



Ministry of Science, Research and Technology
Sport Sciences Research Institute

Sport Physiology

Journal homepage: <https://spj.ssric.ac.ir>



Review Article

Systematic Analysis of Molecular Mechanisms of Exercise in Regulating Cholesterol Biosynthesis: Molecular Network Modeling for Therapeutic Target Identification

Milad Abdollahi¹ , Sayyed Mohammad Marandi^{1*} , Zahra Safayinejad² , Mohammad Hossien Nasr Esfahani²

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

2. Department of Genetics, Royan Institute of Biotechnology, Isfahan, Iran

Received: 23-Mar-2025 | Accepted: 4-Jul-2025 | Online Published: 2-Aug-2025

* Corresponding Author: Sayyed Mohammad Marandi, E-mail: s.m.marandi@spr.ui.ac.ir

How to Cite: Abdollahi, M; Marandi, S. M; Safayinejad, Z. & Nasr Esfahani, M. H. (2025). Systematic Analysis of Molecular Mechanisms of Exercise in Regulating Cholesterol Biosynthesis: Molecular Network Modeling for Therapeutic Target Identification. *Sport Physiology*, 17(65):72-96. (In Persian). Doi: [10.22089/spj.2025.17867.2363](https://doi.org/10.22089/spj.2025.17867.2363)

Extended Abstract

Background and Purpose

This study investigates the intricate regulation of cholesterol biosynthesis, a vital metabolic process governed by a network of genes central to cholesterol synthesis, lipid metabolism, and cellular signaling. Focusing on four key genes—*Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*—it examines their regulatory mechanisms under different physiological and environmental conditions, including high-fat dietary intake and physical exercise. Using computational modeling, the research deciphers complex interactions within these gene regulatory networks, aiming to provide a systems-level understanding of cholesterol biosynthesis regulation. In parallel, it explores innovative therapeutic targets, particularly microRNAs, as strategies for managing dyslipidemia. By integrating systems biology methodologies with bioinformatics tools, the study not only deepens understanding of cholesterol metabolism but also evaluates the potential impacts of exercise interventions and novel pharmaceutical approaches on lipid disorders. Ultimately, it seeks to identify critical pathways and molecular targets to inform the development of effective therapeutic strategies.

Materials and Methods

A computational systems biology design was employed to elucidate the regulatory mechanisms that coordinate cholesterol biosynthesis under different conditions, such as high-fat diet consumption and physical exercise. The analysis concentrated on the regulatory roles of *Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*—genes known to play essential roles in lipid metabolism and cellular signaling.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND: No Derivatives) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Gene regulatory network construction and analysis were performed using advanced bioinformatics pipelines and computational modeling techniques. Transcriptional data provided the basis for mapping gene–gene interactions, permitting detailed characterization of their roles within the dynamic regulation of cholesterol biosynthetic pathways. Simulations of regulatory network behavior under diverse conditions, including high-fat diet exposure, were conducted to examine their impact on gene expression profiles and pathway dynamics.

To ensure biological relevance, network topology clustering analyses were validated through Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. Further, the study evaluated how high-fat dietary intake and physical activity modulate these networks, with particular emphasis on mechanisms that restore lipid metabolic homeostasis.

As part of the therapeutic exploration, potential microRNA regulators targeting network nodes were identified. These computational predictions, integrated with available experimental findings, refined the regulatory models and allowed identification of key nodes, hubs, and interactions that represent promising intervention points for dyslipidemia management.

Results

Analysis of transcriptional activity confirmed that *Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1* act as prominent hub genes in cholesterol biosynthesis, lipid metabolism, and broader cellular signaling. The regulatory network analysis revealed these genes as central mediators in controlling metabolic flux within cholesterol biosynthetic pathways.

Clustering analysis of the networks, supported by GO and KEGG enrichment, validated the biological coherence and functional significance of these pathways. These results highlighted essential interactions and core modules critical for maintaining cholesterol homeostasis, particularly in the face of environmental stressors such as high-fat diets.

Computational simulations demonstrated that exposure to a high-fat diet markedly alters the expression patterns of the key regulatory genes, disrupting network stability. In contrast, physical exercise interventions produced a counterbalancing effect, modulating the expression of hub genes toward restoring lipid metabolic balance. The model thus provided clear evidence for the potential of targeted exercise regimes to mitigate diet-induced dysregulation of cholesterol metabolism.

A further significant outcome was the identification of multiple microRNAs with regulatory influence over cholesterol biosynthesis networks. These microRNAs appear to modulate hub gene activity, presenting themselves as novel and potentially powerful therapeutic targets for dyslipidemia and associated metabolic disorders.

Integration of experimental datasets with computational models yielded an enriched systems-level perspective on gene–gene and gene–microRNA interactions. This integration enabled the pinpointing of pivotal regulatory nodes and feedback mechanisms that could be exploited for future diagnostic and therapeutic innovations.

Conclusion

This study offers comprehensive insights into the regulation of cholesterol biosynthesis, detailing the roles of the hub genes *Idi1*, *Fdps*, *Sqle*, and *Hmgcs1*. Through computational modeling supported by transcriptional profiles, it demonstrates dynamic regulation of these pathways under high-fat diet and exercise conditions, emphasizing the modulatory benefits of physical activity in maintaining lipid homeostasis.

Importantly, the research identifies regulatory microRNAs as promising therapeutic targets, heralding new approaches for managing dyslipidemia and related cardiovascular-metabolic

disorders. By integrating bioinformatics and systems biology frameworks, it systematically maps the critical pathways and molecular interactions underlying cholesterol metabolism. The findings not only advance mechanistic understanding but also offer a robust foundation for designing targeted interventions—be they exercise prescriptions, microRNA-based therapeutics, or novel pharmacological agents—to optimize cholesterol regulation and improve metabolic health outcomes.

Keywords: Cholesterol Biosynthesis, Gene Regulatory Networks, Dyslipidemia, Exercise, Bioinformatics

Article Message

By identifying and characterizing key hub genes in cholesterol biosynthesis and elucidating their connections within gene regulatory networks, this study advances the understanding of cholesterol metabolism and the involvement of the cellular endoplasmic reticulum. GO and KEGG analyses confirm the inclusion of these genes in critical metabolic processes, suggesting their value as diagnostic biomarkers for metabolic diseases. The demonstrated interplay between physical activity and cholesterol biosynthesis underscores its potential as an effective strategy for metabolic regulation, with therapeutic implications spanning exercise-based interventions to targeted molecular therapies.

Ethical Considerations

This research was approved by the Ethics Committee of the University of Isfahan (Ethical Code: [IR.UI.REC.1403.005](#)).

Authors' Contributions

Conceptualization, Data Collection, Manuscript Writing: Milad Abdollahi
Project Management, Review and Editing: Sayyed Mohammad Marandi
Data Analysis, Review and Editing: Zahra Safayinejad
Literature Review, Review and Editing: Mohammad Hossein Nasr Esfahani

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors express deep appreciation to the Institute of Physical Education and Sport Sciences for their consistent and invaluable support throughout the course of this research.



فیزیولوژی ورزشی

وبگاه نشریه: <https://spj.ssric.ac.ir>



نوع مقاله: مروری

تجزیه و تحلیل سیستمی سازوکارهای مولکولی فعالیت ورزشی در تنظیم بیوسنتز کلاسترول: مدل سازی شبکه های مولکولی برای شناسایی اهداف درمانی

میلاد عبداللهی^۱، سیدمحمد مرندي^{۱*}، زهرا صفائی نژاد^۲، محمدحسین نصر اصفهانی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲. گروه ژنتیک، مؤسسه رویان اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۳ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۳ | تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۰۵/۱۱

*نویسنده مسئول: سید محمد مرندي، ایمیل: s.m.marandi@spr.ui.ac.ir

نحوه ارجاع دهی: عبداللهی، میلاد، مرندي، سیدمحمد، صفائی نژاد، زهرا و نصر اصفهانی، محمدحسین. (۱۴۰۴). تجزیه و تحلیل سیستمی سازوکارهای مولکولی فعالیت ورزشی در تنظیم بیوسنتز کلاسترول: مدل سازی شبکه های مولکولی برای شناسایی اهداف درمانی. فیزیولوژی ورزشی، ۱۷(۶۵): ۷۲-۹۶.

چکیده

تنظیم بیوسنتز کلاسترول فرایندی پیچیده و به شدت کنترل شده است که شامل شبکه ای از ژن ها می شود که سنتز، تنظیم و هومئوستاز سطح کلاسترول را هماهنگ و تنظیم می کنند. در این مطالعه به تحلیل ژن های کلیدی مانند Sqa، Fdps، Idil، Hmgcs1 پرداخته شده است که در بیوسنتز کلاسترول، متابولیسم لیپیدها و سیگنالینگ سلولی نقش های اساسی دارند. مدل سازی محاسباتی این شبکه های تنظیمی می تواند تعاملات پیچیده بین این ژن ها و مکانیزم های تنظیمی آن ها را در شرایط مختلف از جمله رژیم های پرچرب، نمایان کند. تحلیل بیوانفورماتیکی ما تأثیر رژیم غذایی پرچرب و فعالیت ورزشی بر این ژن ها را بررسی کرد و به بررسی تنظیمات دینامیک مسیرهای بیوسنتز کلاسترول و قابلیت تنظیم آن ها پرداخت. علاوه بر این، شناسایی اهداف دارویی جدید مانند MicroRNA ها می تواند به استراتژی های درمانی نوآورانه برای مدیریت دیس لیپیدمی منجر شود. با ترکیب رویکردهای زیست شناسی سیستمی و ابزارهای محاسباتی، هدف مطالعه حاضر این بود تا درک بهتری از متابولیسم کلاسترول به دست آورد و تأثیر فعالیت ورزشی و مداخلات دارویی جدیدی را برای اختلالات لیپیدی شناسایی کند. یافته ها نشان داد، مسیرهای بیوسنتز کلاسترول با استفاده از داده های رونویسی تحلیل شده و ژن های هاب درگیر در این مسیرها شناسایی شدند. همچنین تجزیه و تحلیل خوشه های شبکه نتیجه تحلیل های GO و KEGG را تأیید کرد. نتیجه گیری می شود، این مطالعه فهرستی از ژن های هاب، مسیرهای مهم و بینش های جدید برای توسعه استراتژی های مدیریت بیوسنتز کلاسترول را ارائه کرده و مکانیسم های اساسی پاسخ کبد را روشن می کند.

واژگان کلیدی: بیوسنتز کلاسترول، شبکه های تنظیمی ژنی، دیس لیپیدمی، فعالیت ورزشی، بیوانفورماتیک.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC- ND: No Derivatives) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

بیوسنتز کلسترول فرایند زیستی پیچیده و به شدت تنظیم شده‌ای است که اصلی‌ترین آن در کبد رخ می‌دهد. جالب توجه است که مطالعات اخیر نشان داده‌اند فعالیت بدنی منظم می‌تواند به طور درخور توجهی این مسیرهای متابولیکی را تحت تأثیر قرار دهد. این فرایند نقش حیاتی در حفظ هومئوستاز لیپیدی، ساختار غشای سلولی، تولید استروئیدها و سنتز ویتامین D دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که ورزش هوازی با افزایش بیان گیرنده‌های LDL در کبد، جذب کلسترول از گردش خون را بهبود می‌بخشد. کبد به عنوان مرکز تنظیم این مسیر با استفاده از شبکه‌ای از ژن‌ها و پروتئین‌ها، سطح کلسترول در بدن را کنترل می‌کند. مطالعات فیزیولوژی ورزشی نشان داده‌اند که تمرینات استقامتی می‌توانند فعالیت آنزیم HMG-CoA ردوکتاز -آنزیم کلیدی در سنتز کلسترول- را تا ۴۰ درصد کاهش دهند. هومئوستاز کلسترول شامل سنتز، جذب، جریان و استری شدن کلسترول است که برای حفظ عملکرد طبیعی سلول مهم است. شواهد قوی نشان می‌دهند ورزش منظم می‌تواند هریک از این فرایندها را به طور مثبت تعدیل کند. اختلال در هومئوستاز کلسترول با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، آلزایمر، بیماری‌های قلبی عروقی آترواسکلروتیک، کبد چرب غیرالکلی و دیابت مرتبط است. جالب است بدانیم که فعالیت بدنی منظم می‌تواند خطر این بیماری‌ها را تا حد چشمگیری کاهش دهد که بخشی از این اثر از طریق تنظیم متابولیسم کلسترول اعمال می‌شود (۱-۳).

براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی^۱ (۲۰۲۳) شیوع کلسترول بالا در بزرگسالان به ۴۲ درصد افزایش یافته است که فعالیت بدنی ناکافی (کمتر از ۱۵۰ دقیقه در هفته) یکی از عوامل اصلی این روند محسوب می‌شود. در ایران این میزان به ۴۵ درصد می‌رسد و دوسوم جمعیت فعالیت بدنی کافی ندارند که نشان‌دهنده اهمیت این عامل در بیماری‌های قلبی عروقی در سطح جهان است (۴). در ایران نیز مطالعات نشان داده‌اند که شیوع دیس‌لیپیدمی درخور توجه است؛ به عنوان مثال، حدود ۴۲ درصد از بزرگسالان ایرانی کلسترول تام ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر دارند. این آمار ضرورت توجه به تنظیم متابولیسم کلسترول در جمعیت ایران را برجسته می‌کند؛ با این حال، مطالعات اپیدمیولوژیک به وضوح نشان داده‌اند که افراد فعال از نظر بدنی، شیوع کمتری از دیس‌لیپیدمی را نشان می‌دهند (۵).

بیوسنتز کلسترول، فراتر از یک مسیر متابولیک ساده، شاهکاری زیستی است که توسط شبکه‌ای پیچیده از ژن‌ها و پروتئین‌ها تنظیم می‌شود و نقشی حیاتی در هومئوستاز لیپیدی، یکپارچگی غشای سلولی و سیگنالینگ مولکولی ایفا می‌کند. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که ورزش می‌تواند بیان بسیاری از این ژن‌های تنظیمی را تغییر دهد؛ برای مثال، تمرینات مقاومتی می‌توانند بیان ژن SREBP-2 فاکتور رونویسی اصلی کنترل‌کننده سنتز کلسترول را کاهش دهند (۶). این مسیر متابولیک پیچیده عمدتاً در کبد و از طریق مسیر موالونات^۲ رخ می‌دهد و تحت کنترل دقیق شبکه‌های تنظیمی ژنی و آنزیمی قرار دارد. این فرایند با تبدیل استیل کوآنزیم A به ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم A^۳ توسط آنزیم HMG-CoA سنتاز آغاز می‌شود که مرحله محدودکننده سرعت محسوب می‌شود. سپس HMG-CoA توسط آنزیم HMG-CoA ردوکتاز به موالونات تبدیل می‌شود؛ آنزیمی که هدف اصلی داروهای استاتینی است. این مسیر در نهایت با فعالیت آنزیم‌هایی مانند فارنزیل پیروفسفات سنتاز^۴ و اسکوالن اپوکسیداز^۵ به تولید کلسترول منجر می‌شود.

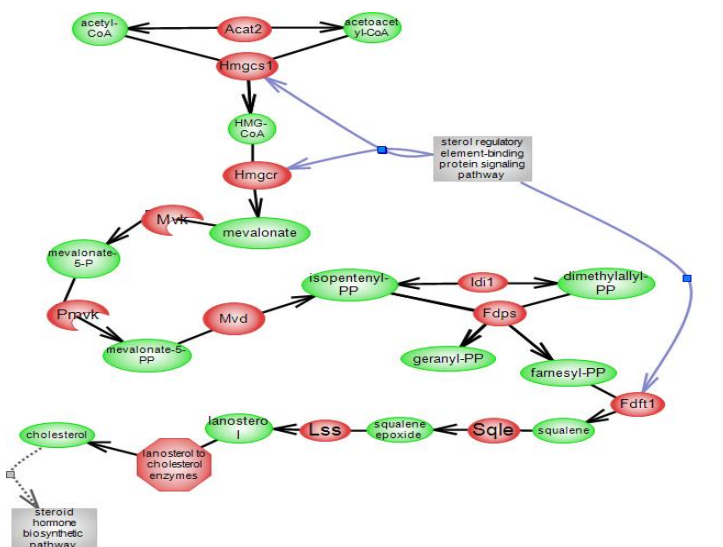
1. WHO
2. Mevalonate pathway
3. HMG-CoA
4. Fdps
5. Sqle

از منظر پاتوفیزیولوژیک، اختلال در این مراحل می‌تواند به تجمع واسطه‌های متابولیکی یا تولید بیش از حد کلسترول منجر شود که هر دو در بیماری‌های متابولیک نقش دارند (۷، ۲).

مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که ورزش منظم می‌تواند فعالیت آنزیم HMG-CoA ردوکتاز را تا ۵۰ درصد کاهش دهد که این اثر احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیر AMPK ناشی از ورزش ایجاد می‌شود. این آنزیم هدف اصلی داروهای استاتینی است و یافته‌ها نشان می‌دهد که ورزش می‌تواند مکانیسمی مشابه اما طبیعی‌تر برای کنترل سنتز کلسترول ارائه دهد (۸، ۹).

ژن‌هایی نظیر *Hmgcr* و *Hmgcs1* به‌عنوان ستون‌های اصلی مسیر موالونات، سنتز اولیه کلسترول را هدایت می‌کنند؛ در حالی که *Fdft1* و *Mvd* در مراحل میانی تولید ایزوپرنوئیدها و تبدیل آن‌ها به اسکوالن نقش دارند. در این میان، *Sqle* و *Lss* با تبدیل اسکوالن به لانوسترول، بخش کلیدی در این مسیر را تشکیل می‌دهند و *Dhcr7* و *Nsdhl* با تنظیم مراحل نهایی، بلوغ مولکول کلسترول را تضمین می‌کنند، اما این شبکه تنها به سنتز محدود نمی‌شود؛ زیرا *Ldlr* با تنظیم برداشت کلسترول از پلاسما و *Stard4* با انتقال داخل سلولی آن، تعادل دینامیک بین تولید و مصرف را حفظ می‌کنند (شکل ۱) (۱۴-۱۰).

مطالعه حاضر با تحلیل جامع این شبکه ژنی و با تمرکز ویژه بر چگونگی تأثیر فعالیت ورزشی بر بیان و عملکرد این ژن‌ها، نه تنها به روشن‌سازی مکانیزم‌های تنظیمی می‌پردازد، بلکه با رویکردی سیستمی، اهداف دارویی نوظهوری را پیشنهاد می‌کند. به طور خاص بررسی کرده‌ایم که چگونه مداخلات ورزشی می‌توانند این شبکه ژنی را تعدیل کنند و چگونه می‌توان از این اطلاعات برای توسعه راهکارهای درمانی جدید استفاده کرد.



شکل ۱- شماتیک از مسیر بیوسنتز کلسترول (اقتباس شده از سایت RGD)

Figure 1- Schematic of the cholesterol biosynthesis pathway (Adapted from the RGD website)

پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی سیستمی و مدل‌سازی محاسباتی، امکان تحلیل عمیق تأثیر ورزش بر این تعاملات پیچیده را فراهم کرده است. این ابزارها به ما اجازه می‌دهند تا دقیقاً مشخص کنیم که چگونه انواع فعالیت بدنی (هوازی، مقاومتی، تناوبی با شدت بالا) می‌توانند الگوهای بیان ژن‌های کلیدی در مسیر سنتز کلسترول را تغییر دهند. در این

مطالعه به طور خاص نشان داده‌ایم که ورزش چگونه می‌تواند از طریق تنظیم میکروRNAهای خاص، بیان ژن‌های این مسیر را تحت تأثیر قرار دهد.

نتایج این پژوهش نه تنها بینش‌های جدیدی را در مورد پاسخ کبدی به ورزش ارائه می‌دهد، بلکه با پیشنهاد اهداف دارویی بالقوه که می‌توانند اثرات مشابه ورزش را تقلید کنند، پایه‌ای محکم برای طراحی مداخلات درمانی مؤثر فراهم می‌کند. در نهایت، این تحقیق تلاش کرده است تا با تلفیق علم داده، زیست‌شناسی سیستم‌ها و فیزیولوژی ورزش، راه را برای مدیریت پیشرفته‌تر متابولیسم کلسترول هموار کند.

روش پژوهش

جمع‌آوری داده‌های ژن‌های دخیل در بیوسنتز کلسترول

ژن‌های بررسی‌شده در این مطالعه براساس معیار تغییر بیان برابر با بیش از ۲ یا کمتر از -۲ (fold change >2 یا <-2) انتخاب شدند. این ژن‌ها که در جدول ۱ فهرست شده‌اند، به‌عنوان کاندیداهای کلیدی برای انجام تحلیل‌های شبکه‌ای تعیین شدند تا نقش آن‌ها در برهم‌کنش‌های مولکولی و مسیرهای زیستی مرتبط ارزیابی شود.

شبکه‌های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

برای بررسی برهم‌کنش‌های بین ژن‌های فهرست‌شده (جدول ۱)، تحلیل‌ها با استفاده از پلتفرم آنلاین STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>) انجام شد. تنظیمات اولیه با حداقل امتیاز برهم‌کنش ۰/۱۵۰ (سطح اطمینان پایین) اعمال شد و شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین^۱ تولید شد. سپس داده‌های PPI به نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳.۱۰.۱) منتقل شدند تا تحلیل‌های پیشرفته‌تر انجام گیرد. برای شناسایی ژن‌های هاب در شبکه تولیدشده، از پلاگین CytoHubba (نسخه ۰.۱) استفاده شد که ابزاری قدرتمند برای رتبه‌بندی و تشخیص گره‌های کلیدی در شبکه‌های زیستی است. سه الگوریتم محاسباتی DEGREE، DMNC و MNC به کار گرفته شدند تا ژن‌های هاب شناسایی و اولویت‌بندی شوند. برای هر الگوریتم، پنج پروتئین برتر به‌عنوان پروتئین‌های هاب انتخاب شدند. در نهایت، ژن‌های هاب و برهم‌کنش‌های مرتبط با آن‌ها در یک زیرشبکه استخراج شده و به‌صورت بصری نمایش داده شدند تا ساختار تعاملی و اهمیت عملکردی آن‌ها در شبکه مشخص شود.

هستی‌شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر ژن‌های بیان‌شده

برای تحلیل غنی‌سازی ژن‌های موجود در زیرشبکه هاب، از پایگاه‌داده KEGG استفاده شد تا مسیرهای زیستی مرتبط شناسایی شوند. همچنین ابزار آنلاین STRING به‌منظور انجام تحلیل (GO) به کار گرفته شد که شامل دو دسته اصلی بود: اجزای سلولی^۲ و فرایندهای بیولوژیکی^۳. این رویکرد امکان بررسی جامع نقش‌های عملکردی و مکانیزم‌های زیستی ژن‌های هاب را فراهم کرد.

تحلیل خوشه‌ای شبکه

برای خوشه‌بندی گره‌های شبکه از پلاگین CytoCluster (نسخه ۲.۱.۰) استفاده شد. الگوریتم شناسایی مجموعه پروتئین (IPCA) با آستانه تنظیم‌شده روی ۱۰ به کار گرفته شد تا تحلیل خوشه‌ای زیرشبکه انجام گیرد. سپس ژن‌های موجود در هر خوشه با استفاده از نسخه ۱۲ پلتفرم STRING تجزیه و تحلیل شدند تا مسیرهای مرتبط در پایگاه داده

-
1. PPI
 2. CC
 3. BP

KEGG شناسایی شوند. این رویکرد امکان بررسی هدفمند تعاملات ژنی و ارتباط آن‌ها با مسیرهای زیستی کلیدی را فراهم کرد (۱۵).

نتایج

متابولیسم لیپید

داده‌های استفاده‌شده در این مطالعه از تحلیل‌های RNA-seq استخراج شدند. در حالی که مطالعات پیشین به طور گسترده بیوسنتز کلسترول و مکانیزم‌های متابولیسم لیپیدها را روشن کرده‌اند، ژن‌های بررسی‌شده در این پژوهش (جدول ۱) به طور خاص از این داده‌های RNA-seq انتخاب شدند تا دیدگاه دقیق‌تری از شبکه‌های تنظیمی و تعاملات ژنی مرتبط ارائه دهند (۲۰-۱۶).

شبکه‌های PPI و تجزیه و تحلیل هاب

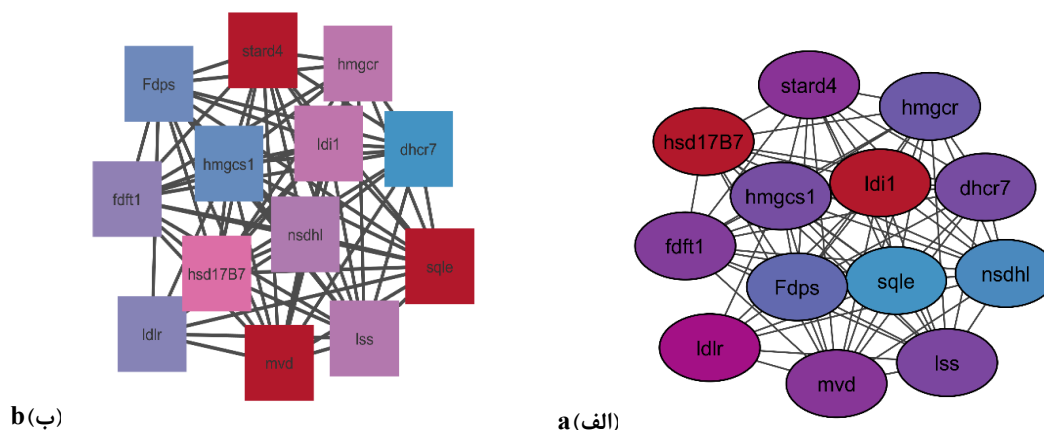
در مطالعه حاضر، ۱۳ ژن به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی^۱ که از مطالعات پیشین RNA-seq استخراج شده بودند، تحلیل زیست‌شناسی سیستمی شدند. این ژن‌ها شامل تعدادی از ژن‌های تنظیم‌شده به صورت مثبت (up-regulated) و منفی (down-regulated) بودند که در مسیر بیوسنتز کلسترول نقش دارند. شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) با استفاده از ابزار STRING و نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شدند (شکل ۲). پایگاه داده-STRING (<http://string.db.org>) منبعی جامع برای شناسایی و پیش‌بینی برهم‌کنش‌های پروتئینی شناخته‌شده و محاسباتی است که در صورت بهره‌گیری از روش‌های تحلیل مناسب، ابزاری بی‌نظیر برای مطالعات شبکه‌ای محسوب می‌شود. از سوی دیگر، Cytoscape پلتفرم قدرتمندی است که امکان تجسم شبکه‌های تعامل مولکولی و یکپارچه‌سازی داده‌های زیستی را فراهم می‌کند. این ترکیب ابزارها به ما اجازه داد تا ساختار و دینامیک تعاملات ژنی مرتبط با بیوسنتز کلسترول را با دقت بیشتری بررسی کنیم (۲۱).

شکل (۲) شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌هایی را به تصویر می‌کشد که در مسیر بیوسنتز کلسترول و در پاسخ به فعالیت ورزشی تنظیم می‌شوند. انتخاب آستانه امتیاز اطمینان پایین‌تر به معنای گنجاندن تعامل‌های بیشتری در شبکه است؛ حتی اگر این تعامل‌ها از پشتیبانی ضعیف‌تری در داده‌های پایه برخوردار باشند. این رویکرد می‌تواند برای کاوش تعامل‌های بالقوه بین ژن‌هایی که کمتر مطالعه شده‌اند یا دارای سطوح بیان پایین هستند، مفید باشد. تعامل‌هایی با امتیاز اطمینان پایین‌تر ممکن است به کشف روابط جدیدی منجر شوند که نیازمند بررسی‌های تکمیلی باشند. این شکل نشان می‌دهد که در شرایط مصرف رژیم پرچرب (HFD)، پروتئین‌های درگیر در سنتز لیپید شبکه‌ای را تشکیل می‌دهند که برای مسیر بیوسنتز کلسترول در کبد ضروری است؛ به بیان دیگر، این یافته‌ها از مفاهیم نوین نظریه «شبکه برای شبکه» در زمینه تعامل عوامل اپی‌ژنتیکی و میزبان پشتیبانی می‌کنند.

استفاده از الگوریتم‌های متعدد برای شناسایی پروتئین‌های هاب، رویکردی متداول در تحلیل شبکه‌های زیستی است؛ زیرا این روش به کاهش سوگیری‌های ناشی از یک الگوریتم واحد کمک می‌کند و اطمینان به نتایج را بهبود می‌بخشد. در مطالعه حاضر، بهره‌گیری از سه الگوریتم متمایز (MNC، DEGREE و MCC) در افزونه Cyto-Hubba برای شناسایی پروتئین‌های هاب، روشی منطقی و جامع تلقی می‌شود. این سه الگوریتم به‌گونه‌ای انتخاب شده‌اند که هر یک از زوایای متفاوتی به شناسایی پروتئین‌های هاب بپردازند و تنوع و دقت نتایج را افزایش دهند: الگوریتم MNC براساس

1. DEGs

حداکثر دسته‌های شبکه، الگوریتم DEGREE بر مبنای تعداد یال‌های متصل به هر گره و الگوریتم MCC بر اساس تعداد کوتاه‌ترین مسیرهای عبوری از یک گره عمل می‌کنند. استفاده هم‌زمان از این الگوریتم‌ها با رویکردهای متفاوت، امکان ثبت جنبه‌های متنوع ساختاری و FUNCTIONAL شبکه را فراهم می‌کند و به درک جامع‌تری از پروتئین‌های هاب منجر می‌شود (۲۲).



شکل ۲- تحلیل شبکه PPI ژن‌های مرتبط با بیوسنتز کلسترول

Figure 2- PPI network analysis of genes related to cholesterol biosynthesis

(a) The protein-protein interaction (PPI) network of upregulated and downregulated genes in the cholesterol biosynthesis pathway was plotted using Cytoscape software. Gene coloring was based on their regulation level:

- Red: highly expressed genes;
- Blue: lowly expressed genes;
- Pink and purple: moderately regulated genes.

(b) The PPI network of regulated genes in the cholesterol biosynthesis pathway along with the effect of exercise. This network has the following characteristics:

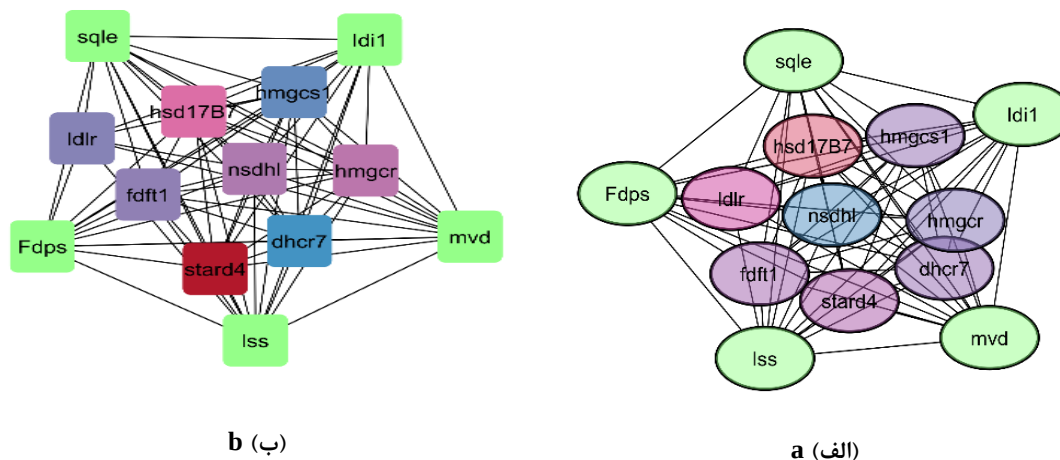
- Number of nodes: 13;
- Number of edges (connections): 73;
- Average number of neighbors: 11.23;
- Characteristic path length: 1.04;
- Clustering coefficient: 0.48;
- Density: 0.46.

(الف) شبکه تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین در مسیر بیوسنتز کلسترول با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شده است. رنگ‌بندی ژن‌ها بر اساس سطح تنظیم آن‌ها انجام شده است:

- قرمز: ژن‌های با بیان بالا؛
 - آبی: ژن‌های با بیان پایین؛
 - صورتی و بنفش: ژن‌های با تنظیم متوسط.
- (ب) شبکه PPI ژن‌های تنظیم‌شده در مسیر بیوسنتز کلسترول همراه با تأثیر فعالیت ورزشی. این شبکه دارای خصوصیات زیر است:

- تعداد گره (گره‌ها): ۱۳؛
- تعداد یال (ارتباطات): ۷۳؛
- میانگین تعداد همسایگان: ۱۱/۲۳؛
- طول مسیر مشخصه: ۱/۰۴؛
- ضریب خوشه‌بندی: ۰/۴۸؛
- تراکم: ۰/۴۶.

با بهره‌گیری از این سه الگوریتم که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شده‌اند، پنج پروتئین هاب با بالاترین سطح تعاملات و نقش‌های کلیدی در شبکه، از میان تمامی تعاملات پروتئینی شناسایی شدند (شکل ۳). جزئیات مربوط به این پروتئین‌های هاب در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین زیرشبکه تشکیل‌شده توسط این ژن‌های هاب شناسایی شده در شکل ۳ به نمایش درآمده است.



شکل ۳- ژن‌های هاب و زیرشبکه ژن‌های تنظیم‌شده بالا و پایین

Figure 3- Hub genes and subnetworks of upregulated and downregulated genes
(a) Cholesterol biosynthesis pathway; (b) Cholesterol biosynthesis with exercise. This figure also illustrates the known neighbors of these genes based on the data presented in our study using the CytoHubba plugin. Green color indicates hub genes, blue represents negatively regulated (downregulated) genes, and pink and purple denote moderately regulated genes.

(الف) مسیر بیوسنتز کلسترول، (ب) بیوسنتز کلسترول همراه با فعالیت ورزشی. همچنین این شکل همسایگان شناخته‌شده این ژن‌ها را براساس داده‌های ارائه‌شده در مطالعه ما با استفاده از افزونه CytoHubba به تصویر می‌کشد. رنگ سبز نشان‌دهنده ژن‌های هاب، رنگ آبی نمایانگر ژن‌های با تنظیم منفی (پایین) و رنگ‌های صورتی و بنفش نشان‌دهنده ژن‌های با تنظیم متوسط هستند.

هستی‌شناسی ژن و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر ژن‌های زیرشبکه در بیوسنتز کلسترول و فعالیت ورزشی

در این مطالعه، ژن‌های زیرشبکه به‌عنوان اجزایی کلیدی در تعامل با ژن‌های هاب، نقش مهمی در تنظیم مسیرهای زیستی و فرایندهای مرتبط با بیوسنتز کلسترول ایفا می‌کنند. به‌منظور شناسایی این مسیرها و فرایندهای بیولوژیکی از تحلیل غنی‌سازی مسیرهای GO و KEGG بهره بردیم. اصطلاح GO چارچوبی استاندارد برای توصیف ویژگی‌های مولکولی و بیولوژیکی محصولات ژنی در موجودات زنده است که در آن، مؤلفه‌های اصلی شامل فرایندهای بیولوژیکی (BP^۱) و اجزای سلولی (CC^۲) بررسی می‌شوند (۲۳).

در پژوهش حاضر، تمرکز ما بر ۱۳ گره منتخب از زیرشبکه ژنی بود که در زیست‌شناسی سیستم‌ها نقش حیاتی داشته و در مسیر بیوسنتز کلسترول با ژن‌های هاب تعامل دارند. یافته‌های این مطالعه می‌توانند زمینه‌ساز تجزیه و تحلیل عمیق‌تر داده‌های ترنسکریپتومیک باشند و با تکیه بر مدل‌سازی شبکه‌های ژنی و تحلیل مسیرهای سیگنالینگ، بینش جامعی از مکانیسم‌های مولکولی ارائه دهند. این رویکرد به‌کارگیری ابزارهای پیشرفته بیوانفورماتیکی را برای کشف تعاملات کلیدی در شبکه‌های ژنی تسهیل می‌کند.

۱. توصیف می‌کند که یک ژن در چه فرایندهای زیستی نقش دارد.

۲. مشخص می‌کند که یک مولکول زیستی در کدام بخش سلول قرار دارد.

تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن‌های زیرشبکه با استفاده از ابزار مبتنی بر وب STRING و KEGG نشان داد که ($\leq 50\%$ ژن‌های مشاهده‌شده) GO یافت‌شده برای BP به طور درخورتوجهی در فعالیت‌های مختلف به کار برده شده است (شکل ۴).

جدول ۱- رتبه‌بندی ژن‌های هاب شناسایی‌شده در بیوسنتز کلسترول با استفاده از CytoHubba

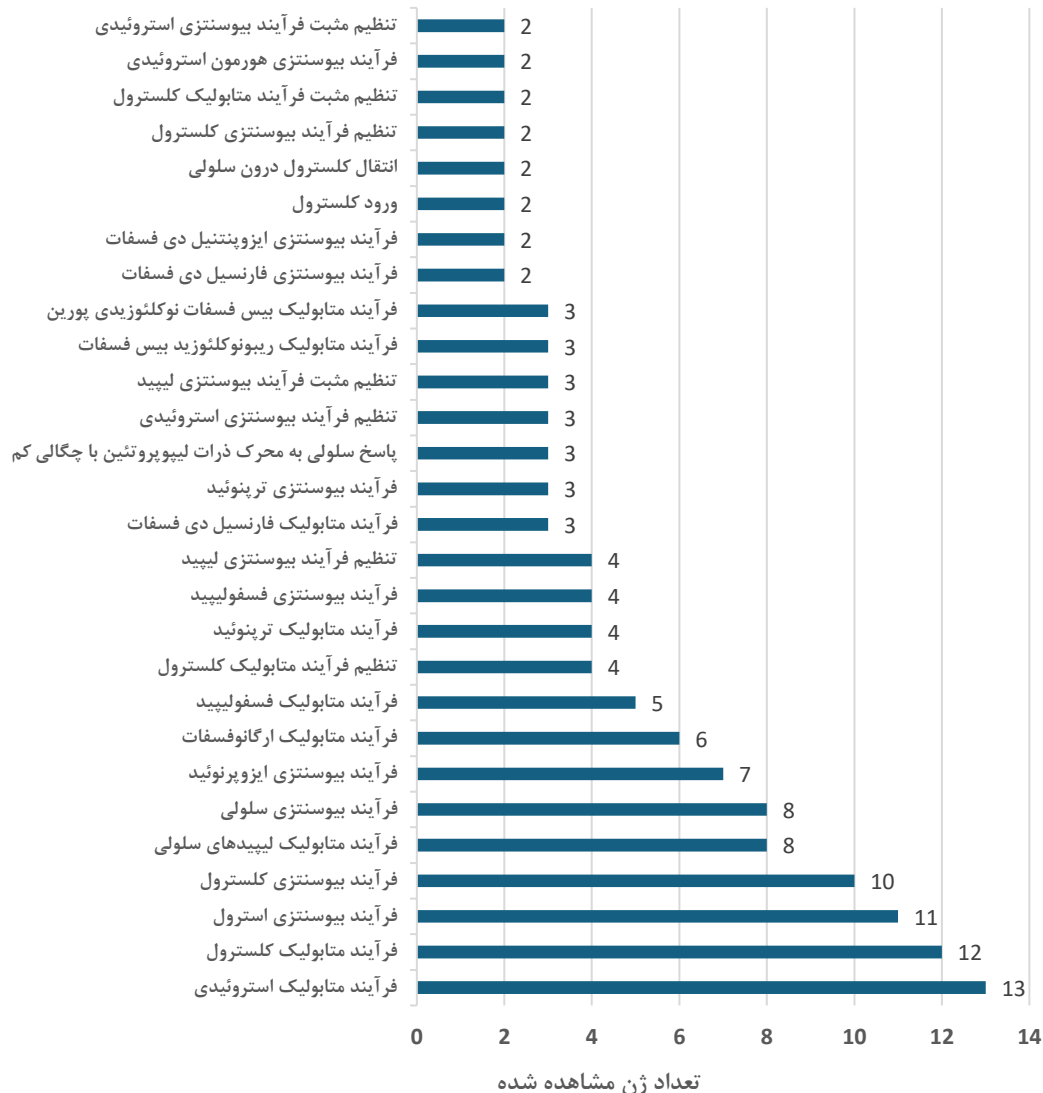
Table 1- Ranking of hub genes identified in cholesterol biosynthesis using CytoHubba

رتبه Rank	ژن Gene	روش رتبه‌بندی Ranking Method	Fold Change	توضیحات ژن
1	FDPS	MCC MNS DEGREE	-1.54 E -0.458	فارنسیل پیروفسفات سنتاز: آنزیم کلیدی در بیوسنتز ایزوپرنوئید است که تشکیل فارنسیل دی فسفات (FPP) را کاتالیز می‌کند، پیش‌ساز چندین کلاس از متابولیت‌های ضروری از جمله استرول‌ها، دولی کول‌ها، کاروتنوئیدها و یوبی کینون‌ها است. FPP همچنین به‌عنوان سوستر برای فارنسیلاسیون پروتئین و ژرانیل ژرانسیلاسیون عمل می‌کند. تراکم پی‌درپی ایزوپنتنیل پیروفسفات را با پیروفسفات‌های آلپیک، دی متیل آلپیل پیروفسفات و سپس با ژرانیل پیروفسفات حاصل به محصول نهایی فارنسیل پیروفسفات (بر اساس شباهت) کاتالیز می‌کند.
1	LSS	MCC MNS DEGREE	-1.021 E -0.226	لانوسترول سنتاز: چرخه ۲-3(S) اکسی دو سکو ال‌ن را به لانوسترول کاتالیز می‌کند، واکنشی که هسته استرول را تشکیل می‌دهد. از طریق تولید لانوسترول ممکن است تجمع پروتئین عدسی را تنظیم کرده و شفافیت را افزایش دهد.
1	MVD	MCC MNS Degree	-0.787 E 0.105	دی فسفوموالونات دکربوکسیلاز: اولین قدم متعهد در بیوسنتز ایزوپرن‌ها را انجام می‌دهد و متعلق به خانواده دی فسفوموالونات دکربوکسیلاز است.
1	IDI1	MCC MNS Degree	0.92 E -0.186	ایزوپنتنیل دی فسفات دلتا ایزومراز ۱: بازآرایی ۱،۳-آلپلی ایزوپنتنیل سوسترای هومولالیک (IPP) را به ایزومر آلپیک بسیار الکتروفیل آن، دی متیل آلپیل دی فسفات (DMAPP) کاتالیز می‌کند.
1	SQLE	MCC MNS DEGREE	-0.787 E 0.105	اسکوالن مونواکسیژناز: اکسیداسیون stereospecific اسکوالن را به ۲-3-epoxysqualene (S) اسکوالن می‌کند و به‌عنوان یک آنزیم محدودکننده سرعت در بیوسنتز استروئید در نظر گرفته می‌شود.

E= in Exercise

همان‌طور که ذکر شد، بیوسنتز کلسترول، فرایند متابولیکی پیچیده و چندمرحله‌ای است که در سلول‌های حیوانی، به‌ویژه در کبد و روده روی می‌دهد و تحت‌تأثیر رژیم‌های غذایی پرچرب به طور درخورتوجهی تنظیم می‌شود. این فرایند شامل مسیرهای بیوسنتزی استرول‌ها، ایزوپرنوئیدها و ترپنوئیدها است که از واحدهای اولیه استیل کوآنزیم A (استیل-CoA) آغاز شده و از طریق واسطه‌های کلیدی نظیر موالات، ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP)، فارنسیل دی فسفات (FPP) و اسکوالن به تولید کلسترول منجر می‌شود. رژیم‌های غذایی پرچرب، به‌ویژه آن‌هایی که غنی از اسیدهای چرب اشباع و کلسترول خارجی هستند، نه تنها ورودی مستقیم کلسترول را افزایش می‌دهند، بلکه تنظیم متابولیکی و بیوسنتزی درون سلولی آن را نیز تحت‌تأثیر قرار می‌دهند.

فرآیندهای بیولوژیکی



شکل ۴- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (فرایند بیولوژیکی) زیر شبکه تعیین شده ژن‌های هاب در بیوسنتز کلاسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>)

بیوسنتز کلاسترول فرایندی چندمرحله‌ای است که عمدتاً در شبکه آندوپلاسمی کبد رخ می‌دهد. مراحل اصلی شامل این موارد است: تشکیل موالات- فرایند بیوسنتزی استرول و فرایند بیوسنتزی کلاسترول از تراکم دو مولکول استیل-CoA برای تشکیل استواسیتیل-CoA شروع می‌شود که توسط آنزیم تیوالاز کاتالیز می‌شود. سپس استواسیتیل-CoA با مولکول سوم استیل-CoA ترکیب می‌شود و ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل-CoA (HMG-CoA) را تشکیل می‌دهد که توسط HMG-CoA سنتاز کاتالیز می‌شود. گام محدودکننده سرعت، کاهش HMG-CoA به موالات توسط HMG-

CoA ردوکتاز (HMGCR) است که در فرایند متابولیک ارگانوفسفات و فرایند بیوسنتزی ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) نقش دارد. موالات از طریق فسفریلاسیون و دکربوکسیلاسیون به IPP و دی‌متیل‌آلیل دی فسفات (DMAPP) تبدیل می‌شود که در فرایند بیوسنتزی ایزوپرنوئید و فرایند متابولیک فارنسیل دی فسفات (FPP) دخیل هستند.

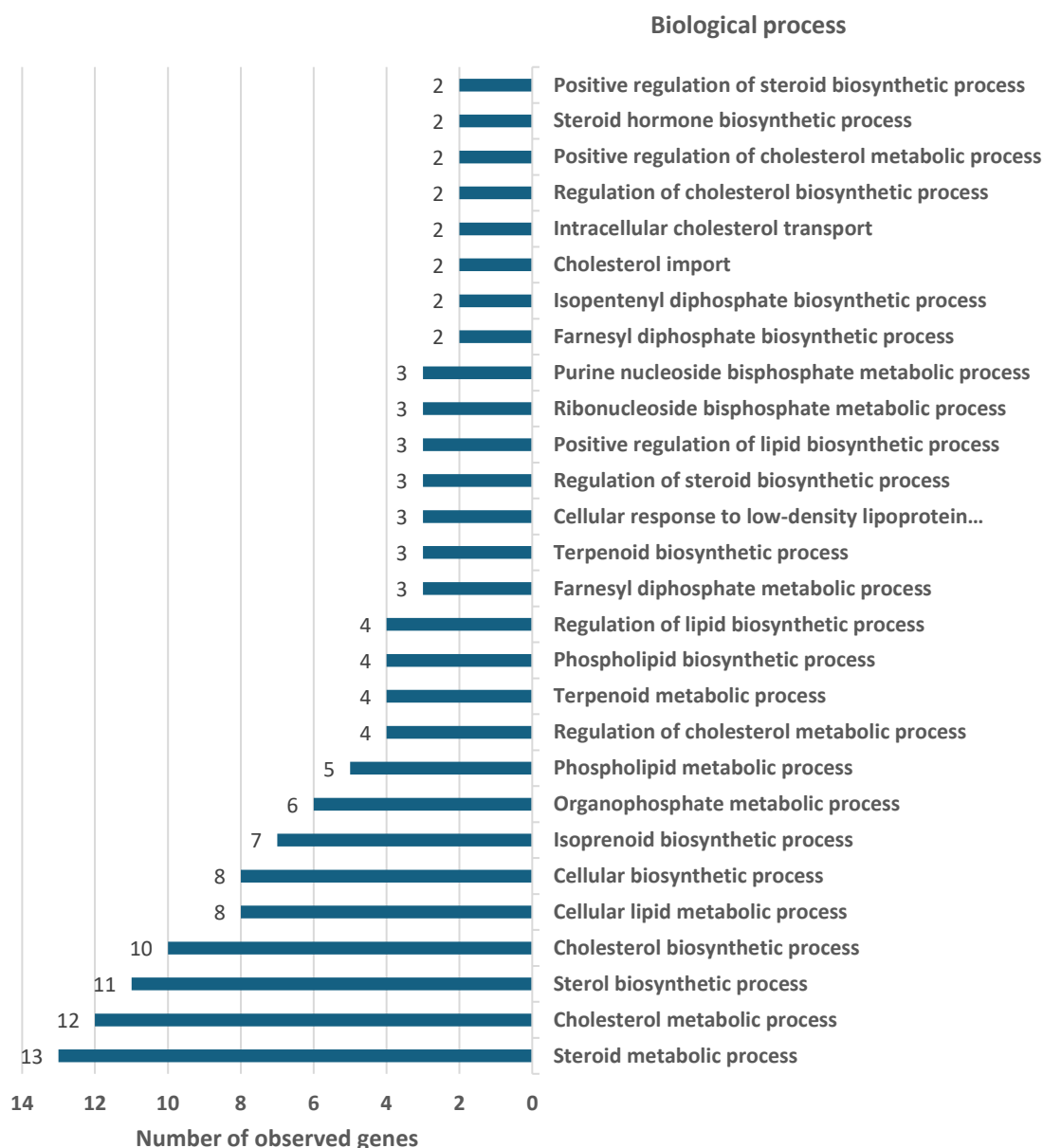


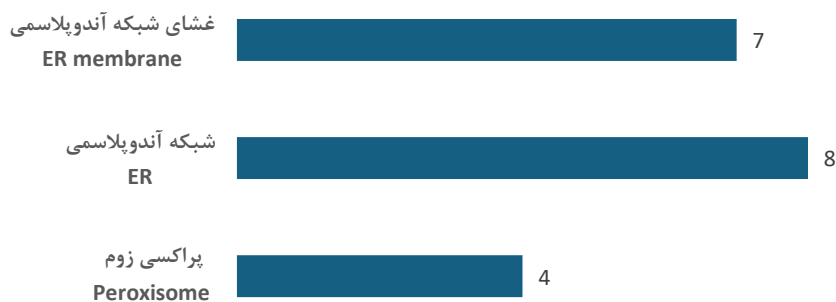
Figure 4- Gene ontology enrichment analysis (biological process) of the identified hub gene subnetwork in cholesterol biosynthesis using STRING version 12 (<http://string-db.org>)

این واسطه‌ها به FPP تبدیل می‌شوند که نقطه انشعابی برای بیوسنتز کلسترول و ترپنوئیدها (فرایند بیوسنتزی ترپنوئید و فرایند متابولیک ترپنوئید) است. دو مولکول FPP توسط اسکوالن سنتاز به اسکوالن تبدیل می‌شوند که در فرایند

بیوسنتزی سلولی و فرایند متابولیک لیپیدهای سلولی نقش دارد. اسکوالن سپس به لانوسترول تبدیل می‌شود که اولین استرول در مسیر است و به فرایند بیوسنتزی استرول مربوط می‌شود. لانوسترول از طریق واکنش‌های دمتیلاسیون کاهش می‌یابد و ایزومریزاسیون به کلسترول تبدیل می‌شود که در فرایند متابولیک کلسترول و فرایند بیوسنتزی هورمون استروئیدی نقش دارد. تنظیم فرایند متابولیک کلسترول و فرایند بیوسنتزی کلسترول از طریق مکانیسم‌های پیچیده‌ای مانند کنترل رونویسی توسط پروتئین SREBP-2 انجام می‌شود. در شرایط کمبود کلسترول، SREBP-2 بیان ژن‌هایی مانند HMGCR را افزایش می‌دهد.

همچنین بازخورد منفی توسط سطح بالای کلسترول، فعالیت HMGCR را مهار می‌کند. پاسخ سلولی به محرک ذرات لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) نیز نقش مهمی دارد. ورود کلسترول از طریق گیرنده‌های LDL باعث کاهش بیوسنتز درون‌زا می‌شود که در تنظیم فرایند متابولیک کلسترول و تنظیم فرایند بیوسنتزی استروئیدی تأثیر می‌گذارد. فرایند متابولیک فسفولیپید و فرایند بیوسنتزی فسفولیپید با بیوسنتز کلسترول ارتباط نزدیک دارند؛ زیرا فسفولیپیدها و کلسترول برای تشکیل غشاها و لیپوپروتئین‌ها ضروری هستند. انتقال کلسترول درون سلولی که توسط پروتئین‌های حامل مانند STARD تسهیل می‌شود، برای استفاده در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی (فرایند بیوسنتزی هورمون استروئیدی) و اسیدهای صفراوی حیاتی است. فرایندهای مانند متابولیسم ریبونوکلوئزید بیس فسفات و متابولیسم بیس فسفات نوکلئوزیدی پورین به طور مستقیم به بیوسنتز کلسترول مرتبط نیستند، اما ممکن است از طریق متابولیسم عمومی و تعاملات غیرمستقیم تأثیر داشته باشند (۲۴-۲۹).

اصطلاحات غالب GO (۵۰ درصد ژن مشاهده‌شده) برای CC یافت شد (شکل ۵). این نتیجه نشان داد که ژن‌های زیرشبکه به بخش‌های غشای شبکه آندوپلاسمی، شبکه آندوپلاسمی و پراکسی زوم‌های سلول مرتبط هستند.



شکل ۵- تجزیه و تحلیل غنی‌سازی هستی‌شناسی ژن (جزء سلولی) زیرشبکه‌های تعیین‌شده ژن‌های هاب در بیوسنتز

کلسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>)

Figure 5- Gene ontology enrichment analysis (cellular component) of the identified hub gene subnetworks in cholesterol biosynthesis using STRING version 12 (<http://string-db.org>); ER= Endoplasmic Reticulum

فرایند بیوسنتز کلسترول در سلول‌های کبدی به صورت مشترک بین شبکه آندوپلاسمی (ER) و پراکسی‌زوم‌ها انجام می‌شود و غشای شبکه آندوپلاسمی نقشی کلیدی در سازمان‌دهی آنزیم‌ها و انتقال واسطه‌ها دارد. در ادامه، نقش هریک از این اجزا به صورت تخصصی بررسی می‌شود.

شبکه آندوپلاسمی، به‌ویژه بخش صاف آن (Smooth ER) مرکز اصلی بیوسنتز کلسترول در کبد است. این اندامک غشایی که از کیسه‌ها و لوله‌های به‌هم‌پیوسته تشکیل شده است، محل استقرار آنزیم‌های کلیدی مسیر (Mevalonate Pathway) است؛ مسیری که از استیل کوآنزیم A شروع می‌شود و به تولید کلسترول منجر می‌شود. آنزیم-HMG-CoA ردوکتاز (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase) که مرحله محدودکننده این مسیر محسوب می‌شود، به غشای ER صاف متصل است و فعالیتش به طور دقیق توسط بازخوردهای متابولیکی تنظیم می‌شود. شبکه آندوپلاسمی صاف همچنین در سنتز واسطه‌های لیپیدی مثل ایزوپرنوئیدها (مانند فارنزیل پیروفسفات) نقش دارد که پیش‌سازهای کلسترول هستند (۳۰).

غشای شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان یک بستر لیپیدی پویا عمل می‌کند که آنزیم‌های بیوسنتز کلسترول را تثبیت کرده و دسترسی آن‌ها به سوبستراهای محلول در چربی را تسهیل می‌کند. این غشا که از فسفولیپیدها و پروتئین‌های خاص تشکیل می‌شود، محیطی آب‌گریز فراهم می‌کند که برای واکنش‌های متابولیکی لیپید محور ضروری است. علاوه بر این، غشای ER از طریق تعامل با پراکسی‌زوم‌ها، انتقال واسطه‌ها و تنظیم دینامیک لیپیدی را پشتیبانی می‌کند؛ برای مثال، پروتئین‌های متصل به غشا مانند SREBP با حس کردن سطح کلسترول در غشا، بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز کلسترول را تنظیم می‌کنند (۳۱).

پراکسی‌زوم‌ها، اندامک‌های تک غشایی کوچک‌تر از میتوکندری، در مراحل ابتدایی بیوسنتز کلسترول نقش دارند و مکمل عملکرد شبکه آندوپلاسمی هستند. این اندامک‌ها حاوی آنزیم‌هایی مثل آسیل کوآ اکسیداز هستند که در اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بلند مشارکت می‌کنند و استیل کوآ (واحد سازنده کلسترول) را تأمین می‌کنند. علاوه بر این، پراکسی‌زوم‌ها در سنتز واسطه‌های ایزوپرنوئیدی، به‌ویژه در تبدیل موالات به ایزوپنتیل پیروفسفات نقش دارند. ارتباط فیزیکی و عملکردی بین پراکسی‌زوم و ER از طریق نقاط تماس غشایی (Membrane Contact Sites) برقرار می‌شود که انتقال سریع متابولیت‌ها را ممکن می‌کند (۳۲).

بنابراین در کبد، بیوسنتز کلسترول، همکاری دقیق بین پراکسی‌زوم و شبکه آندوپلاسمی است. پراکسی‌زوم‌ها با تولید استیل کوآ و واسطه‌های اولیه، مواد خام را تأمین می‌کنند؛ در حالی که شبکه آندوپلاسمی صاف این مواد را از طریق مسیر موالونات به کلسترول تبدیل می‌کند. غشای شبکه آندوپلاسمی نه تنها محل انجام واکنش‌ها است، بلکه با تنظیم سیالیت و ترکیب لیپیدی خود، کارایی آنزیم‌ها را نیز بهینه می‌کند. این فرایند در کبد حیاتی است؛ زیرا کلسترول سنتز شده یا به‌عنوان جزء غشای پلاسمایی استفاده می‌شود یا به اسیدهای صفراوی تبدیل می‌شود و در متابولیسم چربی‌ها نقش بازی می‌کند (۳۳).

به‌منظور بررسی عملکردها و مسیرهای بیولوژیکی کلیدی دخیل در بیوسنتز کلسترول، از غنی‌سازی ژن‌های زیرشبکه‌ها بر اساس پایگاه‌داده KEGG استفاده شد. پایگاه‌داده KEGG به‌عنوان ابزاری جامع، امکان تخصیص مسیرهای متابولیکی خاص به گروه‌های ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) را فراهم می‌کند و داده‌های امیکس (omics) را به اطلاعات عملکردی در سطح بالاتر پیوند می‌دهد. این رویکرد تحلیلی نقش محوری مسیرهای متابولیکی در سنتز کلسترول را آشکار کرد و ارتباطات پیچیده بین ژن‌ها و فرایندهای بیوشیمیایی را برجسته کرد (۳۴).

نتایج تحلیل غنی‌سازی نشان داد که مسیرهای اصلی درگیر در بیوسنتز کلسترول شامل مسیرهای متابولیک عمومی، بیوسنتز ساختار اصلی ترپنوئیدها و بیوسنتز استروئیدها هستند. این مسیرها به ترتیب مراحل تولید پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدی، تبدیل آن‌ها به واسطه‌های استروئیدی و درنهایت سنتز کلسترول را در بر می‌گیرند. تجزیه و تحلیل مبتنی

بر KEGG که در جدول ۲ ارائه شده است، ارتباطات عملکردی و سلسله‌مراتبی بین این مسیرها را نمایش می‌دهد و بر اهمیت آن‌ها به‌عنوان محورهای تنظیم‌کننده متابولیسم لیپیدی تأکید دارد.

جدول ۲- مسیرهای بیولوژیکی شناسایی شده براساس دایره‌المعارف ژن‌ها و ژنوم‌های کیوتو (KEGG) روی ژن‌های زیرشبکه ژن‌های هاب در بیوسنتز کلسترول با استفاده از STRING نسخه ۱۲ (<http://string-db.org>)

Table 2- Biological pathways identified based on the kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) for hub gene subnetworks in cholesterol biosynthesis using STRING version 12 (<http://string-db.org>)

تعداد ژن مشاهده شده Observed Genes	تعداد ژن یافت شده Identified Genes	
11	1534	مسیرهای متابولیکی Metabolic Pathways
5	23	بیوسنتز ساختار اولیه مولکول‌های ترپنوئید Biosynthesis of The Basic Framework of Terpenoid Molecules
6	20	بیوسنتز استروئید Steroid Biosynthesis

اکثر ژن‌های هاب فهرست‌شده در جدول ۱ به‌طور برجسته در مسیرهای مرتبط با بیوسنتز استروئیدها مشارکت دارند. تحلیل غنی‌سازی مبتنی بر پایگاه داده KEGG اهمیت عملکردی این ژن‌ها را تأیید کرد و الگوهای مسیرهای اصلی دخیل را همان‌طور که در شکل (۵) ارائه شده است، به‌وضوح نشان داد. یکی از مسیرهای کلیدی شناسایی شده، بیوسنتز ساختار اصلی ترپنوئیدها است که نقش اساسی در تولید پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدی موردنیاز برای سنتز کلسترول ایفا می‌کند. این مسیرها به‌عنوان محورهای مرکزی در تنظیم متابولیسم استروئیدی و لیپیدی شناخته می‌شوند. علاوه بر این، برای اعتبارسنجی یافته‌های حاصل از تحلیل‌های غنی‌سازی (GO) و KEGG، یک تحلیل خوشه‌بندی شبکه (Network Clustering Analysis) انجام شد. این رویکرد امکان شناسایی خوشه‌های ژنی به‌هم‌پیوسته و مرتبط از نظر عملکردی را فراهم کرد و درک جامع‌تری از تعاملات پیچیده درون شبکه‌های ژنی دخیل در بیوسنتز کلسترول ارائه داد. نتایج این تحلیل، هم‌راستایی قوی بین ژن‌های هاب و مسیرهای متابولیکی کلیدی را تأیید نمود و بر نقش هماهنگ آن‌ها در تنظیم این فرایند بیوشیمیایی تأکید کرد.

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای شبکه

تحلیل خوشه‌بندی شبکه‌های بیولوژیکی یکی از استراتژی‌های کلیدی برای شناسایی الگوهای عملکردی، پیش‌بینی کمپلکس‌های پروتئینی و کشف بیومارکرهای شبکه‌ای است که ساختار و سازمان‌دهی این شبکه‌ها را آشکار می‌کند. استفاده از الگوریتم‌های خوشه‌بندی، مانند آن‌هایی که در ابزار CytoCluster پیاده‌سازی شده‌اند، به نیازهای خاص تحقیق وابسته است. در این مطالعه، از شش الگوریتم خوشه‌بندی بهره گرفته شد که یکی از آن‌ها، الگوریتم IPCA، به‌عنوان یک روش مبتنی بر چگالی است. این الگوریتم زیرگراف‌های متراکم را در شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) شناسایی می‌کند و امکان تحلیل دقیق‌تر کمپلکس‌های مولکولی را فراهم می‌سازد.

در الگوریتم IPCA، وزن هر یال (Edge) براساس تعداد همسایه‌های مشترک بین دو گره متصل به آن (Common Neighbors) محاسبه می‌شود. سپس وزن هر گره از طریق مجموع وزن یال‌های متصل به آن تعیین می‌شود. این وزن گره به‌عنوان معیاری برای شناسایی هسته‌های اولیه در شبکه عمل می‌کند. فرایند خوشه‌بندی با انتخاب یک گره هسته آغاز می‌شود که به‌عنوان نقطه شروع یک خوشه در نظر گرفته می‌شود. در ادامه با استفاده از رویکرد بازگشتی IPCA،

گره‌های همسایه بر اساس اولویت وزنشان به خوشه اضافه می‌شوند. معیارهای افزودن یک گره به خوشه شامل دو شرط اصلی است: (الف) احتمال تعامل گره با اعضای موجود در خوشه (Interaction Probability) و (ب) طول کوتاه‌ترین مسیر (Shortest Path Length) بین گره مدنظر و گره‌های داخل خوشه. این شروط تضمین می‌کنند که خوشه‌ها از نظر عملکردی مرتبط و از نظر ساختاری منسجم باشند (۱۵).

در این مطالعه، با تجزیه و تحلیل خوشه‌ای زیرشبکه ۱۳ خوشه به دست آمد که از بین آن‌ها خوشه با رتبه‌بندی ۱ انتخاب کردیم (جدول ۳). مسیرهای مشترک برای خوشه شامل بیوسنتز استروئید، بیوسنتز ساختار اولیه مولکول‌های ترپنوئید و مسیرهای متابولیک است. همپوشانی بین ژن‌های شمارش شده در مسیرهای KEGG و نتیجه تجزیه و تحلیل خوشه‌ای تأیید کرد که سه مسیر، مسیر اصلی در بیوسنتز کلسترول هستند. تجزیه و تحلیل شبکه با استفاده از داده‌های RNA-Seq و خوشه بندی به ما کمک کرد تا مهم‌ترین آن‌ها را در پاسخ به بیوسنتز کلسترول نشان دهیم.

جدول ۳- خلاصه خوشه‌ها (رتبه ۱) حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای از زیرشبکه ژن‌های هاب بیان شده در بیوسنتز کلسترول

با استفاده از برنامه CytoCluster

Table 3- Summary of clusters (Rank 1) resulting from cluster analysis of hub gene subnetworks expressed in cholesterol biosynthesis using the CytoCluster program

عملکرد	تعامل (یال)	گره	رتبه	خوشه	Function
	Interaction (Edge)	Node	Rank	Cluster	
بیوسنتز استروئید					Steroid biosynthesis
بیوسنتز ساختار اولیه مولکول‌های ترپنوئید	73	13	1	1	Biosynthesis of The Basic Framework of Terpenoid Molecules
مسیرهای متابولیک					Metabolic pathways

بحث و نتیجه‌گیری

بیوسنتز کلسترول

بیوسنتز کلسترول در کبد، فرایندی حیاتی برای حفظ همئوستاز لیپیدی و تولید اجزای ساختاری غشاها و پیش‌سازهای هورمونی است که عمدتاً از طریق مسیر موالونات در شبکه آندوپلاسمی صاف و پراکسی‌زوم‌ها انجام می‌شود. ژن‌های Id1, Id1, Fdps, Stard4, Hmgcs1, Hmgcr, Hsd17B7, Lss, Sqle, Nsdhl, Mvd, Dchr7, Ldlr و Fdft1 در این مسیر نقش‌های متنوع و مکمل ایفا می‌کنند که در ادامه به طور جامع بررسی می‌شوند.

همان طور که ذکر شد، مسیر بیوسنتز کلسترول از استیل کوآنزیم A آغاز می‌شود؛ جایی که Hmgcs1 دو مولکول استیل کوآ را به آستوآستیل کوآ و سپس به HMG-CoA تبدیل می‌کند. این مرحله توسط Hmgcr دنبال می‌شود که HMG-CoA را به موالات کاهش می‌دهد؛ واکنشی که به عنوان مرحله محدودکننده و هدف اصلی استاتین‌ها است. موالونات سپس توسط Mvd به ایزوپنتنیل پیروفسفات IPP تبدیل می‌شود. ژن Id1, IPP را به DMAPP ایزومریزه می‌کند؛ در حالی که Fdps این مولکول‌ها را به FPP تبدیل می‌کند که پیش‌ساز کلیدی ترپنوئیدها است (۳۶، ۳۵). در ادامه، Fdft1 دو مولکول FPP را به اسکوالن متصل می‌کند که توسط Sqle به ۲،۳-اکسیداسکوالن اکسید می‌شود. این مولکول سپس توسط Lss به لانوسترول سیکل می‌شود که اولین استروئید در مسیر است. تبدیل لانوسترول به کلسترول شامل چندین واکنش متوالی است که ژن‌های Hsd17B7, Nsdhl و Dchr7 در آن دخیل هستند؛ به‌ویژه Dchr7

مرحله نهایی را کاتالیز می کند و ۷-دهیدروکلسترول را به کلسترول تبدیل می کند. نقص در این ژن با اختلالات متابولیکی مرتبط است (۳۷، ۳۸).

علاوه بر این، ژن Stard4 در انتقال کلسترول درون سلولی نقش دارد و توزیع آن را بین اندامکها تنظیم می کند که برای دسترسی به مسیر بیوسنتز حیاتی است. درمقابل، Ldlr بیشتر در جذب کلسترول خارجی از خون دخیل است و از طریق بازخورد منفی، بیان ژنهای بیوسنتزی مانند Hmgcr را تنظیم می کند. انتخاب ژنهای Idl1، Fdps، Stard4، Hmgcs1، Hmgcr، Hsd17B7، Lss، Sqle، Nsdhl، Mvd، Dhcr7 و Ldlr برای مطالعه بیوسنتز کلسترول کبدی مبتنی بر نقشهای محوری آنها در مسیر موالونات و تنظیم همئوستاز لیپیدی است. این ژنها به طور استراتژیک در مراحل مختلف این مسیر، از تولید پیش سازهای اولیه تا سنتز نهایی کلسترول قرار دارند و تعاملات پیچیده آنها در شبکههای متابولیکی کبد را نمایان می کنند. انتخاب این مجموعه ژنها براساس تحلیلهای بیوانفورماتیک مانند غنی سازی مسیرهای KEGG، GO و همچنین دادههای تجربی از مطالعات اخیر، نشان دهنده نقش حیاتی آنها در متابولیسم لیپیدها و پتانسی آنها به عنوان اهداف درمانی در اختلالات کلسترول است. علاوه بر این، این ژنها به دلیل پوشش کامل مراحل بیوسنتز کلسترول انتخاب شدند. این انتخاب نه تنها نمایانگر یک دید جامع از مسیر است، بلکه امکان مطالعه تعاملات سیستمی و شناسایی نقاط کنترل کلیدی را نیز فراهم می کند (۳۹-۴۱).

ژنهای Idl1 و Mvd، Fdps، Lss، Sqle به عنوان ژنهای هاب شناسایی شدند؛ زیرا در تحلیل شبکههای تعامل پروتئین-پروتئین (PPI) و غنی سازی مسیرها، درجه اتصال بالا (High Degree of Connectivity) و نقش مرکزی در تنظیم بیوسنتز کلسترول نشان داده اند. ژنهای هاب معمولاً در شبکههای بیولوژیکی به عنوان گرههایی با تعداد زیاد تعاملات شناخته می شوند که حذف آنها می تواند ساختار شبکه را به طور درخور توجهی مختل کند (۴۲-۴۵).

تأثیر فعالیت ورزشی بر بیوسنتز کلسترول

تنظیم بیوسنتز کلسترول تحت تأثیر ورزش

بیوسنتز کلسترول در کبد، فرایندی پیچیده و به دقت تنظیم شده است که به شدت تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می گیرد. تحقیقات نشان می دهند که تمرینات طولانی مدت (چه هوازی و چه مقاومتی) می توانند بیان ژنهای کلیدی این مسیر را به طور درخور توجهی تغییر دهند: تمرینات استقامتی (۶۰-۸۰ درصد حداکثر ضربان قلب، ۱۵۰ دقیقه/هفته) بیان HMGCR را تا ۴۰ درصد کاهش می دهند. این کاهش عمدتاً از طریق فعال سازی مسیر AMPK رخ می دهد که با فسفوریلاسیون HMGCR در سرین-۸۷۲، فعالیت آن را مهار می کند. از طرفی تمرینات مقاومتی (۷۰ تا ۸۵ درصد، سه جلسه/هفته) بیان SREBP-2 را تا ۳۵ درصد کاهش می دهند؛ در نتیجه ترانس کریپشن ژنهای پایین دست مانند Fdps و Hmgcs1 را مهار می کنند (۴۶-۴۸).

پاسخ دوگانه به ورزش: حاد و مزمن

مطالعات حیوانی نشان داده اند که پاسخ ژنهای بیوسنتز کلسترول به ورزش به شدت و مدت آن بستگی دارد. ورزش مزمن منجر به کاهش پایدار بیان ژنهایی مانند Hmgcr، Hmgcs1، Mvd، Idl1، Fdps، Sqle، Lss و Dhcr7 به دلیل بهبود متابولیسم لیپیدی و کاهش نیاز به سنتز کلسترول می شود. از طرفی، ورزش حاد یا شدید منجر به افزایش موقت بیان این ژنها برای تأمین نیازهای ترمیم غشا و تولید هورمونهای استروئیدی می شود. این دوگانگی نشان دهنده انعطاف پذیری مسیر موالونات در پاسخ به استرسهای فیزیولوژیک است (۴۹-۵۱).

ژن‌های هاب و نقش محوری آن‌ها در سازگاری ورزشی

تحلیل‌های شبکه‌ای نشان می‌دهند که برخی ژن‌ها به دلیل موقعیت مرکزی در مسیر متابولیک، تأثیرپذیری بیشتری از ورزش دارند؛ به عنوان مثال، Fdps و Idi1 نه تنها برای کلسترول، بلکه برای سنتز کوآنزیم Q10 (ضروری برای تولید انرژی میتوکندریایی) نیز حیاتی است. Mvd تنظیم‌کننده اصلی ورود به مسیر ایزوپرنوئیدها است. Sqle و Lss کاتالیزورهای مراحل کلیدی تبدیل اسکوالن به لانوسترول هستند. مطالعات نشان داده‌اند که این ژن‌های هاب در پاسخ به ورزش به عنوان گره‌های کلیدی عمل کرده و تعادل متابولیکی را در شرایط مختلف ورزشی حفظ می‌کنند (۵۱-۴۹)؛ به عنوان مثال، هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) می‌تواند بیان Sqle و Lss را تا ۵۰ درصد کاهش دهد (۵۲).

پیامدهای بالینی و راهکارهای تمرینی

یکی از راه‌های تمرینی ترکیب تمرینات با یکدیگر است. پروتکل‌های ترکیبی (۳ جلسه هوازی + ۲ جلسه مقاومتی در هفته) هم‌زمان هم سنتز کلسترول را کاهش می‌دهند و هم جذب آن را از طریق افزایش LDLR بهبود می‌بخشد (۳). راه دیگر مدیریت، شدت تمرین است. در افراد با هایپرکلسترولمی خانوادگی (FH)، تمرینات با شدت متوسط (۴۰-۶۰ درصد حداکثر ضربان قلب) برای جلوگیری از افزایش موقت سنتز کلسترول توصیه می‌شود و در نهایت تأثیرات سازوکارهای اپی‌ژنتیک است. اخیراً مشخص شده است که ورزش می‌تواند از طریق تغییرات متیلاسیون DNA در پروموتور ژن‌هایی مانند HMGR، اثرات بلندمدت بر متابولیسم کلسترول داشته باشد (۵۵-۵۳).

بنابراین فعالیت ورزشی از طریق مکانیسم‌های چندگانه (کاهش بیان ژن‌های سنتز کلسترول، افزایش جذب LDL و تنظیم اپی‌ژنتیک) بر هموستاز کلسترول تأثیر می‌گذارد. درک این مکانیسم‌ها می‌تواند به طراحی برنامه‌های ورزشی شخصی‌سازی شده برای مدیریت دیس لیپیدمی کمک کند.

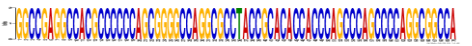
تجزیه و تحلیل موتیف پروموتور ژن هاب

UFRs (1kbp) ژن هاب برای کشف نقوش حفظ شد و عناصر نظارتی مشترک سیس (CREs) تجزیه و تحلیل شد. UFRها از Ensemble Plants بازیابی شدند. با استفاده از MEME، شش موتیف قابل توجه با طول‌های ۱۱ تا ۲۹ جفت باز در پروموتورهای ژن‌ها کشف شد. چندین عملکرد بیولوژیکی با تجزیه و تحلیل GOMo برای نقوش فاکتور رونویسی (TFs) از جمله BP، MF و CC شناسایی شد. GO نشان داد که این CREها در اتصال یون روی و ATP که احتمالاً در فرایندهای تولید انرژی و سیگنالینگ داخل سلول و تنظیم رونویسی نقش دارند.

این یافته‌ها درک ما را از تنظیم ژن‌های مسیر بیوسنتز کلسترول عمیق‌تر می‌کند و می‌تواند به شناسایی اهداف جدید برای مداخلات متابولیکی منجر شود. CREs نقاطی از DNA هستند که توسط عوامل نظارتی (TFs) شناخته می‌شوند و به تنظیم فعالیت ژن‌ها کمک می‌کنند. تحلیل CREها به شناسایی نقاط اتصال فاکتورهای رونویسی و نحوه هماهنگی بیان ژن‌های کلیدی در بیوسنتز کلسترول کمک می‌کند. این اطلاعات می‌تواند به شناسایی اهداف دارویی جدید برای دیس لیپیدمی کمک کند؛ مثلاً با هدف قراردادن CREها برای تغییر بیان ژن‌ها. همچنین این تحلیل نشان می‌دهد که ژن‌های هاب ممکن است به صورت گروهی تنظیم شوند که برای پاسخ‌های متابولیکی در شرایط مختلف حیاتی است.

جدول ۴- موتیف‌های حفاظت‌شده شناسایی‌شده در پروموتورهای ژن‌های هاب DEGs براساس آنالیز MEME

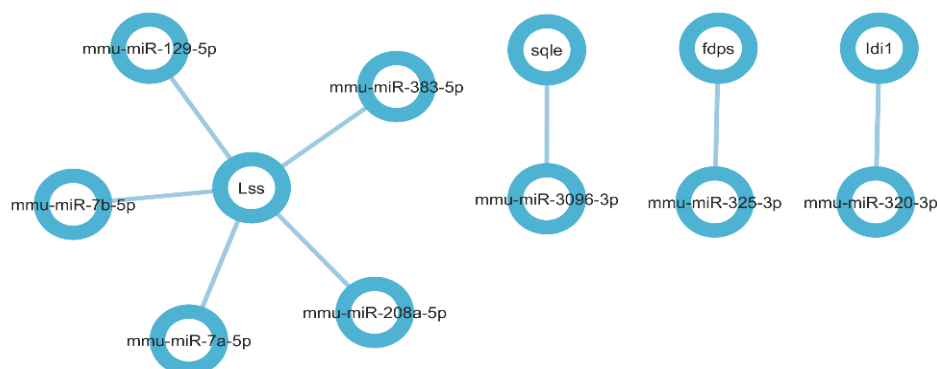
Table 4- Conserved motifs identified in the promoters of hub genes (DEGs) based on MEME analysis

موتیف Motif	لوگو Logo	عرض Width	۵ پیش‌بینی خاص 5 specific predictions
MA0741.1		980	BP transcription
			MF ATP binding
			MF zinc ion binding
			BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
			BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
MA1890.1		974	BP transcription
			MF ATP binding
			MF zinc ion binding
			BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
			BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
MA1892.1		980	BP transcription
			MF ATP binding
			MF zinc ion binding
			BP positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
			BP negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

شناسایی miRNA هایی که ژن هاب را هدف قرار می‌دهند

برای بررسی تعاملات نظارتی احتمالی بین ژن‌های هاب و میکروRNAها از تحلیل جامع بیوانفورماتیکی استفاده شد. در ابتدا، نواحی ۳' غیرترجمه‌شده (UTRs) ژن‌های هاب از پایگاه داده (Ensembl نسخه ۱۱۰، <http://asia.nseml.org>) استخراج شدند. سپس پیش‌بینی اهداف miRNA با استفاده از ابزار (TargetScan نسخه ۸، <http://www.targetscan.org>) که به طور گسترده برای شناسایی سایت‌های اتصال miRNA در پستانداران به کار می‌رود، انجام شد. توالی‌های ۳' UTR ژن‌های هاب در برابر پایگاه داده موش TargetScan (Mus musculus) بررسی شدند و تمرکز بر خانواده‌های miRNA با درجه تعامل بالا بود. پارامترهای TargetScan به گونه‌ای تنظیم شد که تعاملات اطمینان بالا را اولویت دهد و سایت‌هایی با هم‌خوانی‌های با درصد بالای ۹۰ انتخاب شدند. برای اعتبارسنجی تعاملات پیش‌بینی‌شده miRNA-هدف، از پایگاه داده miRTarBase (نسخه ۲۰۲۵، <http://mirtarbase.cuhk.edu.cn>) استفاده شد. در نهایت، شبکه تعاملات miRNA-ژن‌های هاب با استفاده از نرم‌افزار (Cytoscape نسخه ۳.۱۰، <https://cytoscape.org>) ساخته شد.

miRNAها به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی بیان ژن در سطح پسا-ترانسکریپتومی شناخته می‌شوند و نقش مهمی در متابولیسم لیپیدها و هومئوستاز کلسترول دارند. این تحلیل نه تنها درک ما از مکانیسم‌های تنظیم ژنی را عمیق‌تر می‌کند، بلکه پتانسیل توسعه استراتژی‌های درمانی نوآورانه را نیز فراهم می‌آورد. این تنظیم می‌تواند نقاط کلیدی برای مداخلات دارویی فراهم کند؛ به‌ویژه برای درمان‌هایی که هدفشان کاهش سطح کلسترول در دیس لیپیدمی است. با شناسایی miRNAهایی که ژن‌های هاب را هدف قرار می‌دهند، می‌توان آنتاگونیست‌ها یا آگونیست‌های miRNA را طراحی کرد تا بیان ژن‌ها را به صورت هدفمند تغییر دهد.



شکل ۷- شبکه تعاملات پیش‌بینی‌شده بین ژن‌های هاب و miRNA ها در *Mus musculus*. ساخته‌شده با Cytoscape
Figure 7- Predicted interaction network between hub genes and miRNAs in *Mus musculus*, constructed using Cytoscape

پیام مقاله

این مطالعه با شناسایی و تحلیل پنج ژن هاب در بیوسنتز کلسترول، درک ما از شبکه‌های تنظیم ژنی و نقش ER سلولی را عمیق‌تر کرد. تحلیل GO و KEGG نشان داد که این ژن‌ها در فرایندهای متابولیکی کلیدی دخیل‌اند و پتانسیل زیادی برای مدیریت بیماری‌های مرتبط با اختلال در بیوسنتز کلسترول دارند. تعامل پویا بین بیوسنتز کلسترول و فعالیت ورزشی می‌تواند به‌عنوان استراتژی‌ای برای کنترل مؤثر این فرایند استفاده شود و ژن‌های شناسایی‌شده به‌عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی امیدوارکننده برای بیماری‌های متابولیکی مطرح هستند. این یافته‌ها پایه‌ای برای تحقیقات آینده در توسعه درمان‌های نوآورانه و مدیریت اختلالات لیپیدی فراهم می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان (کد اخلاق: IR.UI.REC.1403.005) تأیید شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، جمع‌آوری داده‌ها، نگارش مقاله: میلاد عبداللهی
مدیر پروژه، بررسی و ویرایش: سیدمحمد مرندي
تحلیل، بررسی و ویرایش داده‌ها: زهرا صفایی‌نژاد
بررسی ادبیات، بررسی و ویرایش: محمدحسین نصر اصفهانی

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

صمیمانه از پژوهشگاه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی به خاطر حمایت‌های بی‌دریغ در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. Wang L, Duan W, Ruan C, Liu J, Miyagishi M, Kasim V, Wu S. YY2-CYP51A1 signaling suppresses hepatocellular carcinoma progression by restraining de novo cholesterol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2025;(3):31871. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2025.167658>
2. Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015;161(1):161-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036> (Cell / PubMed).
3. Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Medicine*. 2014;44:211-21. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0110-5> (PubMed).
4. Noubiap JJN, Nansseu JRN, Bigna JJR, Jingi AM, Kengne AP. Prevalence and incidence of dyslipidaemia among adults in Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open*. 2015;5(3):e007404. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-007404> (BMJ Open).
5. Timori M, Ajami M, Shakerian M, Sareh M, Abdollahi M. Assessment of non-communicable diseases status and dietary patterns in patients with dyslipidemia in Alvand city. *Iranian Journal of Epidemiology*. 2024;20(2):106-17. <https://doi.org/10.18502/ijre.v20i2.17634>.
6. Brooks GA, Fahey TD, Baldwin KM. Exercise physiology: human bioenergetics and its applications. 2005. <https://doi.org/ISBN-13:9780072556421>.
7. Liu C, Chen H, Hu B, Shi J, Chen Y, Huang K. New insights into the therapeutic potentials of statins in cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:118892. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1124596> (Frontiers).
8. Kenney WL, Wilmore JH, Costill DL. Physiology of sport and exercise: Human Kinetics; 2022. <https://doi.org/ISBN-13:9781718203676>
9. Smart NA, Downes D, Van Der Touw T, Hada S, Dieberg G, Pearson MJ, et al. The effect of exercise training on blood lipids: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*. 2024;1-12. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0816-5>
10. Long T, Debler EW, Li X. Structural enzymology of cholesterol biosynthesis and storage. *Current Opinion in Structural Biology*. 2022;74:102369. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102369>.
11. Duan Y, Gong K, Xu S, Zhang F, Meng X, Han J. Regulation of cholesterol homeostasis in health and diseases: from mechanisms to targeted therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):265. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01125-5>.
12. Shi Q, Chen J, Zou X, Tang X. Intracellular cholesterol synthesis and transport. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10:819281. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.819281>.
13. Xie H, Weinstein H. Recognition of specific pip2-subtype composition triggers the allosteric control mechanism for selective membrane targeting of cargo loading and release functions of the intracellular sterol transporter stard4. *J Mol Bio*. 2025;169157. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5071483>
14. Kumar R, Chhillar N, Gupta DS, Kaur G, Singhal S, Chauhan T. Cholesterol homeostasis, mechanisms of molecular pathways, and cardiac health: a current outlook. *Current Problems in Cardiology*. 2024;49(1):102081. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.102081> (ScienceDirect).
15. 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>
16. Ma Y, Kan C, Qiu H, Liu Y, Hou N, Han F, et al. Transcriptomic analysis reveals the protective effects of empagliflozin on lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:793586. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.793826> (Frontiers).

17. Arivazhagan L, Delbare S, Wilson RA, Manigrasso MB, Zhou B, Ruiz HH, et al. Sex differences in murine MASH induced by a fructose-palmitate-cholesterol-enriched diet. *JHEP Reports*. 2025;7(2):101222. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101222>.
18. Wang W, Chen Y, Bai L, Zhao S, Wang R, Liu B, et al. Transcriptomic analysis of the liver of cholesterol-fed rabbits reveals altered hepatic lipid metabolism and inflammatory response. *Scientific Reports*. 2018;8(1):6437. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24813-1>.
19. Cheng CW, Pedicini L, Alcalá CM, Deligianni F, Smith J, Murray RD, et al. RNA-seq analysis reveals transcriptome changes in livers from Efcab4b knockout mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2025;41:101944. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2025.101944>.
20. Melo L, Hagar A, Klaunig J. Gene expression signature of exercise and change of diet on non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Comparative Exercise Physiology*. 2022;18(2):143-54. <https://doi.org/10.3920/CEP210033>.
21. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq675>.
22. Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, Ho C-W, Ko M-T, Lin C-Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*. 2014;8:1-7. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>.
23. Yon Rhee S, Wood V, Dolinski K, Draghici S. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(7):509-15. <https://doi.org/10.1038/nrg2363>.
24. Aguilera-Olguín M, Leiva A. The LDL receptor: Traffic and function in trophoblast cells under normal and pathological conditions. *Placenta*. 2022;127:12-9. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.07.013>.
25. Zhou F, Sun X. Cholesterol metabolism: a double-edged sword in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:762828. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.707733> (Frontiers).
26. Zhao Z, Li B, Chen Q, Xiang X, Xu X, Han S, et al. Dietary palm oil enhances Sterol regulatory element-binding protein 2-mediated cholesterol biosynthesis through inducing endoplasmic reticulum stress in muscle of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *British Journal of Nutrition*. 2024;131(4):553-66. <https://doi.org/10.1017/S0007114523001344>.
27. Xia Q, Lu F, Chen Y, Li J, Huang Z, Fang K, et al. 6-Gingerol regulates triglyceride and cholesterol biosynthesis to improve hepatic steatosis in MAFLD by activating the AMPK-SREBPs signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;170:116060. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116060>.
28. Dao W, Chen H, Ouyang Y, Huang L, Fan X, Miao Y. Molecular characteristics and role of buffalo SREBF2 in triglyceride and cholesterol biosynthesis in mammary epithelial cells. *Genes*. 2025;16(2):237. <https://doi.org/10.3390/genes16020237>.
29. Ribas V. Role of cholesterol homeostasis in MASH-driven hepatocellular carcinoma: not just a neutral fat. *Exploration of Digestive Diseases*. 2024;3(3):203-25. <https://doi.org/10.37349/edd.2024.00048>.
30. Xu H, Li Y, Guo N, Wu S, Liu C, Gui Z, et al. Caveolin-1 mitigates the advancement of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by reducing endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through the restoration of cholesterol homeostasis. *International Journal of Biological Sciences*. 2025;21(2):490. <https://doi.org/10.7150/ijbs.100794>.
31. Zhang C, Dai W, Yang S, Wu S, Kong J. Resistance to cholesterol gallstone disease: hepatic cholesterol metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2024;109(4):912-23. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad528>.

32. Jang W, Haucke V. ER remodeling via lipid metabolism. Trends in Cell Biology. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2024.01.011>
33. Knoblach B, Rachubinski RA. Peroxisome population control by phosphoinositide signaling at the endoplasmic reticulum-plasma membrane interface. Traffic. 2024;25(1):e12923. <https://doi.org/10.1111/tra.12923>
34. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Research. 2000;28(1):27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
35. Waterham HR, Vaz FM. Cholesterol Biosynthesis Metabolites. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics: Springer; 2024. p. 267-82. https://doi.org/10.1007/978-3-031-58819-8_15
36. Zhang X, Chen Y, Sun G, Fei Y, Zhu H, Liu Y, et al. Farnesyl pyrophosphate potentiates dendritic cell migration in autoimmunity through mitochondrial remodelling. Nature Metabolism. 2024;1-20. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01149-x>
37. Chen M, Yang Y, Chen S, He Z, Du L. Targeting squalene epoxidase in the treatment of metabolic-related diseases: current research and future directions. PeerJ. 2024;12:e18522. <https://doi.org/10.7717/peerj.18522>
38. Picón DF, Skouta R. Unveiling the therapeutic potential of squalene synthase: deciphering its biochemical mechanism, disease implications, and intriguing ties to ferroptosis. Cancers. 2023;15(14):3731. <https://doi.org/10.3390/cancers15143731>
39. Kakiyama G, Rodriguez-Agudo D, Pandak WM. Mitochondrial cholesterol metabolites in a bile acid synthetic pathway drive nonalcoholic fatty liver disease: a revised “two-hit” hypothesis. Cells. 2023;12(10):1434. <https://doi.org/10.3390/cells12101434>.
40. Russo-Savage L, Schulman IG. Liver X receptors and liver physiology. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease. 2021;1867(6):166121. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2021.166121>
41. Kennewick KT, Bensinger SJ. Decoding the crosstalk between mevalonate metabolism and T cell function. Immunological Reviews. 2023;317(1):71-94. <https://doi.org/10.1111/imr.13200>
42. Liu J, Zhang X, Zhang Y, Qian M, Yang M, Yang S, Wang L. Farnesyl diphosphate synthase exacerbates nonalcoholic steatohepatitis via the activation of AHR-CD36 axis. The FASEB Journal. 2023;37(7):e23035. <https://doi.org/10.1096/fj.202300590RRR/10.1096>
43. Liebl M, Olander F, Müller C. Targeting the isoprenoid pathway in cholesterol biosynthesis: An approach to identify isoprenoid biosynthesis inhibitors. Archiv der Pharmazie. 2025;358(2):e2400807. <https://doi.org/10.1002/ardp.202400807>.
44. Li X, Li M. Unlocking cholesterol metabolism in metabolic-associated steatotic liver disease: molecular targets and natural product interventions. Pharmaceuticals. 2024;17(8):1073. <https://doi.org/10.3390/ph17081073>.
45. Kamel EM, Othman SI, Alkhayl FFA, Rudayni HA, Allam AA, Lamsabhi AM. Mechanistic insights into alkaloid-based inhibition of squalene epoxidase: a combined in silico and experimental approach for targeting cholesterol biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules. 2025;140609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140609>.
46. Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the adaptation to exercise. Annual Review of Physiology. 2022;84(1):209-27. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-060721-095517>
47. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. Biochemical Journal. 2009;418(2):261-75. <https://doi.org/10.1042/BJ20082055>
48. Lee TV. Dietary Cholesterol and Resistance Training as Countermeasures to Accelerated Muscle Loss 2015. <https://doi.org/10.1101/2024.10.21.619494>

49. Maleki S, Azarbayjani MA, Riyahi MS, Peeri M, Rahmati AS. The effect of aerobic exercise and ethanolic extract of rice bran on the expression of Acetyl-CoA Carboxylase and HMGCR genes in the liver tissue of rats fed with a high-fat diet. *Health*. 2024;2(3):89-100. <https://doi.org/10.61838/kman.hn.2.3.11>
50. Kahl CG ,Deas C. Exercise-induced anaphylaxis in an air force aviator taking a HMG-CoA reductase inhibitor: a case report and review of the presentation, diagnoses, and treatment. *Military Medicine*. 2017;182(5-6):e1816-e9. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-16-00247>.
51. Kugler BA, Maurer A, Fu X, Franczak E, Ernst N, Schwartz K, et al. Aerobic capacity and exercise mediate protection against hepatic steatosis via enhanced bile acid metabolism. *bioRxiv*. 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.10.21.619494>
52. Berglund I, Vesterbekkmo EK, Retterstøl K, Anderssen SA, Singh MAF, Helge JW, et al. The long-term effect of different exercise intensities on high-density lipoprotein cholesterol in older men and women using the per protocol approach: the Generation 100 Study. *Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes*. 2021;5(5):859-71. <https://doi.org/10.1016/j.mayocpiqo.2021.07.002>
53. Zhang L ,Cao Z, Hong Y, He H, Chen L, Yu Z, Gao Y. Squalene epoxidase: its regulations and links with cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(7):3874. <https://doi.org/10.3390/ijms25073874>
54. Liu J, Liu W, Wan Y, Mao W. Crosstalk between exercise and immunotherapy: current understanding and future directions. *Research*. 2024;7:0360. <https://doi.org/10.34133/research.0360>
55. Fan X, Wang H, Wang W, Shen J, Wang Z. Exercise training alleviates cholesterol and lipid accumulation in mice with non-alcoholic steatohepatitis: Reduction of KMT2D-mediated histone methylation of IDI1. *Experimental Cell Research*. 2024;442(2):114265. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114265>