

Original Article

Effect of *Kelussia odoratissima* Mozaff extract on *PNPLA3* gene expression in non-alcoholic fatty liver and control rats

Hadis Mohammadi¹, Noosha Zia-Jahromi^{1*}, Abdul Rasul Namjoo²

ABSTRACT

Background and Aims: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with such symptoms as steatosis, fibrosis, and liver cirrhosis. *Kelussia* has attracted assiduous attention due to its protective effects on the liver. The *PNPLA3* gene is mainly expressed in the liver and plays a major role in the degradation rate of hepatic triglycerides. Therefore, the present study aimed to assess the effect of *Kelussia* extract on *PNPLA3* gene expression in rats with fatty liver and healthy rats.

Materials and Methods: This experimental study was conducted on 24 male Wistar rats in the control group (no treatment), obese group (which received a high-fat diet), treatment group 1 (which received a high-fat diet with *Kelussia* extract 400 mg/kg) and treatment group 2 (a high-fat diet with *Kelussia* extract 800 mg/kg) for six weeks. Blood samples were taken from rats and the factors of (LDL, HDL, Cholesterol, Triglyceride, and fasting sugar) were measured. After sampling the rat liver, the effect of *Kelussia* on *PNPLA3* gene expression was investigated using the Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and analyzed in SPSS software (version 22).

Results: Based on the results, *Kelussia* extract at a dose of 800 mg/kg resulted in a more dramatic decrease in *PNPLA3* gene expression in rats with fatty liver, compared to a dose of 400 mg /kg, and this reduction was statistically significant, compared to the fatty liver group ($P<0.05$). The results of biochemical tests confirmed liver improvement in the rats treated with *Kelussia* extract at a dose of 800 mg/kg.

Conclusion: It can be said that *Kelussia* had a beneficial effect on the reduction of blood lipids; moreover, it reduces the accumulation of triglycerides in the liver and improves the tissue structure of the liver by reducing the expression of *PNPLA3* gene; therefore, with more studies, it can be considered a supplement to reduce blood lipids.

Keywords: *Kelussia*, Non-alcoholic fatty liver, *PNPLA3* gene



Citation: Mohammadi H, Zia-Jahromi N, Namjoo AR. [Effect of *Kelussia odoratissima* Mozaff extract on *PNPLA3* gene expression in non-alcoholic fatty liver and control rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(4): 335-345. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.4.102>

Received: July 12, 2021

Accepted: December 13, 2021

¹ Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

² Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author:** Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Tel: +989133146504 Fax: +98383361000 E-mail: Nooshazia.59@gmail.com

بررسی اثر عصاره کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima Mozaff*) بر بیان ژن *PNPLA3* در رت های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی و رت های سالم

حدیث محمدی^۱، نوشا ضیاء جهرمی^{۱*}، عبدالرسول نامجو^۲

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) با علایمی شامل استئاتوز، فیبروز و سیروز کبدی همراه است. کرفس کوهی به دلیل اثرات محافظتی بر کبد مورد توجه می باشد. ژن *PNPLA3* عمدتاً در کبد بیان شده و نقش مهمی در سرعت تجزیه تری گلیسریدهای کبدی دارد؛ بنابراین در تحقیق حاضر به بررسی اثر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن *PNPLA3* در رت های مبتلا به کبد چرب و رت های سالم پرداخته شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار در گروه های کنترل (فاقد تیمار)، گروه چاق (دریافت کننده رژیم غذایی پرچرب، گروه تیمار ۱) (رژیم غذایی پر چرب به همراه عصاره کرفس کوهی ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و گروه تیمار ۲ (رژیم غذایی پرچرب به همراه عصاره کرفس کوهی ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) به مدت ۶ هفته استفاده گردید. سپس از موش ها خونگیری و فاکتورهای کلسترول، تری گلیسرید، قند، HDL و LDL اندازه گیری شد. پس از نمونه برداری از کبد رت ها، تأثیر کرفس کوهی بر بیان ژن *PNPLA3* به کمک تکنیک Real time RT-PCR بررسی و با کمک آزمون آماری SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: در تحقیق حاضر بررسی عصاره کرفس کوهی با دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم سبب کاهش بیشتر بیان ژن *PNPLA3* در رت های مبتلا به کبد چرب نسبت به دوز ۴۰۰ میلی گرم/کیلوگرم شد که این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه بیمار معنادار است ($P < 0.05$). نتایج تست های بیوشیمیایی بهبود کبد را در رت های تیمار شده با دوز ۸۰۰ میلی گرم/کیلوگرم تأیید کرد. **نتیجه گیری:** می توان گفت گیاه کرفس کوهی بر کاهش چربی خون اثر مطلوب داشته و با کاهش بیان ژن *PNPLA3* باعث کاهش تجمع تری گلیسرید در کبد و بهبود ساختار بافتی کبد می شود؛ بنابراین با بررسی های بیشتر استفاده از آن به عنوان مکمل و کاهنده چربی خون می تواند مطرح می گردد.

واژه های کلیدی: کرفس کوهی، کبد چرب غیرالکلی، *PNPLA3*

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۴): ۳۳۵-۳۴۵.

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۲ گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

آدرس: شهرکرد- رحمتیه- دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۶۵۰۴ نمابر: ۰۳۸۳۳۶۱۰۰۰ پست الکترونیکی: Nooshazia.59@gmail.com

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)^۱ به صورت تجمع چربی در کبد در عدم مصرف بیش از حد الکل تعریف می‌شود (۱). این بیماری شامل طیفی است که از استئاتوز (نفوذ چربی در کبد) به استئاتو هپاتیت (التهاب و آسیب سلول‌های کبدی) می‌رسد که فیروز کبدی و در نهایت سیروز کبدی را به دنبال دارد (۲). بیماری کبد چرب غیر الکلی در حال حاضر به عنوان یکی از شایع‌ترین علل بیماری مزمن کبدی در افراد جوان جامعه در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است. تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۳۰ مهم‌ترین علل مرگ و میر ناشی از بیماری‌های کبدی، کبد چرب غیرالکلی همراه چاقی باشد (۳-۵).

شیوع NAFLD با چندین عامل همچون سن، جنس، نژاد مرتبط است. همچنین این بیماری ارتباط قوی با چاقی، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک دارد (۶). شیوع NAFLD به موازات چاقی در حال افزایش است. این میزان در ایران ۵۴/۴٪ گزارش شده است. در مطالعه‌ای شیوع NAFLD در افراد چاق ۸۰٪ بوده است. در حالی که این میزان در افراد با نمایه توده بدنی نرمال (BMI)^۲ ۱۶٪ بیان شده است. علاوه بر این بیش از دو سوم افرادی که مبتلا به دیابت بوده اند، NAFLD داشته‌اند (۶). در بعضی از مطالعات بیان شده است که خطر ابتلا به NAFLD در بین مردان بیشتر از زنان است (۷-۹).

ژن مورد مطالعه در این تحقیق PNPLA3 می‌باشد که توسط Baulande در بافت چربی شناسایی شده است (۱۰-۱۲). این ژن بر روی بازوی بلند کروموزم ۲۲ قرار دارد. این ژن در انسان عمدتاً در کبد بیان می‌شود و متعلق به خانواده فسفولیپازهای مشابه با پانتین پروتئین‌ها است که حاوی آنزیم چربی تری‌گلیسرید لیپاز می‌باشد و پروتئین کلیدی دخیل در هیدرولیز تری‌گلیسریدها به دی‌گلیسریدها است (۱۰-۱۲). مطالعات اخیر آزمایشگاهی نشان می‌دهد که PNPLA3 با تبدیل اسید لیزو فسفاتیدیک به فسفاتیدیک اسید و تجمع چربی در سلول‌های کبدی در حضور اسید چرب مشاهده می‌شود؛ اما با گلوکز مشاهده نمی‌شود، لیپوژن را

افزایش می‌دهد و بر این اساس PNPLA3 از طریق استرین سازی اسیدهای چرب در سطح AGPAT^۳ (آسیل-CoA: 1-آسیل گلیسرول-3-sn فسفات استیل ترانسفراز) در داخل بدن نقش لیپوژنیک بازی می‌کند (۱۳). فعالیت‌های آن توسط مسیرهای هورمونی تنظیم رسوب چربی در کبد تنظیم می‌شود و همچنین در غدد آدرنال و بافت چربی بیان می‌شود و با PNPLA2 که هیدرولاز تری گلیسرید اصلی در بافت‌های چربی محیطی است مرتبط است. مشاهدات نشان می‌دهد که PNPLA3 یک پروتئین کلیدی را کدگذاری می‌کند که واسطه فرایندهای پاتولوژیک آسیب کبدی در اختلالات متابولیک است. تنوع در ژن به تفاوت‌های قومی و بین فردی در محتوای چربی کبد و استعداد ابتلا به بیماری کبد چرب غیر الکلی کمک می‌کند. یک جهش رایج در ژن مورد نظر مانع از تجزیه تری‌گلیسریدها در کبد می‌شود و تجمع چربی را افزایش می‌دهد (۱۴).

مطالعات انجام شده بر روی عصاره تام گیاه کرفس کوهی نشان دهنده وجود روتین ۳ و ۴ و ۷ تری هیدروکسی فلاونول، کافئیک اسید و فتالید بوده است. از آنجا که فلاونوئیدهای مزبور، به فرم آگلیکون هستند به دلیل شکل فضایی خاص خود جذب روده‌ای سریع و قابل توجهی دارند. مطالعات قبلی نشان داده است که این فلاونوئید موجب مهار متابولیسم اسید آراشیدونیک می‌گردد. همچنین وجود هیدروکسی در ساختار فلاونوئید باعث می‌شود که حلقه بتای فلاونوئید چرخش آزاد داشته باشد و به این طریق مهار آنزیم ۵ لیپواکسیژناز را تشدید می‌کند و التهاب را کاهش می‌دهد. مکانیسم احتمالی اثر فلاونوئیدها که توسط محققان گزارش شده شامل کاهش فعالیت آنزیم استیل کلسترول و آسیل ترانسفراز سلول‌های کبدی، کاهش فعالیت آنزیم هیدروکسی متیل گلوکاتینون کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-CoA)^۴ و افزایش تعداد رستورهای کبدی می‌باشد. داروهای سنتتیک موجود در درمان هیپرلیپیدمی با اثرات و عوارض جانبی همراه هستند. تاکنون عارضه جانبی خاصی از گیاه کرفس کوهی گزارش نگردیده است. در ضمن میوه‌ها و روغن فرار اعضای اصلی این خانواده در داروسازی استفاده‌های متعددی

³ Enzyme 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase

⁴ β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA

¹ Non-alcoholic fatty liver disease

² Body mass index

دارند (۱۵).

با توجه به آمار فزاینده مبتلا به کبد چرب و همچنین به علت عوارض جانبی کمتر گیاهان دارویی نسبت به داروهای صنعتی و شیمیایی در این مطالعه بر آن شدیم تا به بررسی اثر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن *PNPLA3* در موش‌های چاق مبتلا به کبد چرب بپردازیم.

روش تحقیق

نوع مطالعه و نمونه‌گیری

تحقیق حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.042 به تصویب رسیده است. مطالعه حاضر تجربی بود. لازم به ذکر است که روش جمع‌آوری اطلاعات آزمایشگاهی - مشاهده‌ای بوده و ۲۴ سر رت نر بالغ ویستار با میانگین وزنی ۱۳۰ تا ۲۰۰ گرم از لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد خریداری شد و در شرایط استاندارد ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با آب و غذای کافی و استاندارد درون قفس‌های مخصوص دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد نگهداری شدند. در تمام مراحل آزمایشگاهی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی لحاظ شد. رت‌ها پس از سازگاری با محیط به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در پژوهش حاضر برای ایجاد کبد چرب در ابتدا رت‌ها به مدت ۶ هفته با رژیم غذایی با چربی بالا که شامل ۵۸٪ چربی، ۲۵٪ پروتئین و ۱۷٪ کربوهیدرات در هر گرم چاق شدند. در ادامه ۳۶۵ گرم خوراک پودر شده را با ۱۰ گرم کلسترول و ۲۵۰ گرم کازئین و ۶۰ گرم ویتامین-مینرال مخلوط و ۰/۳ گرم متیونین، ۰/۱ گرم مخمر و ۰/۱ گرم سدیم کلرید اضافه گردید و با چربی آب شده مخلوط گردید. در نهایت به وسیله دستگاه پلت زن به صورت خوراک پلت و پرس شده در آورده شد و به مدت سه روز در جای خشک و خنک نگهداری شد و در نهایت آماده مصرف رت‌ها شد (۱۶).

همچنین طول مدت لازم برای القاء کبد چرب ۶ هفته بود و توسط تست‌های کبدی انجام شد (۱۷). گروه A شامل شش سر رت سالم که فقط روزانه آب و غذای استاندارد دریافت می‌کردند و گروه کنترل

را تشکیل می‌دادند. گروه B شامل شش سر رت مبتلا به کبد چرب است که به عنوان گروه کنترل منفی (گروه دریافت کننده رژیم غذایی پرچرب) می‌باشند. گروه C شامل شش سر رت مبتلا به کبد چرب می‌باشد که دریافت کننده دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره کرفس کوهی (کلوس) می‌باشند. گروه D شامل شش سر رت دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره کرفس کوهی (کلوس) می‌باشند (۱۸). پس از گروه‌بندی و پس از طی شدن دوره‌ی تطبیق حیوانات با حرارت و رطوبت محل نگهداری، آزمایشات شروع شد.

تهیه عصاره کرفس

در ابتدا گیاه کرفس از مناطق کوهستانی مورد نظر استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و با تأیید متخصصین گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد تأیید (با عدد هرباریومی ۱۹۴) شد. سپس در محلی که دور از نور و آفتاب و در دمای رطوبت مناسب به‌طوری‌که هوا در آن محل جریان داشته باشد نگهداری و خشک شد. سپس توسط آسیاب برقی به قطعات ۵/۰ تا ۳ سانتی متری پودر کرده و سپس ۵۰ گرم از این پودر را با الکل اتانول ۷۰ درصد صنعتی مخلوط کرده به‌اندازه‌ای که پودر کامل با الکل پوشیده شود و الکل تا روی گیاه بپاید و بعد از ۵ ساعت از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره‌ای که پس از عبور از کاغذ صافی به دست آمد با دستگاه Rotary که روی دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته و خود دستگاه شرایط ایده‌آل را ایجاد می‌کند، تغلیظ گردید. در نهایت مقدار انتخابی عصاره‌ها با حل کردن آن‌ها در یک حلال مناسب به دست آمد و به صورت گاوآژ به رت‌ها داده شد. پس از طی یک ماه از فرایند گاوآژ (که این فرایند هر ۳ روز یک‌بار انجام شد) و تیمار، رت‌ها در شرایط کاملاً بهداشتی با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند و با استفاده از ست جراحی شکم آن‌ها باز و کبد آن‌ها برداشته شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در تحقیق حاضر برای استخراج RNA تام از ترايزول (Invitrogen ساخت کشور امریکا) مطابق پروتکل استفاده شد و

پس از استخراج RNA استخراج شده از لحاظ کیفی و کمی بررسی شد. برای حذف آلودگی احتمالی RNA استخراج شده به DNA ژنومی، هر نمونه RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI (سیناژن ساخت کشور ایران) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد و به منظور خنثی‌سازی آنزیم DNaseI هر نمونه با ۱ میکرولیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) مرک ساخت کشور آلمان تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما

و پرایمر ۶ نوکلئوتیدی تصادفی، طبق پروتکل کیت، cDNA هر نمونه سنتز شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن توسط نرم‌افزار BeaconDesigner 8.0 و Oligo7 (۲۰، ۱۹) طراحی شد و پس از BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، توسط شرکت پیشگام سنتز شد که در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد نظر

طول قطعه	توالی پرایمر	نام ژن
۱۵۹ bp	5'-CAACATTAACAAGTGCCTCAGAG-3'	PNPLA3 F
	5'-GCATCCACCACTTCGTCTTTG-3'	PNPLA3 R
۲۰۰ bp	5'-TGATTCTACCCACGGCAAGTTC-3'	GAPDH F
	5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'	GAPDH R

تکنیک RT-PCR

در این بررسی برای تأیید صحت سنتز cDNA از تکنیک PCR استفاده شد و برای انجام تکنیک، ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix (یکتاتجهیز آزما)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۱ μL/Δpmol)، ۱ میکرولیتر نمونه cDNA (۲۵ ng/ μL)، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (با آب مقطر استریل) تهیه و مخلوط شد. در ادامه با برنامه دمایی: فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها در دمای مناسب (بهترین دما برای انجام PCR برای ژن GAPDH ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود) به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولیل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر انجام شد و در نهایت روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز انجام گردید. لازم به ذکر است که پس از نمونه برداری از کبد رت‌ها، لام پاتولوژی تهیه و نتایج پاتولوژی بررسی شد.

تکنیک Real time RT-PCR

در پژوهش حاضر از تکنیک Real Time -RT PCR (دستگاه Corbett rotor gene 6000) به منظور سنجش کمی سطح بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. برای انجام این تکنیک از SYBR Green (یکتاتجهیز آزما ساخت کشور ایران) استفاده شد و در نهایت پس از محاسبه $2^{-\Delta CT}$ نسبت بیان ژن هدف در نمونه مورد نظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شد.

تست‌های بیوشیمیایی

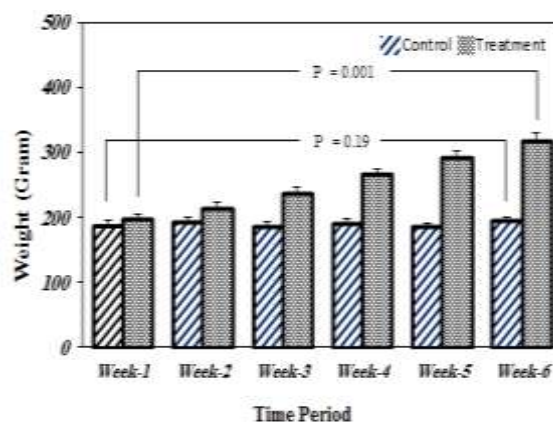
در این بررسی تست‌های بیوشیمیایی پس از پایان آخرین تزریق و گاوژ، موش‌ها بیهوش شدند و نمونه گیری خون به طور مستقیم از قلب رت‌ها انجام شد که شامل تست کلسترول، تری‌گلیسرید، قند، SGPT، HDL، LDL، SGPT و آلکالن فسفاتاز بود که این آزمایشات با روش اتوانالیزر و توسط دستگاه اتوانالیزر (Auto Analyser BT 3000plus، ساخت کشور ایتالیا) و با استفاده از کیت پارس آزمون انجام شد.

آنالیزهای آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از آنجا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون تعقیبی LSD ارزیابی شدند و نتایج بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه و تفاوت بین گروه‌های مختلف با $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در گروه کنترل به دلیل عدم استفاده از رژیم پرچرب تغییرات وزنی در طول دوره مورد بررسی ناچیز بوده ($P = 0.19$) درحالی که در موش‌های دارای رژیم غذایی پرچرب افزایش قابل توجهی در میانگین وزنی موش‌ها پس از ۶ هفته ایجاد شده است ($P = 0.001$). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از بررسی وزن موش‌ها در طول یک دوره ۶ هفته‌ای پیش از انجام آزمایشات می‌توان از افزایش وزن موش‌ها و ابتلای آن‌ها به چاقی اطمینان حاصل نمود.



نمودار ۱- بررسی تغییرات وزن موش‌های مورد مطالعه در یک دوره ۶ هفته‌ای

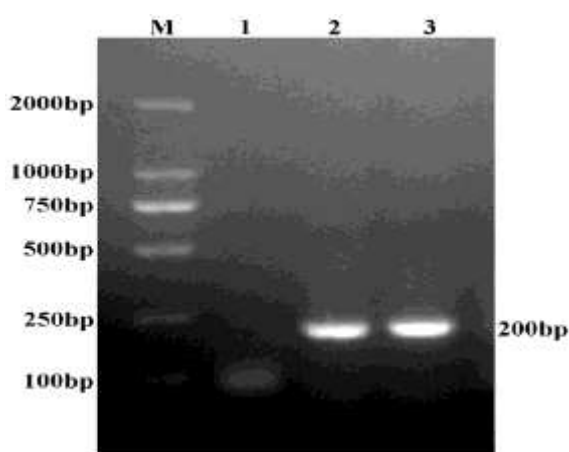
بررسی کمی و کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل

RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. باندهای ۱۸ S و ۲۸ S به طور واضح قابل تشخیص بود که نشان دهنده سالم بودن RNA است. همچنین مقدار ۱ میکرولیتر از هر نمونه RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ در طول

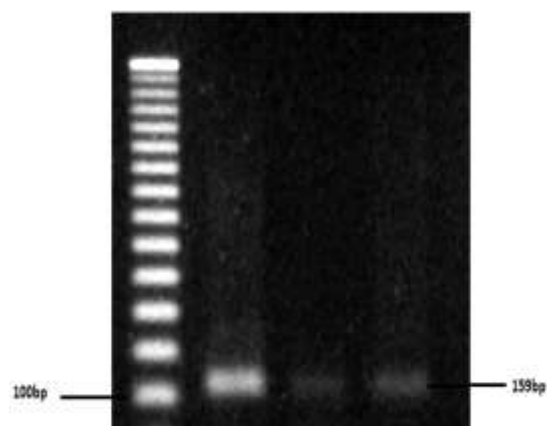
موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و در نسبت ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۵-۲ بود که عدم آلودگی‌های پروتئین و فنول را نشان داد.

یافته‌های ارزیابی بیان ژن به روش RT-PCR

برای سنتز صحیح cDNA از روش PCR معمولی استفاده شد. در این روش تمام نمونه‌ها برای GAPDH و ژن *PNPLA3* PCR شدند و محصولات روی ژل آگارز ۱٪ Run شدند. عکس ژل‌ها توسط دستگاه UV-Doc گرفته شد. بر اساس نتایج برای ژن *PNPLA3* باند ۱۵۹ bp و برای ژن GAPDH باند ۲۰۰ bp مشاهده شد که در تصویر ۱ و ۲ آورده شده است.



تصویر ۱- تأیید صحت سنتز cDNA. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ نمونه سالم، چاهک شماره ۳ نمونه رت‌های مبتلا به کبد چرب



تصویر ۲- تأیید صحت سنتز ژن *PNPLA3*. چاهک شماره ۱ مارکر، چاهک شماره ۲ نمونه سالم، چاهک شماره ۳ و ۴ نمونه رت‌های مبتلا به کبد چرب

یافته‌های حاصل از آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها در این تحقیق که با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام گرفته شد نشان داد که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. نتایج به دست آمده از این تحقیق تأثیر عصاره کرفس کوهی بر بیان ژن مورد مطالعه در بهبودی کبد چرب در

رت‌های مبتلا به کبد چرب را نشان داد. این عصاره با کاهش بیان ژن مورد نظر در کاهش چربی و درمان رت‌های مبتلا به کبد چرب کمک کرد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میزان تغییرات بیان ژن PNPLA3 در گروه چاق، عصاره کرفس ۴۰۰ و ۸۰۰ نسبت به گروه سالم

گروه	سالم	چاق	عصاره کرفس ۴۰۰	عصاره کرفس ۸۰۰
بیان ژن	$1/03 \pm 0/39^b$	$3/76 \pm 0/23^a$	$1/75 \pm 0/39^b$	$1/46 \pm 0/71^b$

a, b: میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت اختلاف آماری معنی‌دار دارند که a برابر با $P=0/01$ و b برابر با $P=0/001$ بود.

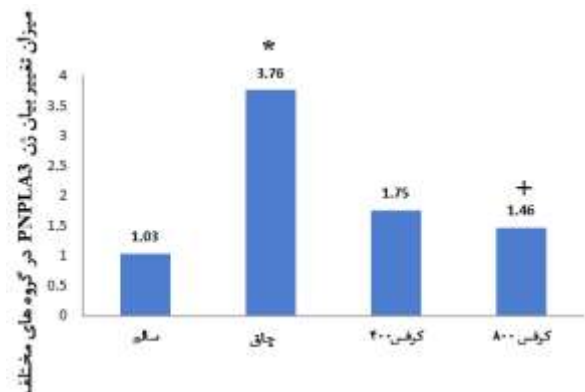
نتایج هیستوپاتولوژی

در تحقیق حاضر نتایج هیستوپاتولوژی کبد نشان داد که در موش‌های گروه با رژیم پرچرب، استئاتوز کبد با درجه ۴ حاصل شد، درحالی‌که در گروه با مصرف عصاره کرفس کوهی به ویژه در غلظت بالا با استئاتوز درجه ۱ از تغییر چربی هپاتوسیت‌ها جلوگیری به عمل آمده است که در جدول ۳ نشان داده شده است. همچنین عکس‌های بافت پاتولوژی آن در تصویر ۳ به صورت تصاویر الف، ب، ج و د نشان داده شده است.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

طبق نمودار ۳ مشاهده شد که میزان قند خون، تری گلیسرید، کلسترول، LDL در گروه رت مبتلا به کبد چرب درمان شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و گروه کنترل منفی و حتی گروه درمان شده با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم داشته است؛ ولی میزان HDL در گروه رت مبتلا به کبد چرب درمان شده با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها دارد ($P<0/05$). در این نمودار مشخص شد که در گروه مبتلا به کبد چرب (گروه کنترل منفی) میزان تست‌های مربوطه افزایش یافت و بعد از درمان با عصاره کرفس کوهی میزان تمام تست‌ها به غیر از HDL کاهش معنی‌داری داشته است. همچنین گروه شاهد که تحت هیچ رژیم پر چربی نبود میزان سالم بودن رت‌ها و عدم داشتن چربی را نشان داد.

گروه کبد چرب غیر الکلی به عنوان کنترل سایر گروه‌ها می‌باشد (سایر گروه‌ها نسبت به گروه بیمارستجیده می‌شود) و برحسب این گروه P سایر گروه‌ها به دست آورده شد. طبق تعریف اگر P کمتر از ۰/۰۵ باشد یعنی بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد؛ ولی اگر P بیشتر از ۰/۰۵ باشد یعنی اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد. میزان بیان این ژن به صورت ستونی در نمودار ۲ آورده شده است.

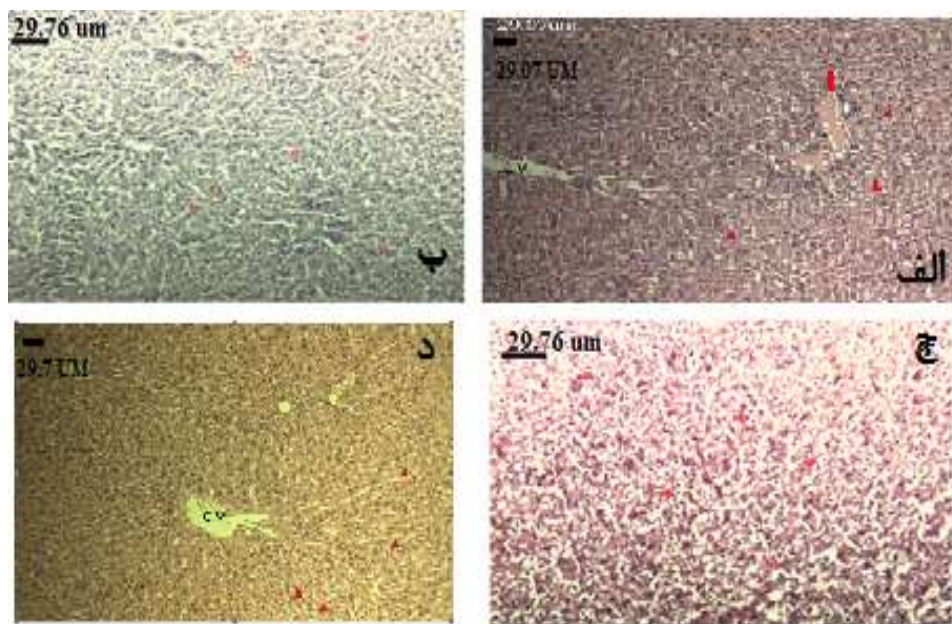


نمودار ۲- میزان تغییر بیان ژن. بیشترین میزان بیان مربوط به گروه

رت‌های مبتلا به کبد چرب می‌باشد (علامت * برابر با $P=0/01$). کمترین میزان بیان مربوط به گروه سالم می‌باشد. در رت‌های دریافت کننده دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره کرفس کوهی کاهش بیان دیده شده که این کاهش بیان نسبت به گروه چاق معنادار می‌باشد (علامت + نشانه کاهش بیشتر است).

جدول ۳- نتایج هیستوپاتولوژی

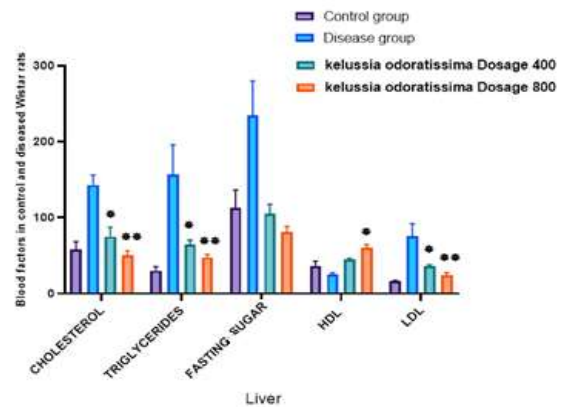
۱- تورم هپاتوسیت‌های کبد ۲- مشاهده فضا‌های روشن بصورت واکوئل‌های روشن داخل سیتوپلاسم در اطراف هسته ۳- کاهش فضای سینوزوئیدی بین سلول‌های هپاتوسیت کبد ۴- مشاهده بافت همبند همراه با سلول‌های التهابی تک هسته‌ای در ناحیه پورتال	کبد (گروه بیمار)
۱- هپاتوسیت‌های اطراف سترال وین (ورید مرکزی کبد) به دلیل تجمع وزیکول‌های چربی دچار تورم شده ۲- پرخونی ناحیه سینترال وین در ناحیه پورتال، هایپرپلازی مجاری صفراوی ۳- مشاهده بافت همبند در ناحیه پورتال تراکت ۴- تجمع کانونی سلول‌های آماسی در مناطق نکروز شده از پارانشیم کبد ۵- کاهش فضای سینوزوئیدی ۶- تغییر جهت هسته به حاشیه سیتوپلاسم ۷- کاهش فضای سینوزوئیدی ۸- اتساع ورید مرکزی کبد ۹- مشاهده واکوئل‌های شفاف کوچک و وزیکول‌های بزرگ داخل سیتوپلاسم هپاتوسیت‌های کبد	کبد (عصاره کرفس) ۸۰۰ mg/kg
۱- هپاتوسیت‌ها حاوی واکوئل‌های شفاف هستند ۲- کاهش رنگ پذیری هپاتوسیت‌های کبد (به دلیل حضور واکوئل‌های چربی) ۳- هسته در برخی از موارد به حاشیه سیتوپلاسم هدایت شده ۴- برهم خوردن ساختار لوبولی پارانشیم کبد ۵- تجمع چربی در داخل سیتوپلاسم سلول‌های کبد به صورت منتشر ۶- کاهش فضای سینوزوئیدی (فشرده شدن سینوزوئیدها)	کبد (عصاره کرفس) ۴۰۰ mg/kg



تصویر ۳- نتایج هیستوپاتولوژی. الف) کبد موش صحرایی، گروه کنترل، هپاتوسیت‌های نرمال (سر پیکان قرمز)، پر خونی عروق ناحیه پورتال، و سیاهرگ مرکزی کبد (H & E × ۱۰۰). ب) کبد موش صحرایی تیمار شده با دوز ۴۰۰، لیپیدوزیز یا استئاتوزیز در سیتوپلاسم سلول‌های کبد، هپاتوسیت‌های حاوی واکوئل‌های چربی (پیکان قرمز) و پرخونی وریدهای مرکزی کبد (ستاره قرمز). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E * 40). ج) کبد موش صحرایی بیمار درمان نشده، لیپیدوزیز یا استئاتوزیز منتشر در سیتوپلاسم سلول‌های کبد، هپاتوسیت‌های حاوی واکوئل‌های چربی (پیکان قرمز). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E × 100). د) کبد موش صحرایی تیمار شده با دوز ۸۰۰، لیپیدوزیز یا استئاتوزیز منتشر در سیتوپلاسم سلول‌های کبد، هپاتوسیت‌های حاوی واکوئل‌های چربی (پیکان قرمز). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. (H & E × 100)

کاهش آسیب‌های پارانشیمی کبد توسط عصاره گیاه کلوس، فعالیت سرمی آنزیم‌های کبدی نیز به تبع آن کاهش یافته است و عصاره هیدروالکلی گیاه کلوس احتمالاً می‌تواند کبد را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن محافظت نماید و این اثر حفاظتی کبدی در برطرف نمودن تغییرات ایجاد شده توسط آنزیم‌های سمیت زدا و آنتی‌اکسیدان و از بین بردن رادیکال‌های آزاد مؤثر است (۲۱). همچنین طی مطالعاتی دانشمندان دریافتند که عصاره کاسنی و اسانس کرفس بختیاری بر رفع مسمومیت ناشی از سموم ارگانوفسفره در موش صحرایی، به دلیل وجود ترکیبات فنلی در این گیاهان باعث بهبودی کبد به خصوص در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌شود (۲۲).

از سوی دیگر دانشمندان دریافتند که تنوع ژنتیکی در *PNPLA3* نسبت به بیماری کبد چرب غیر الکلی حساسیت نشان می‌دهد (۲۳). همچنین تنوع ژنتیکی در ژن *PNPLA3* با آسیب کبدی الکلی همراه است و جهش در ژن *PNPLA3* با محتوای چربی کبد در ارتباط است. از سوی دیگر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی *PNPLA3* rs738409 (M148I) با بیماری کبدی الکلی پیشرفته در افراد وابسته به الکل از نژاد Mestizo همراه است (۲۴). سطح بیان ژن *PNPLA3* مربوط به بیماری کبد چرب غیر الکلی در سلول‌های کبدی بسیار تحت تأثیر وضعیت چربی کبد است. مطالعات نشان داده است که تغییرات در *PNPLA3* با بیماری کبد چرب غیر الکلی (*NAFLD*) مرتبط است (۲۵). تحقیقات نشان داده است که ژن *PNPLA3* نقش مهمی در بیماری‌های کبدی دارد و می‌تواند باعث پیشرفت بیماری‌های کبدی شود (۲۶)؛ از سوی دیگر بررسی بیان ژن *PNPLA3* کبدی و شدت فیروز کبدی در بیماران مبتلا به NASH نشان داد که با جهش در ژن *PNPLA3* شدت فیروز کبدی و پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی افزایش می‌یابد (۲۷). داده‌های حاصل از بیان ژن *PNPLA3* نشان داد که عصاره کرفس کوهی با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش بیشتر بیان ژن *PNPLA3* در رت‌های مبتلا به کبد چرب شد. از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر در مقاطع هیستوپاتولوژی کبد که از



نمودار ۳- بررسی تست‌های بیوشیمیایی.

* و ** به ترتیب $P=0/01$ و $P=0/001$ می‌باشد.

بحث

امروزه رویکرد مردم نسبت به استفاده از گیاهان دارویی به علت عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی افزایش یافته است. از جمله گیاهان دارویی که در درمان کبد چرب مؤثر می‌باشند می‌توان به چای سبز، خار مریم، کرفس کوهی، زالزالک کوهی، دارچین، کاسنی و رزماری اشاره نمود (۲۲ و ۲۱). بنابراین در پژوهش حاضر به بررسی اثر عصاره کرفس کوهی (کلوس) بر بیان ژن *PNPLA3* در موش‌های مبتلا به کبد چرب پرداخته شد و نتایج حاکی از آن بود که عصاره کرفس کوهی می‌تواند بیان ژن *PNPLA3* را در موش‌های مبتلا به کبد چرب افزایش دهد. برای ارزیابی نتایج این پژوهش بررسی‌هایی انجام شده است که در ادامه به توضیح مهم‌ترین آن‌ها پرداخته شده است.

بررسی‌ها نشان داده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به میزان مواد فنلی موجود در آن‌ها مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها بستگی دارد که با افزایش این ترکیبات در گیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که گیاه کلوس به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، دارای خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد و اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد بنابراین منجر به غیر فعال ساختن رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط تتراکلرید کربن شده و از آسیب به غشای سلول‌ها و القای نکروز در کبد جلوگیری نموده است. با

رنگ آمیزی معمولی هماتوکسیلین ائوزین استفاده شد، نشان داد که در رت های گروه با رژیم پرچرب، استئاتوز کبد با درجه ۴ حاصل شد، درحالی که در گروه با مصرف عصاره کرفس کوهی به ویژه در غلظت بالا با استئاتوز درجه ۱ از تغییر چربی هپاتوسیت ها جلوگیری به عمل آمده است.

سرمی کلسترول و تری گلیسریدها شده و از کبد چرب جلوگیری می کند و کرفس کوهی در آینده می تواند راهی برای جلوگیری و پیشرفت کبد چرب باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد طرح ۹۷۰۱۷۵۳۳۳ و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می باشد و بدین وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در جمع آوری نمونه های خون در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدرانی را می نمایند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

نتیجه گیری

با توجه به تحقیق حاضر که بر روی بیان ژن *PNPLA3* با استفاده از عصاره کلوس انجام شد، نتایج نشان داد که استفاده از عصاره کلوس از طریق کاهش بیان در ژن *PNPLA3* باعث کاهش بیان ژن موثر در سنتز لیپیدها در کبد می گردد. همچنین نتایج تست های بیوشیمیایی و نتایج پاتولوژی بهبود کبد چرب را در رت های چاق تأیید می کند. می توان اظهار داشت عصاره کلوس به دلیل داشتن فلاونوئیدها مانند روتین و فتالید باعث کاهش سطح

منابع:

- 1- Vernon G, Baranova A, Younossi Z. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34(3): 274-85. DOI: [10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x)
- 2- Lamprecht A. Nanomedicines in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015; 12(4): 195-204. DOI: [10.1038/nrgastro.2015.37](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.37)
- 3- Fleischman MW, Budoff M, Zeb I, Li D, Foster T. NAFLD prevalence differs among hispanic subgroups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(17): 4987-93. DOI: [10.3748/wjg.v20.i17.4987](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i17.4987)
- 4- Eslam M, George J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020; 17(1): 40-52. DOI: [10.1038/s41575-019-0212-0](https://doi.org/10.1038/s41575-019-0212-0)
- 5- Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med.* 2019; 11(2): e9302. DOI: [10.15252/emmm.201809302](https://doi.org/10.15252/emmm.201809302)
- 6- Athyros VG, Alexandrides TK, Bilianou H, Cholongitas E, Doumas M, Ganotakis ES, et al. The use of statins alone, or in combination with pioglitazone and other drugs, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and related cardiovascular risk. An Expert Panel Statement. *Metabolism.* 2017; 71: 17-32. DOI: [10.1016/j.metabol.2017.02.014](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.02.014)
- 7- Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018; 24(7): 908-22. DOI: [10.1038/s41591-018-0104-9](https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9)
- 8- Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J Gastroenterol.* 2018; 53(3): 362-76. DOI: [10.1007/s00535-017-1415-1](https://doi.org/10.1007/s00535-017-1415-1)
- 9- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15(1): 11-20. DOI: [10.1038/nrgastro.2017.109](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109)

- 10- Lindén D, Ahnmark A, Pingitore P, Ciociola E, Ahlstedt I, Andréasson A-C, et al. Pnpla3 silencing with antisense oligonucleotides ameliorates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in Pnpla3 I148M knock-in mice. *Mol Metab.* 2019; 22: 49-61. DOI: [10.1016/j.molmet.2019.01.013](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.013)
- 11- Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, Meroni M, Lepore SM, Mancina RM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(23): 5212-22. DOI: [10.1093/hmg/ddw341](https://doi.org/10.1093/hmg/ddw341)
- 12- Yang J, Trépo E, Nahon P, Cao Q, Moreno C, Letouzé E, et al. PNPLA3 and TM6SF2 variants as risk factors of hepatocellular carcinoma across various etiologies and severity of underlying liver diseases. *Int J Cancer.* 2019; 144(3): 533-44. DOI: [10.1002/ijc.31910](https://doi.org/10.1002/ijc.31910)
- 13- Wang Y, Kory N, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and inhibition of hepatic triglyceride hydrolysis in mice. *Hepatology.* 2019; 69(6): 2427-41. DOI: [10.1002/hep.30583](https://doi.org/10.1002/hep.30583)
- 14- BasuRay S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019; 116(19): 9521-6. DOI: [10.1073/pnas.1901974116](https://doi.org/10.1073/pnas.1901974116)
- 15- Tabatabaeian J, Kadkhodaie A. The effect of dormancy breaking treatments on seed germination of *Kelussia odoratissima* Mozaff (kohrang). *Iran J Seed Science Technology.* 2019; 8(1): 201-12. [Persian] DOI: [10.22034/IJSST.2018.116895.1156](https://doi.org/10.22034/IJSST.2018.116895.1156)
- 16- Kurhe Y, Radhakrishnan M, Gupta D. Ondansetron attenuates depression co-morbid with obesity in obese mice subjected to chronic unpredictable mild stress; an approach using behavioral battery tests. *Metab Brain Dis.* 2014; 29(3): 701-10. DOI: [10.1007/s11011-014-9574-8](https://doi.org/10.1007/s11011-014-9574-8)
- 17- Zarghani SS, Soraya H, Zarei L, Alizadeh M. Comparison of three different diet-induced non alcoholic fatty liver disease protocols in rats: A pilot study. *Res Pharm Sci.* 2016; 22(1): 9-15. DOI: [10.15171/PS.2016.03](https://doi.org/10.15171/PS.2016.03)
- 18- Sazegar H, Balali E, Sadeghi Samani F. Effects of *Kelussia odoratissima* Mozaff Hydroalcoholic Extract on Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. *J Ilam Univ Med Sci.* 2019; 26(5): 30-41. DOI: [10.29252/sjimu.26.5.30](https://doi.org/10.29252/sjimu.26.5.30)
- 19- Rychlik W. PCR primer design. *Methods Mol Biol.* 2007; 402: 35-59. DOI: [10.1007/978-1-59745-528-2_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-528-2_2)
- 20- Rahimi Z, Salehi M, Dousti A. CCL2 Polymorphism in Drug-Resistant and Drug-Responsive Patients with Epilepsy in Isfahan, Iran. *Med Lab J.* 2017; 11(3): 30-4. DOI: [10.18869/acadpub.mlj.11.3.30](https://doi.org/10.18869/acadpub.mlj.11.3.30)
- 21- Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani H, Rezazadeh S, Jamshidi M, Mazandarani M, Khaki A. Study on phenolics and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran Province. *J Med Plants.* 2010; 9(34): 177-82. DOI: [20.1001.1.2717204.2010.9.34.19.7](https://doi.org/10.1001.1.2717204.2010.9.34.19.7)
- 22- Ghasemi Pirbalouti A, Shahvali A, Saghaee F, Azizi S, Hamed B, Shahgholian L. Effect of *Cichorium intybus* L. extracts and *Kelussia oderatissima* Mozaff. essential oil on toxic of organophosphorous insecticides in RAT. *Journal of Medicinal Herbs, "J. Med Herb"* (Formerly known as *Journal of Herbal Drugs* or *J. Herb Drug*), 2010; 1(2): 30-35. [Link](#)
- 23- Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008; 40(12): 1461-5. DOI: [10.1038/ng.257](https://doi.org/10.1038/ng.257)
- 24- Stickel F, Buch S, Lau K, zu Schwabedissen HM, Berg T, Ridinger M, et al. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology.* 2011; 53(1): 86-95. DOI: [10.1002/hep.24017](https://doi.org/10.1002/hep.24017)
- 25- Hoekstra M, Li Z, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ, Kuiper J. The expression level of non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly influenced by hepatic lipid status. *J Hepatol.* 2010; 52(2): 244-51. DOI: [10.1016/j.jhep.2009.11.004](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.004)
- 26- Bruschi FV, Tardelli M, Claudel T, Trauner M. PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepatic medicine: evidence and research.* 2017; 9: 55-66. DOI: [10.2147/HMER.S125718](https://doi.org/10.2147/HMER.S125718)
- 27- Bruschi FV, Tardelli M, Herac M, Claudel T, Trauner M. Metabolic regulation of hepatic PNPLA3 expression and severity of liver fibrosis in patients with NASH. *Liver Int.* 2020; 40(5): 1098-110. DOI: [10.1111/liv.14402](https://doi.org/10.1111/liv.14402)