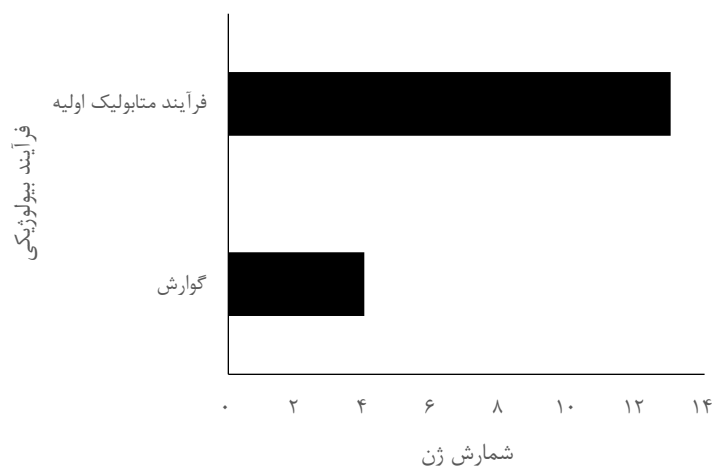
تری‌گلیسرید لیپاز (ATGL) برای تجزیه تری‌گلیسریدها در بافت چربی ضروری است و اسیدهای چرب آزاد (FFAs) آزاد می‌کند که می‌تواند توسط کبد جذب شود. در شرایط عادی، ATGL هیدرولیز تری‌گلیسریدها را تسهیل می‌کند، بنابراین هومئوستاز چربی را تنظیم می‌کند. با این همه، در NAFLD، کاهش فعالیت ATGL کبدی با افزایش انباشت لیپید و التهاب وابسته است و پیشرفت بیماری



شکل ۳. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (عملکرد مولکولی) زیر شبکه تعیین‌شده ژن‌های هاب در NAFLD با استفاده از STRING و براساس ۱۲ (<http://string-db.org>).

در این پژوهش، دسته زیستی فرایندهای سوخت‌وسازی اولیه دارای بیشترین رونویسی تنظیم‌شده است. همچنین BP به‌طور چشمگیری در فرایند تجزیه به‌کار برده شده است ($\leq 50\%$ ژن‌های دیده‌شده) (شکل ۴). فرایندهای سوخت‌وسازی اولیه، مانند سوخت‌وساز گلوکز، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه، نقش مهمی در توسعه و پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) دارند. اختلال در این مسیرها می‌تواند به انباشت چربی در کبد، مقاومت به انسولین، و فشار اکسایشی منجر شود که همه از عوامل مهم در توسعه NAFLD هستند. برای نمونه افزایش لیپولیز و تغییرات در اکسایش اسیدهای چرب می‌تواند به انباشت تری‌گلیسرید در کبد کمک کنند، که از ویژگی‌های اصلی NAFLD است (۲۶). ارتباط بین فرایندهای تجزیه (سوخت‌وسازی-گوارش)

در این پژوهش، دسته زیستی فرایندهای سوخت‌وسازی اولیه دارای بیشترین رونویسی تنظیم‌شده است. همچنین BP به‌طور چشمگیری در فرایند تجزیه به‌کار برده شده است ($\leq 50\%$ ژن‌های دیده‌شده) (شکل ۴). فرایندهای سوخت‌وسازی اولیه، مانند سوخت‌وساز گلوکز، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه، نقش مهمی در توسعه و پیشرفت بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) دارند. اختلال در این مسیرها می‌تواند به انباشت چربی در کبد، مقاومت به انسولین، و فشار اکسایشی منجر شود که همه از عوامل مهم در توسعه NAFLD هستند. برای نمونه افزایش لیپولیز و تغییرات در اکسایش اسیدهای چرب می‌تواند به انباشت تری‌گلیسرید در کبد کمک کنند، که از ویژگی‌های اصلی NAFLD است (۲۶). ارتباط بین فرایندهای تجزیه (سوخت‌وسازی-گوارش)



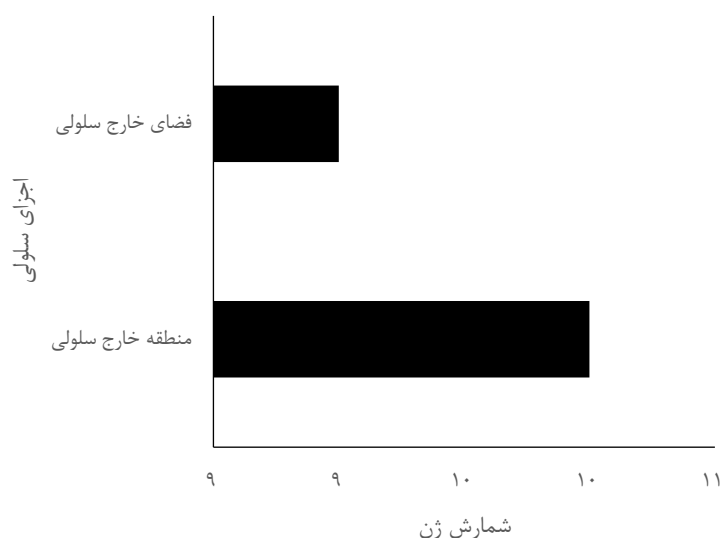
شکل ۴. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (فرایند زیستی) زیرشبکه‌های تعیین‌شده پروتئین‌های هاب در NAFLD با استفاده از STRING ویراست ۱۲ (<http://string-db.org>).

و نقش‌های مختلفی در تنظیم فعالیت‌های سلولی و بافتی دارد. تغییرات در فضای خارج‌سلولی می‌تواند تأثیر زیادی بر پیشرفت و شدت NAFLD داشته باشد. پروتئین‌های فضای خارج‌سلولی مانند کلاژن، فیبرونکتین و لامینین در تنظیم ساختار بافت کبد و فرایندهای ترمیم بافت نقش دارند. در NAFLD، تغییرات در ترکیب و ساختار فضای خارج سلولی می‌تواند به اختلال در فرایندهای ترمیم و

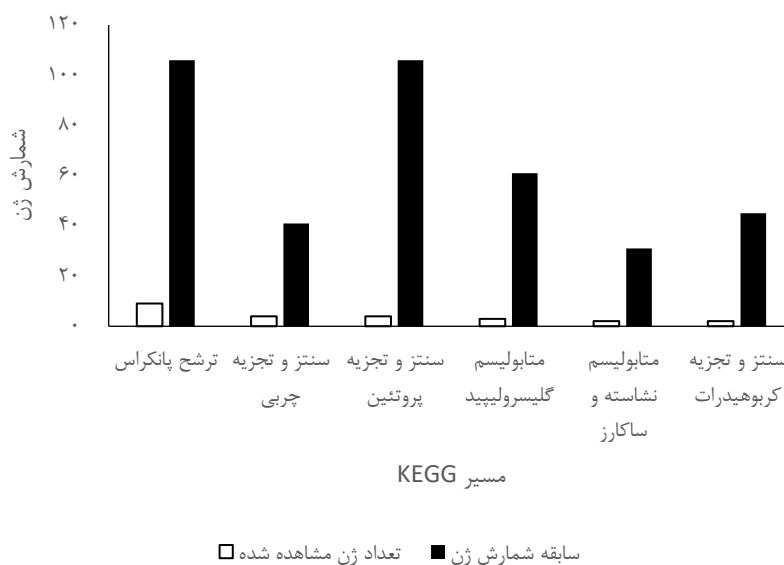
اصطلاحات غالب GO (50% ژن دیده‌شده) که برای CC یافت می‌شود (شکل ۵). این نتیجه نشان داد که ژن‌های زیرشبکه به بخش‌های بیرونی سلول مرتبطاند. داده‌های حاضر نشان‌دهنده تنظیم رونویسی‌های ژنی زیرشبکه هاب وابسته به NAFLD است. فضای خارج‌سلولی به شبکه‌ای از پروتئین‌ها و مولکول‌های بزرگ اطلاق می‌شود که فضای بین سلول‌ها را پر می‌کند

KEGG یک پایگاه داده برای اختصاص مسیرهای خاص به گروه‌های DEG و پیوند داده‌های omics به داده‌های عملکردی سطح بالاتر است (۲۹). مسیرهای اصلی درگیر در NAFLD عبارت‌اند از ترشح پانکراس، سوخت و ساز پروتئین، سوخت و ساز چربی، سوخت و ساز گلیسرولیپید، سوخت و ساز نشاسته و ساکارز، سوخت و ساز کربوهیدرات، تجزیه و تحلیل بر اساس KEGG (شکل ۶).

آسیب بافتی منجر شود. همچنین پیام‌های خارج سلولی، می‌توانند روی فعالیت‌های سلولی مانند تکثیر، آپوپتوز و التهاب تأثیر بگذارند. این پیام‌ها در تنظیم وضعیت التهابی و فیبروتیک در NAFLD نقش مهمی دارند (۲۸). برای به دست آوردن اطلاعات در خصوص عملکردها و مسیرهای زیستی مهم در NAFLD، از مسیرهای KEGG غنی‌سازی ژن‌های زیر شبکه استفاده شد.



شکل ۵. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (جزء سلولی) زیر شبکه های تعیین شده ژن‌های هاب در NAFLD با استفاده از STRING و پراست ۱۲ (<http://string-db.org>).



شکل ۶. مسیرهای زیستی شناسایی شده بر اساس دایره المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (KEGG) روی ژن‌های زیر شبکه ژن‌های هاب در NAFLD با استفاده از STRING و پراست ۱۲ (<http://string-db.org>).

وزن‌های یال‌های حادث بر هر گره، وزن آن گره را مشخص می‌کند. هسته از طریق وزن این گره تعیین می‌شود. ابتدا یک هسته به‌عنوان یک خوشه در نظر گرفته می‌شود، سپس با استفاده از IPCA و با افزودن بازگشتی گره‌ها از همسایگانش بر اساس اولویت گره‌ها، یک خوشه تشکیل می‌شود. احتمال تعامل یک گره و کوتاه‌ترین مسیر بین گره‌ها و گره‌های موجود در خوشه، دو شرط برای افزودن یک گره به خوشه هستند (۱۲).

در این پژوهش، از طریق تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای زیرشبکه ۱۸ خوشه به‌دست آمد که از بین آنها خوشه‌هایی با رتبه‌بندی ۱ تا ۴ انتخاب شد (جدول ۲). مسیرهای مشترک برای هر چهار خوشه شامل ترشح پانکراس (مقاومت به انسولین)، لیپولیز و سنتز چربی و پردازش پروتئین در اولویت است. با این همه، مسیر مستقیم NAFLD تنها در رتبه خوشه ۴ نشان داده شده است. همپوشانی بین ژن‌های شمارش شده در مسیرهای KEGG و نتیجه تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای تأیید کرد که چهار مسیر، مسیر اصلی در NAFLD هستند. تجزیه‌وتحلیل شبکه با استفاده از داده‌های RNA-Seq و خوشه‌بندی به ما کمک کرده است تا مهم‌ترین آنها را در پاسخ به NAFLD نشان دهیم.

بیشتر ژن‌های هاب فهرست‌شده در جدول ۱ در مسیرهای وابسته به ترشح پانکراس درگیرند. مسیرهای اصلی شناسایی شده توسط KEGG اهمیت این ژن‌ها را تأیید می‌کند (شکل ۶). یکی دیگر از مسیرهای دخیل در NAFLD، سنتز و تجزیه چربی است. افزون بر این، در این تحقیق نتایج تجزیه‌وتحلیل GO و KEGG از طریق تحلیل خوشه‌ای شبکه تأیید شد. این تجزیه‌وتحلیل به ما امکان داد تا گروه‌های به‌هم‌پیوسته ژن‌هایی را که از دید عملکردی وابسته‌اند، شناسایی و درک جامع‌تری از شبکه‌های ژنی درگیر در NAFLD ارائه کنیم.

تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای شبکه

نتایج تحلیل خوشه‌ای شبکه‌های زیستی، یکی از مهم‌ترین راهبردها برای تعیین الگوهای عملکردی، و پیش‌بینی کمپلکس‌های پروتئینی و نشانگرهای زیستی شبکه، ساختار شبکه‌های زیستی را آشکار می‌کند. استفاده از الگوریتم‌های CytoCluster به نیاز کاربر بستگی دارد. در این پژوهش از شش الگوریتم خوشه‌بندی استفاده شد. الگوریتم IPCA، یک الگوریتم خوشه‌بندی مبتنی بر چگالی، زیرگراف‌های متراکم را در شبکه‌های تعامل پروتئین نشان می‌دهد. وزن هر یال با شمارش همسایه‌های مشترک دو گره متصل به آن محاسبه می‌شود. مجموع

جدول ۲. خلاصه خوشه‌ها (رتبه ۱ تا ۴) حاصل از تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای از زیرشبکه ژن‌های هاب بیان‌شده در NAFLD با استفاده از برنامه CytoCluster.

عملکرد	تعامل (یال)	گره	رتبه	خوشه
ترشح پانکراس لیپولیز و سنتز چربی سوخت‌وساز نشاسته و ساکارز پروتئاز و سنتز پروتئین سوخت‌وساز گلیسرولیپید	۹۱	۱۵	۱	۱
لیپولیز و سنتز چربی ترشح پانکراس پروتئاز و سنتز پروتئین سوخت‌وساز گلیسرولیپید	۹۲	۱۵	۲	۲
لیپولیز و سنتز چربی ترشح پانکراس پروتئاز و سنتز پروتئین سوخت‌وساز گلیسرولیپید	۸۵	۱۴	۳	۳
مقاومت به انسولین بیماری کبد چرب غیرالکلی	۳	۳	۴	۴

بحث و نتیجه‌گیری

SREBP_1c و NAFLD

با توجه به جدول ۱ و شکل ۲ تأیید کردیم یکی از ژن‌های هاب شناسایی شده، PNLIP است. افزایش بیان PNLIP در موش‌های ناشتا از طریق مسیر پیام‌رسانی PPAR α دیده شده است (۳۰). بنابراین، این ژن و خوشهٔ اثبات شده به‌عنوان رتبهٔ برتر هاب و خوشه با تحلیل چندین الگوریتم در شبکه می‌تواند نقش مهمی در توسعه و یا درمان NAFLD داشته باشد. همان‌طور که گفتیم توجه ما بر مسیرهای خوشه است و ما تعامل مستقیم ژن هاب با ژن‌های موردنظر را تأیید کردیم. تعامل بین عوامل اپی‌ژنتیک - NAFLD و شناسایی مسیرهای سازگاری با شرایط گوناگون فشارآفرین از طریق برهمکنش‌های سطح مولکولی بین اجزای سلولی و ژن‌ها قابل درک است. مطالعهٔ برهمکنش‌ها در سطوح سلولی و مولکولی مسیرهای وابسته به NAFLD درگیر را نشان داد. تجزیه و تحلیل پژوهش‌های پیشین نشان داد پنج ژن خاص دارای فعل و انفعالات حیاتی‌اند و تعداد چشمگیری در تعاملات مستقیم ارتباط برقرار می‌کنند که می‌تواند به‌عنوان مسیر اصلی در نظر گرفته شود. این ژن‌ها عوامل رونویسی‌اند (TFs) که گروه ویژه‌ای از پروتئین‌ها و گیرنده‌های هسته‌ای هستند که بر رونویسی تأثیر می‌گذارند و به‌طور غیرمستقیم مسئول کنترل سنتز پروتئین هستند. کل رشته DNA هرگز تحت فرایند رونویسی قرار نمی‌گیرد، بلکه تنها قطعه‌ای است که پروتئین ویژه‌ای را رمزگذاری می‌کند که در بدن نیاز به آن وجود دارد. این پدیده از جمله عوامل رونویسی تعیین می‌شود. پنج مورد از TFها نقش مهمی در هومئوستاز لیپید و کلسترول دارند: گیرندهٔ X کبد-(LXR- α)، α گیرندهٔ- α فعال شده با تکثیر پراکسی زوم (PPAR-

α)، گیرندهٔ γ فعال شده با تکثیر پراکسی زوم (PPAR- γ)، پروتئین اتصال‌دهنده CCAAT/تقویت‌کننده (C/EBP α) و پروتئین c1 متصل به عنصر تنظیم‌کنندهٔ استرول (SREBP-1c) (۱۰). ثابت کردیم یکی از مسیرهای اصلی ما SREBF1 و PPAR α است. بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) که با انباشت بیش از اندازهٔ چربی کبدی، التهاب و فشار اکسایشی مشخص می‌شود، به یک بیماری همه‌گیر کبدی در حال رشد در سراسر جهان تبدیل شده است که نزدیک به یک‌چهارم کل جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۱). کبد به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ مرکزی هومئوستاز چربی، مسئول هماهنگ‌سازی سنتز اسیدهای چرب، انتقال و توزیع مجدد بعدی به بافت‌هاست. این فرایندها توسط یک تعامل پیچیده بین هورمون‌ها، گیرنده‌های هسته‌ای و عوامل رونویسی تنظیم می‌شوند. اگر یک یا چند مسیر از بین برود، هومئوستاز لیپیدهای کبد مختل می‌شود. انباشت بیش از اندازهٔ چربی کبدی ناشی از عدم تعادل بین جذب و پاکسازی لیپید است که به افزایش سنتز و جذب لیپید و کاهش اکسایش لیپید منجر می‌شود (۳۲). افزایش لیپوژنز de novo (DNL) یکی از ویژگی‌های پاتولوژیک آشکار NAFLD است.

سه پروتئین متصل‌شونده به عنصر استرول (SREBPs)، SREBP1a، SREBP1c، و SREBP2، در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی مختلف از عملکردهای متعارف، مانند تنظیم رونویسی بیوسنتز اسیدهای چرب، تشکیل شبکهٔ آندوپلاسمی (ER) و استرس آپوپتوز نقش دارند. در این بین پروتئین c1 اتصال‌دهندهٔ عنصر استرول (SREBP1c) عامل اصلی رونویسی است که در تنظیم لیپوژنز de novo کبدی نقش

می‌کند. نشان داده شد که LXR برای فعال‌سازی وابسته به انسولین در SREBP1c مورد نیاز است (۳۴) مسیر پیام‌رسانی انسولین با فسفوریلاسیون تیروزین با واسطه‌گیرنده سوبسترای گیرنده انسولین ۱ و ۲ (IRS1/IRS2) شروع می‌شود و به دنبال آن فعال‌سازی PI3K توسط IRS آغاز می‌شود که سبب تولید فسفاتیدیل اینوزیتول-۳،۴،۵-PI3-تری فسفات با پروتئین کیناز B (AKT/PKB) تعامل می‌کند و آن را به غشایی که در آن فعال می‌شود، جذب می‌کند. به خوبی شناخته شده است که انسولین SREBP ها را در سطوح مختلف از جمله پایداری، پردازش پروتئولیتیک با کاهش بیان INSIG2، ارتقای عملکرد کیناز p70 S6 ناشی از mTORC1 و رونویسی mRNA ژن SREBP تنظیم می‌کند. در همین زمینه، سطوح SREBP1-c در موش‌ها در طول ناشتایی با محتوای انسولین کم کاهش می‌یابد، که این واقعیت را تأیید می‌کند که انسولین به شدت رونویسی SREBP1-c را القا می‌کند (۳۳).

SREBP1-c علاوه بر تنظیم هومئوستاتیک توسط سطوح کلسترول، در پایین دست پیام‌رسانی مسیرهای سوخت‌وسازی قرار دارند. برای نمونه در کبد، هم بیان و هم فعال‌سازی پروتئولیتیک SREBP1c از طریق مسیر مکانیکی را پامایسین (mTOR) انسولین، فسفاتیدیل نوزیتول ۳-کیناز (PI3K) تحریک می‌شود و به عنوان بخشی از سازوکاری که گلوکز اضافی را به لیپید تبدیل می‌کند که برای ذخیره انرژی مورد نیاز هستند (۳۴). گفتیم LXR برای فعال‌سازی وابسته به انسولین در SREBP1c مورد نیاز است. گیرنده X کبد (LXR α) و SREBP1 عملکردهای حیاتی را در هومئوستاز لیپید کبد ایفا می‌کنند. LXR α عضوی از گیرنده‌های هسته‌ای و وابسته به خانواده بزرگ

دارد. این عامل رونویسی به عنوان یک پیش‌ساز غیرفعال سنتز شده و بلوغ پروتئولیتیک آن در غشای شبکه آندوپلاسمی پس از تحریک توسط انسولین آغاز می‌شود (۳۳). با توجه به شکل ۱ یکی از آنزیم‌هایی که سنتز اسیدهای چرب کبدی را کاتالیز می‌کند، سنتاز اسید چرب (FASN)، در سطح رونویسی با فعال‌سازی SREBP1c توسط انسولین و از طریق پروتئین متصل‌کننده به عنصر پاسخ‌دهنده به کربوهیدرات (ChREBP) کنترل شده و توسط متابولیت‌های گلوکز فعال می‌شود. این شبکه به نوبه خود توسط LXR کنترل می‌شود که به طور مستقیم بیان FASN را القا می‌کند. گفتنی است که وجود همزمان هیپرانسولینمی به طور چشمگیری سبب افزایش لیپوژنز de novo در NAFLD با فعال شدن گیرنده انسولین می‌شود و سپس چندین آبشار پیام‌رسانی را فعال می‌کند که به ارتقای ژن‌های لیپوژنیک از جمله FASN می‌انجامد و در نتیجه سبب سنتز اسیدهای چرب و استرول‌ها می‌شود (۳۳). انباشت بیش از اندازه تری‌گلیسیرید در کبد بیشتر به دلیل افزایش دسترسی به اسیدهای چرب آزاد از طریق لیپولیز بافت چربی موجب مقاومت به انسولین می‌شود. در تحلیل‌های قسمت‌های قبل بیان شد (جدول ۲) که مسیر سنتز و تجزیه چربی جزء مسیرهای مشترک بین رتبه‌بندی کشف شده بود و همچنین مسیر مقاومت به انسولین جزء مسیرهای اصلی ژن‌های موردنظر در این پژوهش هستند، انسولین یک هورمون کلیدی است که رونویسی SREBP1c، پردازش پروتئولیتیک و DNL را در حالت پس از غذا هدایت می‌کند. انسولین رونویسی SREBP1c را از طریق سازوکارهای ناشناخته تنظیم می‌کند، که شامل کاهش رونویسی وابسته به AKT، عامل حفظ ER Insig-2a است که انتقال پروتئین فعال‌کننده برش SREBP1c را به گلژی مسدود

که سبب پیشرفت NAFLD می‌شود. بیماران NAFLD سطوح سرامیدهای را افزایش می‌دهند که با مقاومت به انسولین، التهاب و تولید گونه‌های فعال اکسیژن وابسته است. چهارم، پالمیتات به‌طور مستقیم دامنه پیرین خانواده گیرنده گره مانند (NLR) حاوی ۳ (NLRP3) التهابی را فعال می‌کند (۳۳).

این یافته‌ها، به‌ویژه شناسایی تعاملات اپی‌ژنتیک و مسیرهای تنظیمی، به درک بهتر سازوکارهای مولکولی NAFLD و توسعه راهبردهای درمانی جدید کمک می‌کند.

PPAR α و NAFLD

توضیحات مذکور نشان می‌دهد که وقتی اسیدهای چرب بیش از اندازه در سلول‌های کبدی ذخیره شوند، ظرفیت اکسایش تضعیف می‌شود، در نتیجه هومئوستاز لیپید کبدی برای پیشگیری و درمان NAFLD ضروری است (۳۲). بنابراین، تنظیم بیوسنتز اسیدهای چرب و سوخت‌وساز کلاسترول می‌تواند نقش مهمی در درمان و پیشگیری از هیپرلیپیدمی داشته باشد. هومئوستاز چربی کبد را می‌توان با مسیرهای انتقال پیام متعدد تنظیم کرد، که یکی از آنها گیرنده α فعال شده توسط پراکسی زوم (PPAR α) است (۳۶). با توجه به این گفته نقش گیرنده فعال شده با تکثیر پراکسی زوم PPAR α ، به‌عنوان یک گیرنده هسته‌ای در تنظیم رونویسی سوخت‌وساز لیپید، تعادل انرژی و التهاب روشن می‌شود. PPAR α در اکسایش لیپید و انتقال چربی نقش دارد که بیشتر در کبد، بافت چربی قهوه‌ای، قلب و کلیه بیان می‌شود. به‌نظر می‌رسد بیان PPAR α در کبد سالم افزایش و در بیماران NAFLD کاهش یابد. فعال شدن آن سبب بیان ژن‌های وابسته به اکسایش بتا و انتقال لیپید می‌شود که شاید رسوب چربی در کبد چرب را کاهش دهد. نشان داده شده

عوامل رونویسی فعال شده با لیگاند است که در نقطه اتکای لیپوژنز قرار دارند، هنگامی که بدن پیام لیپوژنز مانند تحریک انسولین یا کاهش استرول را احساس می‌کند، SREBP1 از طریق وزیکول‌هایی با واسطه کمپلکس پروتئین پوششی II (COPII) به گلژی منتقل می‌شود و سپس به سمت هسته حرکت می‌کند تا رونویسی FASN را القا کند، در نتیجه سنتز لیپید تحریک می‌شود. در بسیاری از موارد، LXR α بیان SREBP1 را تنظیم می‌کند (۳۵)، زیرا SREBP-1c هدف LXR- α است، زیرا پروموتور ژن SREBP-1c حاوی عنصر واکنش LXR (LXRE) است (۱۰). اسید چرب سنتاز (FASN) آنزیمی در مسیر لیپوژنز (DNL) *de novo* است که متابولیت‌های قندهای رژیمی، استیل کوآنزیم A (CoA) و مالونیل-کوآ را به پالمیتات، یک اسید چرب اشباع تبدیل می‌کند. پالمیتات تولیدشده توسط FASN چندین سرنوشت احتمالی در کبد بیماران مبتلا به NAFLD دارد؛ اول، در سلول‌های کبدی، عاملی برای سنتز اسیدهای چرب و لیپیدهای پیچیده‌تری مانند تری‌گلیسیرید است که استئاتوز ایجاد می‌کند. دوم، مسیر DNL برای فعال‌سازی و فیبروز سلول‌های ستاره‌ای کبدی (hHSC) ضروری است و مهار آن به سکون HSC و کاهش تولید کلاژن منجر می‌شود. HSCs غنی از قطرات لیپید حاوی استرهای رتینیل بوده و در کبد طبیعی ساکن هستند. آسیب کبدی سبب تمایز HSCها به سلول‌های شبه میوفیبروبلاست می‌شود که لیپید را از دست می‌دهند و فنوتیپ فیبروژنیک، انقباضی و تکثیری پیدا می‌کنند. سوم، پالمیتات بستری برای سنتز لیپوتوکسین‌های پیش‌التهابی و پیش‌فیبروتیک از جمله سرامیدها، اسفنگومیلین‌ها و دی‌آسیل گلیسرول‌ها (DAGs) است. سمیت چربی از عوامل اصلی سازوکارهای بیماری‌زایی است

(HFD) یا حالت ناشتا افزایش می‌یابد. اولین مرحله اکسایش بتا پراکسیزومال توسط (Acox1) انجام می‌شود که اشباع شدن آسیل-CoA را به ۲-trans- enoyl-CoA کاتالیز می‌کند. Acox1 ترجیحاً اسیدهای چرب با زنجیره مستقیم را کاتابولیز می‌کند (۳۹). ناحیه تنظیم‌کننده پروموتور ژن ACOX حاوی یک PPRE است که داوطلبانه به ایزوفرم PPAR α متصل می‌شود و مسئول کوتاه کردن اسیدهای چرب با زنجیره بسیار بلند است (۳۱). فعالیت PPAR کبدی بیشتر با ۱. در دسترس بودن آگونیست، ۲. سطح بیان نسبی آنها در سلول، ۳. دستگاه اپیژنومیک و رونویسی خاص سلول، ۴. وضعیت تغذیه و ۵. آهنگ شبانه‌روزی تعیین می‌شود. در کبد، PPAR α ایزوتیپ غالب است (۴۰). بنابراین با انباشت اسیدهای چرب در سلول‌های کبدی، مسیرهای اکسایش اسیدهای چرب مانند اکسایش بتا در پراکسی زوم‌ها و اکسایش بتا در شبکه آندوپلاسمی فعال می‌شوند. پس فعال‌سازی مسیر PPAR α می‌تواند یک رویکرد درمانی برای درمان کبد چرب و دیابت نوع دو باشد (۴۱). روی هم‌رفته فعال‌سازی نظام‌مند PPAR α با ترویج اکسایش اسیدهای چرب (FAO) و گرم‌زایی به اتلاف انرژی منجر می‌شود (۴۰). نقش PPAR α کبدی در پاسخ تطبیقی به انتقال تغذیه/ناشتا با تنظیم سوخت‌وساز FA، لیپید و لیپوپروتئین به‌خوبی توضیح داده شده است. PPAR α با تطبیق مصرف سوخت (به‌ویژه FAS/لیپیدها) و ذخیره‌سازی با وضعیت تغذیه‌ای، نقش مهمی در حفظ انعطاف‌پذیری سوخت‌وسازی ایفا می‌کند. در طول دوره ناشتایی، PPAR α کبدی جذب و استفاده (بیشتر از طریق اکسایش) FAs در گردش را که بیشتر آنها از لیپولیز WAT ناشی می‌شوند، افزایش می‌دهد. اهداف مستقیم PPAR α شامل پروتئین‌های منتقل‌کننده FA مانند CD36،

PPAR α و آنزیم‌های محدودکننده سرعت وابسته به اکسایش تنظیم‌شده توسط آن، CPT1 و ACOX 1، در این بیماری کاهش می‌یابد (۳۲). PPAR α وابسته به خانواده عامل رونویسی گیرنده هسته‌ای (PPARs) و شامل سه ایزوفرم PPAR α ، PPAR β/δ و PPAR γ است. از همه PPAR ها، PPAR α وابسته به پاتوژن NAFLD است. از آنجایی که این یک حسگر سوخت‌وسازی است که از طریق ناشتایی تنظیم می‌شود و مسئول تنظیم رونویسی ژن‌های بتا-اکسایش است؛ بنابراین بیان تغییر یافته این عامل رونویسی موجب ایجاد لیپوژن می‌شود (۳۷). PPAR α تنظیم‌کننده اصلی سوخت‌وساز لیپید از طریق تنظیم ژن‌های بی‌شماری است که در جذب و فعال شدن اسیدهای چرب، اکسایش اسیدهای چرب میتوکندری و پراکسی زومی، کتوژن، گردش تری‌گلیسیرید، گلوکونئوژن و سنتز / ترشح صفرا نقش دارد، افزون بر این سوخت‌وساز گلوکز و هومئوستاز، کنترل گلیسرول برای گلوکونئوژن، تمایز و تکثیر سلولی، و فعالیت پیش‌التهابی و ضدالتهابی را می‌توان به PPAR α نسبت داد. PPAR α بیان عامل رشد فیبروبلاست ۲۱ (FGF21) را در هنگام گرسنگی تنظیم کرده و به سرکوب پاسخ فاز حاد و التهاب در کبد کمک می‌کند و تنظیم‌کننده اصلی سوخت‌وساز چربی کبد در شرایط ناشتاست. همچنین PPAR α هدف بالادستی SREBP1 و FASN برای حفظ هومئوستاز چربی کبد است. یک تحلیل RNA-seq نشان داد مسیر پیام‌رسانی PPAR α در سرکوب التهاب کبد امتیاز بالاتری نسبت به مسیرهای دیگر دارد (۳۸). PPAR α همچنین فعال‌کننده اصلی رونویسی ژن‌های دخیل در اکسایش بتا میتوکندری مانند ACOX1 است. آنزیم اکسیداز (ACOX1) یک آنزیم محدودکننده سرعت اکسایش بتا پراکسیزومی است که در کبد غنی می‌شود و با رژیم پرچرب

التهاب، بهبود سوخت‌وساز چربی و کاهش رسوب چربی در کبد کمک کند. این نتایج می‌توانند پایه‌ای برای پژوهش‌های بیشتر و توسعه درمان‌های جدید برای NAFLD و سایر اختلالات سوخت‌وسازی باشند.

NAFLD و مسیر سلولی در فعالیت ورزشی

چهار دلیل اصلی برای افزایش سطح چربی کبد وجود دارد؛ اولاً، تبدیل کربوهیدرات‌ها، مانند فروکتوز به اسیدهای چرب توسط سلول‌های کبدی، یکی از منابع اصلی اسیدهای چرب در کبد است؛ ثانیاً، FFAهای آزادشده در اثر تجزیه تری‌گلیسیرید در بافت چربی از طریق جریان خون به کبد منتقل شده و به افزایش اسیدهای چرب کبد منجر می‌شوند؛ ثالثاً، کاهش اکسایش بتا اسیدهای چرب به انباشت اسیدهای چرب در کبد کمک می‌کند. در نهایت، اختلال در سنتز تری‌گلیسیرید از اسیدهای چرب نیز به افزایش اسیدهای چرب در کبد منجر می‌شود (۴۲).

با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ تأیید کردیم فعالیت ورزشی با ژن‌های یادشده، تعامل بالایی دارد. اصلاح سبک زندگی برای دستیابی به کاهش وزن اولین مرحله درمان در بیماران مبتلا به NAFLD است (۴۳). آثار محافظتی فعالیت بدنی در برابر NAFLD و NASH را می‌توان به سازوکارهای مختلفی از جمله کاهش محتوای چربی کبدی، فیبروز، التهاب، آپوپتوز و فشار اکسایشی نسبت داد (۴۴). توصیه‌های بالینی برای بیماران مبتلا به NAFLD شامل کاهش مصرف کالری و فعالیت بدنی منظم با هدف ۱۵۰ تا ۳۰۰ دقیقه با شدت متوسط یا ۷۵ تا ۱۵۰ دقیقه ورزش هوازی با شدت شدید در هفته در نظر گرفته شود. تمرین مقاومتی می‌تواند مکمل ورزش هوازی باشد، اما جایگزین آن نیست. تأثیر فعالیت ورزشی بر NAFLD می‌تواند تأثیر رژیم کم‌کالری را افزایش

CPT1A, FABP4, SLC27A1, ترانسفرازهایی مانند FAO و دهیدروژنازهای آسیل‌کوآ چرب برای افزایش میتوکندری و در نهایت کتوژنز می‌شوند. PPAR α همچنین برای القای هیپاتوکین FGF21 در پاسخ به ناشتایی و همچنین در مرحله اولیه پس از غذا، در ارتباط متقابل با پروتئین متصل‌کننده به عنصر پاسخ‌دهنده به کربوهیدرات (ChREBP) مورد نیاز است، از این رو گلوکز گردش خون را هماهنگ می‌کند. PPAR α با ایجاد اتوفازای (به‌ویژه لیپوفازای) در حالت ناشتا، در هماهنگی با گیرنده اسید صفراوی هسته‌ای FXR که اتوفازای را در حالت تغذیه سرکوب می‌کند، در حفظ تعادل انرژی کبدی شرکت می‌کند. در طول مرحله تغذیه/فعال، PPAR α لیپوژنز کبدی را برای ذخیره اسیدهای چرب به‌عنوان ذخایر سوخت تری‌گلیسیرید، به‌ویژه با افزایش بیان حامل سیترات (SLC25A1) که استیل-CoA را از میتوکندری به سیتوزول برای سنتز FA انتقال می‌دهد، القا می‌کند. PPAR α همچنین بلوغ عامل رونویسی SREBP1C را از پروتئین پیش‌ساز ۱۲۰ کیلودالتون افزایش می‌دهد و در نتیجه به‌طور غیرمستقیم بیان ژن‌های هدف لیپوژنیک را افزایش می‌دهد. با افزایش جذب و اکسایش کبدی FA و تغییر بیان آپولیپوپروتئین‌ها، درحالی‌که همزمان فعالیت لیپوپروتئین لیپاز را القا می‌کند، فعال‌سازی PPAR α به بهبود تعادل لیپید پلاسما منجر می‌شود، همان‌طور که با کاهش VLDL و کلسترول HDL بالاتر نشان داده می‌شود (۴۰، ۴۱). یافته‌های ما نشان می‌دهند که انباشت بیش از اندازه اسیدهای چرب در سلول‌های کبدی به تضعیف ظرفیت اکسایش منجر می‌شود که این امر نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت NAFLD دارد. در نتیجه، این پژوهش نشان می‌دهد که PPAR α یک هدف درمانی مهم برای بهبود وضعیت بیماران NAFLD است و فعال‌سازی این مسیر می‌تواند به کاهش

دهد. فعالیت بدنی، مستقل از کاهش وزن، می‌تواند NAFLD را با کاهش محتوای چربی کبد، تا حدی با بهبود حساسیت محیطی بدن به انسولین، کاهش لیپوژنز *de novo* کبدی، کاهش لیپولیز چربی و کاهش انتقال اسیدهای چرب آزاد به کبد، بهبود بخشد. روی هم رفته فعالیت ورزشی در پیشگیری از NAFLD از محدودیت کالری ساده‌تر سودمند است (۴۴، ۴۳).

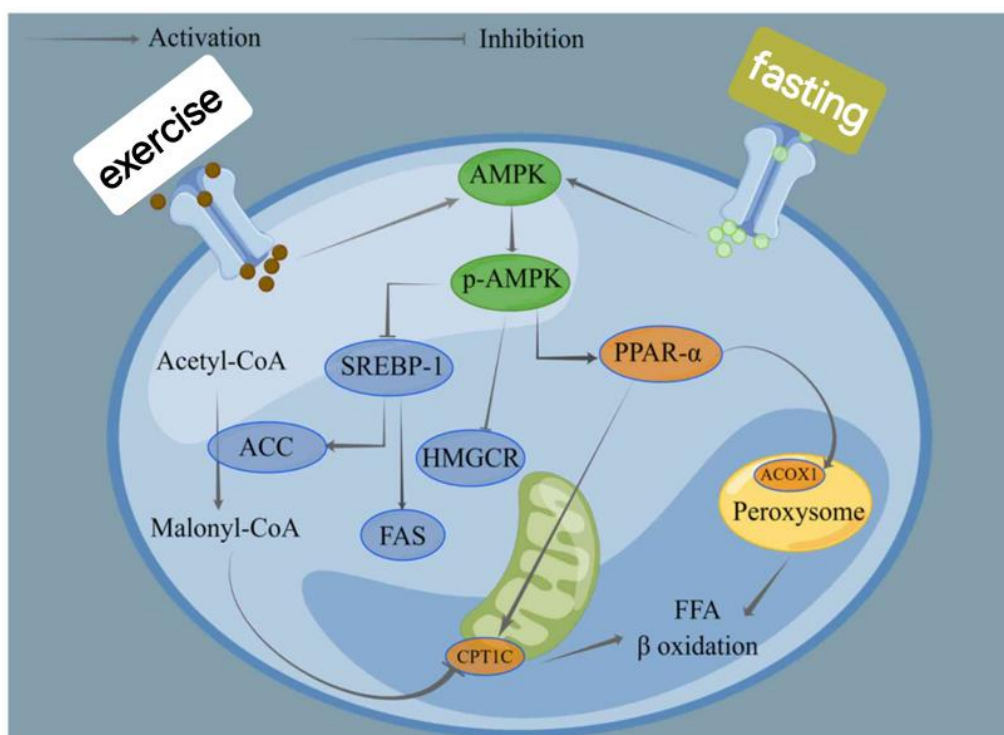
با توجه به نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده شد پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین ۵'-مونوفسفات (AMPK) با فعالیت ورزشی فعال می‌شود و SREBP-1c را سرکوب می‌کند، در نتیجه انباشت چربی در کبد موش HFD را کاهش می‌دهد. لی و همکاران نشان دادند که فعالیت ورزشی موجب کاهش انباشت چربی ناشی از SREBP-1 در کبد از طریق مسیر AMPK می‌شود (۴۵). فعال‌سازی AMPK از دایمر شدن استیل کوآ کربوکسیلاز (ACC) جلوگیری می‌کند و سپس فعالیت آن را کاهش می‌دهد و مانع از سنتز FA می‌شود. همزمان، کاهش مقادیر مالونیل کوآنزیم A (مالونیل-CoA) اکسایش FA را در میتوکندری تسریع می‌کند، این فرایند توسط PPAR α کنترل می‌شود که نوسانات در وضعیت انرژی بدن را تشخیص می‌دهد و استفاده از FA، میزان سنتز کتون و ذخیره چربی را در شرایط انرژی کم و زیاد تنظیم می‌کند. افزون بر این، PPAR α عاملی در انتقال FA میتوکندری و تنظیم بتا اکسایش است. پژوهش‌ها نشان داده است که PPAR α می‌تواند بیان CPT1، CPT2 و کارنیتین آسیل کارنیتین ترانسلوکاز (CACT) را تنظیم کند، در نتیجه لیپولیز با واسطه لیپوپروتئین لیپاز (LPL) برای کاهش سطح تری گلیسیرید (TG) و کاهش ترشح آپولیپوپروتئین C مهارکننده LPL کبدی را افزایش می‌دهد. در نتیجه، AMPK و PPAR α نقش مهمی در حفظ تعادل

سوخت‌وساز لیپید دارند. نشان داده شده است که مسیرهای پیام‌رسانی AMPK و PPAR α می‌توانند بیان و فعالیت آنزیم‌های حیاتی درگیر در سوخت‌وساز لیپید مانند ACC، FASN و CPT1 را تعدیل کنند. به‌عنوان یک حسگر حیاتی انرژی سلولی، AMPK برای کنترل واکنش‌های التهابی بدن، فشار اکسایشی، سوخت‌وساز گلوکز و سوخت‌وساز لیپید ضروری است. هدف قرار دادن AMPK به‌عنوان یک راهبرد درمانی بالقوه برای درمان و پیشگیری از بیماری کبد چرب غیرالکلی در پستانداران ایجاد شده است. با تنظیم بیان ژن‌های دخیل در لیپوژنز، تولید تری گلیسیرید، انتقال معکوس کلسترول، لیپولیز و اکسایش FA، PPAR α همچنین نقش‌های مختلفی در سوخت‌وساز لیپید ایفا می‌کند. فعال‌سازی PPAR α می‌تواند یک رویکرد دارویی ضروری برای کاهش کبد چرب و دیابت نوع دو باشد. بر عکس، مهار PPAR α سنتز لیپیدهای کبدی را تشدید می‌کند. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که AMPK برای فعال کردن PPAR α در موش مورد نیاز است (۴۶).

یافته‌ها نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی می‌تواند سبب کاهش انباشت چربی در کبد از طریق فعال‌سازی AMPK و سرکوب مسیر SREBP-1c شود. این سازوکارها به کاهش سنتز اسیدهای چرب و افزایش اکسایش آنها منجر می‌شود. در نهایت، این یافته‌ها نشان می‌دهد که یک رویکرد چندجانبه شامل اصلاحات سبک زندگی، فعالیت ورزشی منظم و هدف‌گیری مسیرهای سوخت‌وسازی کلیدی، می‌تواند در مدیریت و درمان NAFLD مؤثر باشد. پژوهش‌ها در این زمینه می‌تواند به توسعه راهکارهای درمانی جدید و بهبود روش‌های پیشگیری و مدیریت بیماری‌های سوخت‌وسازی کمک کند.

جدول ۳. برخی از پژوهش‌های انجام گرفته در NAFLD همراه با فعالیت ورزشی

رفرنس	نتیجه	عملکرد مولکولی	روش تحقیق	قرارداد ورزشی
(۴۶)	توده چربی و تری گلیسیرید کبد به طور معناداری کاهش یافت.	Cpt1, p-AMPK, ↑ and p-AMPK/AMPK SREBP-1 ↓	(۱) HFD + کم تحرک (۲) HFD + ورزش هوازی (۳) HFD + تمرین مقاومتی	ورزش روی نوار گردان: ۵۰ دقیقه با ۶۵ تا ۷۰ درصد VO2 max، پنج روز در هفته به مدت هشت هفته. تمرین بالا رفتن از نردبان: ۶۵ تا ۷۰ درصد از حداکثر وزن برای بالا رفتن از نردبان به دم موش (سرب) متصل شد، پنج روز در هفته به مدت هشت هفته.
(۴۷)	کاهش اندازه فطرات چربی کبد، بازگشت استئاتوز ناشی از HFD و کاهش چشمگیر ۳۰ درصدی فیروز.	Srebf1, Srebf2, ↓ Cpt1a, Ppar-γ and Cd36 expression Ppar-α, Ppar-δ, and ↑ Cyp4a-10 were enhanced	(۱) رژیم غذایی گروه کنترل (۲) کنترل رژیم غذایی + تمرین استقامتی (۳) HFD و کم تحرک (۴) HFD + تمرین شده استقامتی (۵) HFD و سپس به رژیم غذایی کنترل + تمرین استقامتی تغییر یافت	تمرین استقامتی: موش‌ها به مدت ۲۶ دقیقه در روز می‌دویدند، یک دقیقه با سرعت شش متر در دقیقه، یک دقیقه با سرعت هشت متر در دقیقه، ۲۲ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و دو دقیقه ۱۲ متر در دقیقه، پنج روز در هفته، هشت هفته (به طور متوسط تا ۷۰ درصد حداکثر VO2 آنها).
(۴۸)	کاهش انباشت چربی کبد و کاهش سمیت چربی.	Srebp1c, Scd1, ↓ Fas, Cd36 and Acox1 gene expression MKK4/JNK ↓ expression MIF ↑	(۱) رژیم غذایی معمولی (۲) HFD (۳) HFD + Ex	قرارداد ورزشی شنا: پنج روز در هفته، ۶۰ دقیقه در روز به مدت ۱۶ هفته.
(۴۹)	مسیر پیام‌رسانی AMPK-PPAR-α/PPAR-γ را بهبود بخشید.	AMPK-PPAR-↑α/ PPAR-γ		ورزش هوازی دویدن با نوار گردان، ۶۰ درصد حداکثر سرعت، هفت روز در هفته به مدت هشت هفته



شکل ۷. شکل شماتیک تأثیر فعالیت ورزشی و ناشتایی بر سازوکار ژن‌های مورد نظر (۴۲)

منابع

1. Guo Z, Yu X, Fang Z, Yang K, Liu C, Dong Z, Liu C. The role of endoplasmic reticulum stress-related genes in the diagnosis and subtyping of non-alcoholic fatty liver disease. *Gen Physiol Biophys*. 2024 Mar;43(2):85-102. doi: 10.4149/gpb_2023042. PMID: 38477602
2. Kounatidis D, Vallianou NG, Geladari E, Panoilia MP, Daskou A, Stratigou T, Karampela I, Tsilingiris D, Dalamaga M. NAFLD in the 21st Century: Current Knowledge Regarding Its Pathogenesis, Diagnosis and Therapeutics. *Biomedicines*. 2024; 12(4):826. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040826>
3. Yasmin T, Rahman MM, Khan F, Kabir F, Nahar K, Lasker S, Islam MD, Hossain MM, Hasan R, Rana S, Alam MA. Metformin treatment reverses high fat diet- induced non-alcoholic fatty liver diseases and dyslipidemia by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory pathways. *Biochem Biophys Rep*. 2021 Nov 17;28:101168. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101168. PMID: 34825068; PMCID: PMC8605070.
4. Yousof TR, Bouchard CC, Alb M, Lynn EG, Lhoták S, Jiang H, MacDonald M, Li H, Byun JH, Makda Y, Athanasopoulos M, Maclean KN, Cherrington NJ, Naqvi A, Igdoura SA, Krepinsky JC, Steinberg GR, Austin RC. Restoration of the ER stress response protein TDAG51 in hepatocytes mitigates NAFLD in mice. *J Biol Chem*. 2024 Feb;300(2):105655. doi: 10.1016/j.jbc.2024.105655. Epub 2024 Jan 16. PMID: 38237682; PMCID: PMC10875272.-09

تحقیق حاضر پنج ژن هاب را در NAFLD و چهار ژن هاب در NAFLD را همراه با فعالیت ورزشی شناسایی کرد. بیشتر آنها در مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به ترشح پانکراس و سنتز و لیپولیز چربی نقش دارند. ارتباط GO عملکردی با مسیرهای KEGG نشان داده شد و دریافتیم که بسیاری از عملکردهای زیستی تغییر یافته توسط فرایندهای سوخت‌وسازی کنترل می‌شوند. این تجزیه و تحلیل‌ها همچنین اهمیت بالقوه ER سلولی را در پاتوژنز NAFLD، که در پیام‌رسانی بیماری نقش دارد، تأیید کرد. نتایج این پژوهش شاید بینش جدیدی در درمان بیماری NAFLD در آینده ارائه دهد و نتایج پویایی تعامل کبد چرب و فعالیت ورزشی نیز می‌تواند برای کنترل مؤثر NAFLD استفاده شود. افزون بر این، ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند نشانگرهای زیستی تشخیصی امیدوارکننده‌ای برای NAFLD باشند.

تشکر و قدردانی

از نشریه فیزیولوژی ورزشی و فعالیت بدنی که فرصت ارائه این مطالب را در اختیار ما قرار دادند، صمیمانه سپاسگزاریم.

حمایت مالی

در نوشتن این مقاله از هیچ کمک مالی استفاده نشده است.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان به‌طور مساوی در انجام این پژوهش مشارکت داشتند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

5. Zhang L, Fan JB, Zhang XW, Liu Y, Shi WY, Hidayat K, Xu JY, Yuan L, Qin LQ. Organic selenium ameliorates non-alcoholic fatty liver disease through 5-hydroxytryptamine/bile acid enterohepatic circulation in mice. *Journal of Functional Foods*. 2023 Jul 1;106:105596. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105596>
6. Powell, E. E., Wong, V. W., & Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet (London, England)*, 397(10290), 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
7. Zeng Q, Liu CH, Ampuero J, Wu D, Jiang W, Zhou L, Li H, Bai L, Romero-Gómez M, Tang H. Circular RNAs in non-alcoholic fatty liver disease: Functions and clinical significance. *RNA Biol*. 2024 Jan;21(1):1-15. doi: 10.1080/15476286.2023.2290769. Epub 2023 Dec 19. PMID: 38113132; PMCID: PMC10761141.
8. Ezhilarasan D. Deciphering the molecular pathways of saroglitazar: A dual PPAR α/γ agonist for managing metabolic NAFLD. *Metabolism*. 2024 Jun;155:155912. doi: 10.1016/j.metabol.2024.155912. Epub 2024 Apr 11. PMID: 38609038.
9. Huang, W. C., Xu, J. W., Li, S., Ng, X. E., & Tung, Y. T. (2022). Effects of exercise on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and lipid metabolism in ApoE knockout mice. *Nutrition & metabolism*, 19(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00644-w>
10. Danielewski, M.; Rapak, A.; Kruszyńska, A.; Małodobra-Mazur, M.; Oleszkiewicz, P.; Dzimira, S.; Kucharska, A.Z.; Słupski, W.; Matuszewska, A.; Nowak, B.; et al. Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Fruit Extract Lowers SREBP-1c and C/EBP α in Liver and Alters Various PPAR- α , PPAR- γ , LXR- α Target Genes in Cholesterol-Rich Diet Rabbit Model. *Int. J. Mol. Sci*. 2024, 25, 1199. <https://doi.org/10.3390/ijms25021199>
11. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
12. Li M, Li D, Tang Y, Wu F, Wang J. CytoCluster: A Cytoscape Plugin for Cluster Analysis and Visualization of Biological Networks. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(9):1880. <https://doi.org/10.3390/ijms18091880>
13. Binenbaum, I., Atamni, H. A., Fotakis, G., Kontogianni, G., Koutsandreas, T., Pilalis, E., Mott, R., Himmelbauer, H., Iraqi, F. A., & Chatziioannou, A. A. (2020). Container-aided integrative QTL and RNA-seq analysis of Collaborative Cross mice supports distinct sex-oriented molecular modes of response in obesity. *BMC genomics*, 21(1), 761. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07173-x>
14. Zhu, Z., Chen, Y., Qin, X., Liu, S., Wang, J., & Ren, H. (2023). Multidimensional landscape of non-alcoholic fatty liver disease-related disease spectrum uncovered by big omics data: Profiling evidence and new perspectives. *Smart Medicine*, 2(2), e20220029. <https://doi.org/10.1002/SMMD.20220029>
15. Feng, J., Wang, S., Chen, F., Zhang, J., Wang, Q., Jiang, L., ... & Shen, Q. (2024). Effects of triglyceride and ethyl ester forms of EPA on hepatic lipid metabolism in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods*, 116, 106179.

- <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106179>
16. Cebola, I. (2020). Liver gene regulatory networks: Contributing factors to nonalcoholic fatty liver disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 12(3), e1480. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1480>
17. Melo L, Hagar A, Klaunig JE. Gene expression signature of exercise and change of diet on non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Comparative Exercise Physiology*. 2022 Feb 22;18(2):143-54. <https://doi.org/10.3920/CEP210033>
18. Xu L, Yin L, Qi Y, Tan X, Gao M, Peng J. 3D disorganization and rearrangement of genome provide insights into pathogenesis of NAFLD by integrated Hi-C, Nanopore, and RNA sequencing. *Acta Pharm Sin B*. 2021 Oct;11(10):3150-3164. doi: 10.1016/j.apsb.2021.03.022. Epub 2021 Apr 6. PMID: 34729306; PMCID: PMC8546856.
19. Damian Szklarczyk, Andrea Franceschini, Stefan Wyder, Kristoffer Forslund, Davide Heller, Jaime Huerta-Cepas, Milan Simonovic, Alexander Roth, Alberto Santos, Kalliopi P. Tsafou, Michael Kuhn, Peer Bork, Lars J. Jensen, Christian von Mering, STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Research*, Volume 43, Issue D1, 28 January 2015, Pages D447–D452, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
20. Michael E. Smoot, Keiichiro Ono, Johannes Ruscheinski, Peng-Liang Wang, Trey Ideker, Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization, *Bioinformatics*, Volume 27, Issue 3, February 2011, Pages 431–432, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq675>
21. Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., & Lin, C. Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology*, 8 Suppl 4(Suppl 4), S11. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>
22. Yon Rhee, S., Wood, V., Dolinski, K. et al. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat Rev Genet* 9, 509–515 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrg2363>
23. Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., Martín, F., Bugianesi, E., & Soria, B. (2023). Nutrition could prevent or promote non-alcoholic fatty liver disease: an opportunity for intervention. *BMJ (Clinical research ed.)*, 383, e075179. <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-075179>
24. Geng, Y., Faber, K. N., de Meijer, V. E., Blokzijl, H., & Moshage, H. (2021). How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease?. *Hepatology international*, 15(1), 21–35. <https://doi.org/10.1007/s12072-020-10121-2>
25. Shen Q, Yang M, Wang S, Chen X, Chen S, Zhang R, Xiong Z, Leng Y. The pivotal role of dysregulated autophagy in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2024 Aug 8;15:1374644. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1374644>
26. Habibullah M, Jemmieh K, Ouda A, Haider MZ, Malki MI, Elzouki AN. Metabolic-associated fatty liver disease: A selective review of pathogenesis, diagnostic approaches, and therapeutic strategies.

- Frontiers in Medicine. 2024 Jan 23;11:1291501.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1291501>
27. Ming, Z., Ruishi, X., Linyi, X., Yonggang, Y., Haoming, L., & Xintian, L. (2024). The gut-liver axis in fatty liver disease: role played by natural products. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1365294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1365294>
28. Ortiz, C., Schierwagen, R., Schaefer, L., Klein, S., Trepap, X., & Trebicka, J. (2021). Extracellular Matrix Remodeling in Chronic Liver Disease. *Current tissue microenvironment reports*, 2(3), 41–52. <https://doi.org/10.1007/s43152-021-00030-3>
29. Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
30. [30] Nishimura, T., Takadate, T., Maeda, S. et al. Disease-related protein co-expression networks are associated with the prognosis of resectable node-positive pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 12, 14709 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19182-9>
31. Zhou, F., Ding, M., Gu, Y., Fan, G., Liu, C., Li, Y., Sun, R., Wu, J., Li, J., Xue, X., Li, H., & Li, X. (2022). Aurantio-Obtusin Attenuates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Through AMPK-Mediated Autophagy and Fatty Acid Oxidation Pathways. *Frontiers in pharmacology*, 12, 826628. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.826628>
32. Gao, Y., Zhang, S., Li, J., Zhao, J., Xiao, Q., Zhu, Y., Zhang, J., & Huang, W. (2020). Effect and mechanism of ginsenoside Rg1-regulating hepatic steatosis in HepG2 cells induced by free fatty acid. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 84(11), 2228–2240. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1793293>
33. Chandrasekaran, P.; Weiskirchen, R. The Role of SCAP/SREBP as Central Regulators of Lipid Metabolism in Hepatic Steatosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 1109. <https://doi.org/10.3390/ijms25021109>
34. Moldavski, O., Zushin, P. H., Berdan, C. A., Van Eijkeren, R. J., Jiang, X., Qian, M., Ory, D. S., Covey, D. F., Nomura, D. K., Stahl, A., Weiss, E. J., & Zoncu, R. (2021). 4β-Hydroxycholesterol is a prolipogenic factor that promotes SREBP1c expression and activity through the liver X receptor. *Journal of lipid research*, 62, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100051>
35. Chen S, Ni J, Luo L, Lin J, Peng H, Shen F, Huang Z. Toosendanin induces hepatotoxicity via disrupting LXRα/Lipin1/SREBP1 mediated lipid metabolism. *Food Chem Toxicol.* 2024 May;187:114631. doi: 10.1016/j.fct.2024.114631. Epub 2024 Apr 1. PMID: 38570025.
36. Zhang X, Lin W, Lei S, Zhang S, Cheng Y, Chen X, Lu Y, Zhao D, Zhang Y, Guo C. The anti-hyperlipidemic effects of *Poria cocos* (Schw.) Wolf extract: Modulating cholesterol homeostasis in hepatocytes via PPARα pathway. *J Ethnopharmacol.* 2024 Mar 1;321:117532. doi: 10.1016/j.jep.2023.117532. Epub 2023 Dec 2. PMID: 38048892.
37. Monroy-Ramirez, H. C., Galicia-Moreno, M., Sandoval-Rodriguez, A., Meza-Rios, A., Santos, A., & Armendariz-Borunda, J. (2021). PPARs as Metabolic Sensors and

- Therapeutic Targets in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8298. <https://doi.org/10.3390/ijms22158298>
38. Ding M, Zhou F, Li Y, Liu C, Gu Y, Wu J, Fan G, Li Y, Li X. Cassiae Semen improves non-alcoholic fatty liver disease through autophagy-related pathway. *Chin Herb Med*. 2023 Mar 22;15(3):421-429. doi: 10.1016/j.chmed.2022.09.006. PMID: 37538867; PMCID: PMC10394324.
39. He A, Chen X, Tan M, Chen Y, Lu D, Zhang X, Dean JM, Razani B, Lodhi IJ. Acetyl-CoA Derived from Hepatic Peroxisomal β -Oxidation Inhibits Autophagy and Promotes Steatosis via mTORC1 Activation. *Mol Cell*. 2020 Jul 2;79(1):30-42.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.007. Epub 2020 May 29. PMID: 32473093; PMCID: PMC7335356.
40. Berthier, A., Johanns, M., Zummo, F. P., Lefebvre, P., & Staels, B. (2021). PPARs in liver physiology. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(5), 166097. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166097>
41. Rustgi, V. K., Duff, S. B., & Elsaid, M. I. (2022). Cost-effectiveness and potential value of pharmaceutical treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of medical economics*, 25(1), 347–355. <https://doi.org/10.1080/13696998.2022.2026702>
42. Bai Y, Chen K, Liu J, Wang Y, Wang C, Ju S, Zhou C, Yao W, Xiong B, Zheng C. Activation of AMPK pathway by low dose donafenib and atorvastatin combination improves high fat diet induced metabolic dysfunction associated steatotic liver disease. *Mol Med Rep*. 2024 Mar;29(3):51. doi: 10.3892/mmr.2024.13175. Epub 2024 Feb 1. PMID: 38299233.
43. Younossi, Z. M., Corey, K. E., & Lim, J. K. (2021). AGA Clinical Practice Update on Lifestyle Modification Using Diet and Exercise to Achieve Weight Loss in the Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Expert Review. *Gastroenterology*, 160(3), 912–918. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.051>
44. Fredrickson, G., Barrow, F., Dietsche, K., Parthiban, P., Khan, S., Robert, S., Demirchian, M., Rhoades, H., Wang, H., Adeyi, O., & Revelo, X. S. (2021). Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH. *Molecular metabolism*, 53, 101270. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101270>
45. Zou, Y., & Qi, Z. (2020). Understanding the Role of Exercise in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: ERS-Linked Molecular Pathways. *Mediators of inflammation*, 2020, 6412916. <https://doi.org/10.1155/2020/6412916>
46. Bae JY. Resistance Exercise Regulates Hepatic Lipolytic Factors as Effective as Aerobic Exercise in Obese Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17(22):8307. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228307>
47. Melo, L., Bilici, M., Hagar, A., & Klaunig, J. E. (2021). The effect of endurance training on non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Physiological reports*, 9(15), e14926. <https://doi.org/10.14814/phy2.14926>

48. Cui, N., Li, H., Dun, Y., Ripley-Gonzalez, J. W., You, B., Li, D., Liu, Y., Qiu, L., Li, C., & Liu, S. (2022). Exercise inhibits JNK pathway activation and lipotoxicity via macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in endocrinology*, 13, 961231. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.961231>
49. Diniz, T. A., de Lima Junior, E. A., Teixeira, A. A., Biondo, L. A., da Rocha, L. A. F., Valadão, I. C., ... & Neto, J. C. R. (2021). Aerobic training improves NAFLD markers and insulin resistance through AMPK-PPAR- α signaling in obese mice. *Life sciences*, 266, 118868. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118868.