

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.20

Адреса для листування: Тетяна Негрич,
ЛНМУ імені Данила Галицького, вул. Пе-
карська, 69, Львів, Україна, 79010

Е-пошта: tnehrych@gmail.com

Надійшла до редакції: 03.12.2024

Взята до друку: 15.12.2024

Опублікована: 27.12.2024

ORCID IDs

Майя Лафаренко:

<https://orcid.org/0009-0003-1705-4021>

Назар Негрич:

<https://orcid.org/0000-0003-0642-9038>

Лілія Фіщук:

<https://orcid.org/0000-0001-9999-7389>

Олена Попова:

<https://orcid.org/0000-0002-8298-858X>

Зоя Россоха:

<https://orcid.org/0000-0002-4767-7364>

Тетяна Негрич:

<https://orcid.org/0000-0003-0170-511X>

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Особистий внесок авторів:

Створення концепції: Зоя Россоха та Тетяна Негрич;

Результати дослідження: Майя Лафаренко, Назар Негрич та Олена Попова;

Написання: Лілія Фіщук, Зоя Россоха та Майя Лафаренко;

Редагування та затвердження остаточного варіанту: Майя Лафаренко, Зоя Россоха та Тетяна Негрич.

Дозвіл комісії з питань біоетики: дослідження отримало схвалення Комітету з етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол схвалення №12 від 20 листопада 2023 року).

Фінансування: автори не отримали жодної фінансової підтримки свого дослідження.



© Всі автори, 2024

Варіант 4A/B гена NOS3 як предиктор ризику розвитку та перебігу множинного склерозу

Майя Лафаренко¹, Назар Негрич², Лілія Фіщук³,
Олена Попова³, Зоя Россоха³, Тетяна Негрич²

¹ Львівська обласна клінічна лікарня, Львів, Україна

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

³ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л.Шупика, Київ, Україна

Вступ. Оксид азоту та варіанти гена ендотеліальної NO-синтази (NOS3) при множинному склерозі (МС) стали об'єктом активних наукових досліджень останніх років, оскільки ген конститутивно експресується у нейрональних та епітеліальних клітинах. А активність ферменту ендотеліальної NO-синтази (eNOS), що відіграє ключову роль у розвитку ендотеліальної дисфункції, регулюється варіантами гена NOS3, зокрема і варіантом 4a/b.

Мета. Дослідити вплив варіанта 4a/b гена NOS3 на ризик розвитку та перебіг захворювання у пацієнтів із множинним склерозом.

Матеріали і методи. До проведення дослідження залучили 113 хворих на МС. Генотипування за варіантом 4a/b гена NOS3 проводили із використанням методу полімеразної ланцюгової реакції.

Результати. Наші результати свідчать про те, що наявність генотипу 4bb асоційована зі зниженням ризику розвитку МС, натомість алель 4a гена NOS3 асоційований із підвищеним ризиком розвитку. Аналіз клінічних характеристик засвідчив, що пацієнти з генотипами 4ba та 4bb мали істотно

вищий індекс маси тіла ($p=0.007$) порівняно з генотипом 4aa. У пацієнтів з генотипом 4bb значно частіше виявляли тяжкий перебіг захворювання ($p=0.0489$). Методом бінарної логістичної регресії виявили ген-факторну взаємодію між варіантом 4a/b гена NOS3 та індексом маси тіла ($p=0.037$), що свідчить про поєднаний вплив цих чинників на перебіг МС.

Висновки. Отримані результати засвідчили важливу та багатофункціональну роль варіанту 4a/b гена NOS3 у розвитку та перебігу МС, що потребує подальших досліджень для кращого розуміння механізмів впливу цього генетичного чинника та його взаємодії з іншими факторами.

Ключові слова: множинний склероз, NOS3, варіант 4a/b, частота генотипів, індекс маси тіла, EDSS.

THE 4A/B POLYMORPHISM OF THE NOS3 GENE AS A PREDICTOR OF SUSCEPTIBILITY AND PROGRESSION OF MULTIPLE SCLEROSIS

Maya Lafarenko¹, Nazar Nehrych², Liliya Fishchuk³,
Olena Popova³, Zoya Rossokha³, Tetyana Nehrych²

¹ Lviv Regional Clinical Hospital, Lviv, Ukraine

² Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

³ Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Aim. Nitric oxide (NO) and the variants of the endothelial nitric oxide synthase gene (*NOS3*) in multiple sclerosis (MS) have become a focus of active scientific interest in recent years. The *NOS3* gene is constitutively expressed in neuronal and epithelial cells. Moreover, the endothelial NO synthase enzyme (eNOS) activity, which plays a pivotal role in developing endothelial dysfunction, is regulated by variants of the *NOS3* gene, including the 4a/b variant.

Objective. To evaluate the influence of the 4a/b variant of the *NOS3* gene on the susceptibility to and progression of multiple sclerosis.

Materials and Methods. The study included 113 patients diagnosed with MS. Genotyping for the 4a/b variant of the *NOS3* gene was performed using the polymerase chain reaction method.

Results. Our findings indicate that the presence of the 4bb genotype is associated with a reduced risk of developing MS, whereas the 4a allele of the *NOS3* gene is linked to an increased risk. Clinical characteristic analysis revealed that patients with the 4ba and 4bb genotypes exhibited a significantly higher body mass index (BMI) ($p=0.007$) than those with the 4aa genotype. Additionally, patients with the 4bb genotype were substantially more likely to experience a severe disease course ($p=0.0489$). Binary logistic regression analysis identified a gene-environment interaction between the *NOS3* 4a/b variant and BMI ($p=0.037$), suggesting a combined effect of these factors on MS progression.

Conclusions. The results underscore the significant and complex role of the *NOS3* 4a/b variant in the pathogenesis and progression of MS. Further investigation is warranted to deepen our understanding of the mechanisms underlying this genetic factor and its interplay with other contributing variables.

Keywords: multiple sclerosis, *NOS3*, 4a/b variant, genotype frequency, body mass index, EDSS.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2024.02.20

For correspondence: Tetyana Nehrych,
Danylo Halytsky Lviv National Medical
University, 69 Pekarska St., Lviv, Ukraine,
79010

E-mail: tnehrych@gmail.com

Received: 03, Dec, 2024

Accepted: 15, Dec 2024

Published: 27 Dec, 2024

ORCID IDs

Maya Lafarenko:

<https://orcid.org/0009-0003-1705-4021>

Nazar Nehrych:

<https://orcid.org/0000-0003-0642-9038>

Liliya Fishchuk:

<https://orcid.org/0000-0001-9999-7389>

Olena Popova:

<https://orcid.org/0000-0002-8298-858X>

Zoya Rossokha:

<https://orcid.org/0000-0002-4767-7364>

Tetyana Nehrych:

<https://orcid.org/0000-0003-0170-511X>

Disclosures: The authors declared no conflict of interest.

Author Contributions:

Conceptualization: Zoya Rossokha, Tetyana Nehrych;

Results of study: Maya Lafarenko, Nazar Nehrych, Olena Popova;

Writing: Liliya Fishchuk, Zoya Rossokha, Maya Lafarenko;

Review & editing: Maya Lafarenko, Zoya Rossokha, Tetyana Nehrych.

Ethical approval: The study was approved by the Ethics Committee for Scientific Research, Experimental Developments, and Scientific Works of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Protocol No. 12, dated November 20, 2023).

Funding: The authors received no financial support for their study.



© All authors, 2024

Вступ

Множинний склероз (МС) – це хронічне аутоімунне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), супроводжуване запаленням, демієлінізацією та нейродегенерацією, що поступово призводить до активації порушення функцій нервової системи та інвалідності. Важливо зазначити, що чисельність хворих на МС невідомо зростає у всьому світі. Згідно з оприлюдненими даними станом на 2013 рік кількість хворих на МС становила 2.3 мільйона осіб, у 2020 році цей показник збільшився до 2.8 мільйона, а у 2023 році було зареєстровано близько 2.9 мільйона людей, які хворіють на МС [1]. Згідно з останніми даними Atlas of MS в Україні натепер зафіксовано майже 21 тисяча випадків МС, а загальна захворюваність становить 48 хворих на 100 тисяч осіб [1]. Украй тривожним фактом є й те, що захворювання стало однією із найпоширеніших причин неврологічної інвалідності у людей молодого віку. Це зумовлює значні соціально-економічні наслідки, зокрема, через навантаження на систему охорони здоров'я та економіку країни.

Причини розвитку МС досі не повністю з'ясовані. Існує припущення, що це захворювання розвивається внаслідок поєднання генетичних і середовищних факторів, а також впливу певних вірусів, і все це запускає аутоімунний процес. В останні роки увага науковців зосереджена на вивченні ендотеліальної дисфункції при МС. Порушення функцій ендотелію зумовлює активацію імунної системи, посилення запальних процесів у ЦНС та

впливає на проникність гематоенцефалічного бар'єра [2–4]. Водночас ключовим фактором, що впливає на розвиток ендотеліальної дисфункції та появу прогресуючих неврологічних розладів є активність ферменту ендотеліальної NO-синтази (eNOS), яка регулюється варіантами гена *NOS3*. Одним із найбільш вивчених варіантів гена *NOS3* є 4a/b, що утворюється внаслідок тандемних повторів в інtronі 4 та впливає на рівень оксиду азоту (NO) – біологічно активного продукту ферментативної активності eNOS [5].

Метою нашої роботи було дослідити вплив варіанта 4a/b гена *NOS3* на ризик розвитку та перебіг захворювання у пацієнтів із множинним склерозом.

Матеріали та методи

До дослідження було залучено 113 хворих на МС, які проходили лікування та перебувають під наглядом у Львівському обласному центрі множинного склерозу.

Діагноз МС встановлювали згідно з критеріями МакДональда (у редакції 2017 року) [6]. Критерії залучення пацієнтів до дослідження були такими: установлений діагноз МС; тривалість МС не менше 6 місяців; надання добровільної інформованої згоди на участь у дослідженні. Критерії виключення містили: осіб віком до 18 і старших 60 років; тих, хто має супутні або гострі хронічні захворювання; вагітних жінок.

Загальна характеристика пацієнтів, які увійшли до групи дослідження, наведена в табл. 1.

Таблиця 1

Загальна клінічна характеристика обстежених хворих на множинний склероз

Показник		Загальна група (n=113)
Вік, років		40.1±11.6
Стать	жіноча	75 (66.4 %)
	чоловіча	38 (33.6 %)
ВМІ, кг/м ²		24.0±4.4
Кількість балів EDSS		3.5 [2.0; 4.5]
Вік дебюту, років		29.0 [23.0; 39.0]
Тривалість перебігу захворювання, років		8.0 [3.0; 13.0]
Сімейна обтяженість	так	23 (20.4 %)
	ні	90 (79.6 %)
Тип перебігу МС	ремітуючий-рецидивуючий	90 (79.6 %)
	вторинно прогресуючий	18 (15.9 %)
	первинно прогресуючий	5 (4.4 %)
ВМІ – індекс маси тіла		

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS) characterized by inflammation, demyelination, and neurodegeneration, which gradually lead to progressive neurological dysfunction and disability. Notably, the global prevalence of MS continues to rise. In 2013, an estimated 2.3 million individuals were diagnosed with MS; by 2020, this number had grown to 2.8 million, and by 2023, approximately 2.9 million people were living with the disease [1]. Recent data from the *Atlas of MS* report nearly 21,000 cases of MS in Ukraine, with a national prevalence rate of 48 per 100,000 population [1]. Particularly concerning is that MS is one of the most common causes of disability in young adults, resulting in profound socio-economic ramifications, including substantial strain on healthcare systems and national economies.

The exact causes of MS remain incompletely understood. Current evidence suggests that the disease arises from a multifactorial interplay of genetic susceptibility, environmental factors, and the impact of specific viral infections, collectively initiating autoimmune responses. Recent research has increasingly focused on the role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of MS. Endothelial dysfunction contributes to immune system activation, exacerbates inflammatory processes within the CNS, and compromises the integrity of the blood-brain barrier [2–4]. A pivotal factor in developing endothelial dysfunction and progressing neurological disorders is the

activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). This enzymatic activity is regulated by genetic variations in the *NOS3* gene. Among these, the 4a/b variant is one of the most extensively studied. This variant, resulting from tandem repeats in intron 4, significantly influences the production of nitric oxide (NO), a bioactive molecule generated through the enzymatic activity of eNOS [5].

The aim of our study was to investigate the influence of the *NOS3* 4a/b variant on the risk of development and the clinical progression of multiple sclerosis in patients.

Materials and Methods

The study involved 113 patients with MS who were receiving treatment and monitoring at the Lviv Regional Multiple Sclerosis Center.

The diagnosis of MS was established based on the 2017 revision of the McDonald criteria [6]. The inclusion criteria for the study were a confirmed diagnosis of MS, a disease duration of at least six months, and signed informed consent to participate. Exclusion criteria were individuals under 18 or over 60, those with comorbid acute or chronic conditions, and pregnant individuals.

The general characteristics of the patients included in the study are presented in Table 1.

All participants provided written informed consent to participate. The study was approved by the Ethics Committee for Scientific Re-

Table 1

General Clinical Characteristics of MS Patients

Indicator		General group (n=113)
Age, years		40.1±11.6
Gender	Female	75 (66.4%)
	Male	38 (33.6%)
BMI, kg/m ²		24.0±4.4
EDSS score		3.5 [2.0; 4.5]
Age of onset, years		29.0 [23.0; 39.0]
Disease duration, years		8.0 [3.0; 13.0]
Family history	Yes	23 (20.4%)
	No	90 (79.6%)
MS type	Relapsing-remitting	90 (79.6%)
	Secondary progressive	18 (15.9%)
	Primary progressive	5 (4.4%)
BMI – Body Mass Index		

Всі учасники дослідження надали письмову інформовану згоду на участь. Дослідження схвалене Комітетом з етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол схвалення №12 від 20 листопада 2023 року) та проведене відповідно до етичних принципів Гельсінської декларації.

Генотипів за варіантом 4a/b гена *NOS3* визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) відповідно до протоколів, опублікованих раніше та модифікованих до наших умов [7]. Для цього геномну ДНК виділяли зі зразків периферійної крові учасників дослідження з використанням набору Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) відповідно до інструкцій виробника. Для встановлення ПЛР використовували набір DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) та специфічні олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина). Продукти ампліфікації розділяли та візуалізували методом гель-електрофорезу в двохвідсотковому агарозному гелі (агароза компанії Cleaver Scientific, Великобританія) із додаванням бромистого етидію як барвника.

Статистичний аналіз виконували з використанням програми SPSS v.27. На нормальність розподілу дані перевіряли за критерієм Шапіро-Вілка. Категоріальні змінні наведені як абсолютні значення та частоти, а кількісні змінні – як середнє значення \pm стандартне відхилення (для даних з нормальним розподілом) або як медіана (Q1; Q3) – для даних, що не відповідають нормальному розподілу. Для порівняння між групами / підгрупами за категоріальними змінними використовували критерій χ^2 Пірсона (зокрема, з поправкою Йетса). Для оцінки впливу ефекту досліджуваних параметрів розраховували відношення шансів

(OR) із 95 % довірчим інтервалом. Порівняння кількісних змінних виконували з використанням однофакторного ANOVA (для даних із нормальним розподілом) або з використанням критерію Краскела-Уолліса (для даних, що не відповідають нормальному розподілу). Для визначення істотних факторів, що впливають на тяжкість перебігу МС, було виконано логістичну регресію. Відмінності вважали вірогідними для всіх типів аналізу на рівні $p < 0.05$.

Результати

Було визначено частоти генотипів за варіантом 4a/b гена *NOS3* у групі хворих на МС (табл. 2). Оскільки масштабних досліджень частот цього варіанту в українській популяції хворих на МС досі ніхто не проводив, як групу порівняння ми використали дані, опубліковані В. Цимбалюком зі співавт. [8]. Група порівняння загальною чисельністю 102 здорові особи утворена з 62 чоловіків та 40 жінок із середнім віком 54.5 ± 8.2 років, які живуть на території України та належать до кавказької етнічної групи.

Частоти генотипів за варіантом 4a/b гена *NOS3* у хворих на МС відповідали рівновазі Харді-Вайнберга ($p > 0.05$).

У пацієнтів із МС частота поширення генотипу 4bb була істотно меншою, ніж у групі порівняння ($\chi^2=9.06$, $p=0.003$, $OR=0.35$ (0.18-0.71)), що свідчить про його асоціацію зі зниженням ризику розвитку захворювання. І навпаки, частота алеля 4a була істотно вищою у групі хворих на МС проти групи порівняння ($\chi^2=10.60$, $p=0.001$, $OR=2.68$ (1.46-4.94)). Отже, наявність алеля 4a асоційована з підвищеним ризиком розвитку МС майже втричі.

Згідно з метою дослідження виконали аналіз впливу варіанта 4a/b гена *NOS3* на клінічні характеристики хворих на МС (табл. 3).

Таблиця 2

Порівняння частот генотипів / алелів за варіантом 4a/b гена *NOS3*

Ген	Генотип, алель	Хворі на МС (n=113)	Група порівняння [8] (n=102)	Статистичні показники
<i>NOS3</i> 4a/b	4bb	78 (69.0 %)	88 (86.3 %)	$\chi^2=9.06$, $p=0.003$, $OR=0.35$ (0.18-0.71)
	4ba	28 (24.8 %)	12 (11.8 %)	$\chi^2=6.00$, $p=0.014$, $OR=2.47$ (1.18-5.17)
	4aa	7 (6.2 %)	2 (1.9 %)	$\chi^2=1.46$, $p=0.23$, $OR=3.30$ (0.67-16.27)
	4a	184 (0.81)	188 (0.92)	$\chi^2=10.60$, $p=0.001$, $OR=2.68$ (1.46-4.94)
	4b	42 (0.19)	16 (0.08)	

search, Experimental Developments, and Academic Works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Protocol No. 12, issued on November 20, 2023). It was conducted in compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki.

Genotyping of the 4a/b variant of the *NOS3* gene was performed using the polymerase chain reaction (PCR) method, following previously published protocols adapted to our laboratory conditions [7]. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples of the study participants using the Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA) following the manufacturer's instructions. The PCR reaction was conducted using the DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) and specific oligonucleotide primers (Metabion, Germany). Amplification products were separated and visualized by gel electrophoresis on a 2% agarose gel (Cleaver Scientific, UK), with ethidium bromide used as the staining agent.

Statistical analysis was performed using SPSS software (version 27). The normality of data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk criterion. Categorical variables were presented as absolute values and frequencies, while continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation (for normally distributed data) or as median [Q1; Q3] (for non-normally distributed data). Group and subgroup comparisons for categorical variables were performed using Pearson's χ^2 test, including Yates' correction when required. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals were calculated to assess the effect size of the studied parameters. Continuous variables were compared using one-way ANOVA for normally distributed data and the Krus-

kal-Wallis criterion for non-normally distributed data. Logistic regression analysis was employed to identify significant factors contributing to the severity of MS. For all types of analysis, statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

The genotype frequencies of the 4a/b variant of the *NOS3* gene in the MS patient group were determined and are presented in Table 2. Since large-scale studies of this variant in the Ukrainian population have not been conducted, data published by Tsybaliuk et al. [8] were used as a comparison group. This comparison group comprised 102 healthy individuals, including 62 men and 40 women, with a mean age of 54.5 ± 8.2 . All participants resided in Ukraine and belonged to the Caucasian ethnic group.

The genotype frequencies of the 4a/b variant of the *NOS3* gene in the MS group conformed to Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$).

In patients with MS, the frequency of the 4bb genotype was significantly lower than in the comparison group ($\chi^2=9.06$, $p=0.003$, $OR=0.35$ [0.18–0.71]), suggesting its association with a reduced risk of developing the disease. Conversely, the frequency of the 4a allele was significantly higher in the MS group compared to the comparison group ($\chi^2=10.60$, $p=0.001$, $OR=2.68$ [1.46–4.94]), indicating that the presence of the 4a allele is associated with an approximately threefold increased risk of MS.

Aligned with the study objective, the influence of the *NOS3* 4a/b variant on the clinical characteristics of MS patients was examined (Table 3).

Table 2

The analysis of genotypes and alleles frequencies for *NOS3* gene (4a/b variants) in study groups

Gene	Genotypes/alleles	Patients with MS (n=113)	Comparison group [8] (n=102)	Statistical indicators
<i>NOS3</i> 4a/b	4bb	78 (69.0%)	88 (86.3%)	$\chi^2=9.06$, $p=0.003$, $OR=0.35$ [0.18–0.71]
	4ba	28 (24.8%)	12 (11.8%)	$\chi^2=6.00$, $p=0.014$, $OR=2.47$ [1.18–5.17]
	4aa	7 (6.2%)	2 (1.9%)	$\chi^2=1.46$, $p=0.23$, $OR=3.30$ [0.67–16.27]
	4a	184 (0.81)	188 (0.92)	$\chi^2=10.60$, $p=0.001$, $OR=2.68$ [1.46–4.94]
	4b	42 (0.19)	16 (0.08)	

За результатами цього дослідження виявлено, що індекс маси тіла (BMI) був істотно вищим у пацієнтів з генотипами 4ba та 4bb порівняно з генотипом 4aa. При цьому у пацієнтів з генотипами 4ba та 4aa простежували більш ранній вік дебюту захворювання, але ці дані вірогідно не відрізнялися від віку дебюту захворювання у пацієнтів з генотипом 4bb. Тривалість перебігу захворювання, тип його перебігу, ступінь неврологічних ушкоджень (оцінка за шкалою EDSS) також вірогідно не розрізнялась залежно від генотипу пацієнтів за дослідженим варіантом гена *NOS3*.

Водночас при поділі обстежених пацієнтів на дві підгрупи за тяжкістю захворювання згідно з балами шкали EDSS (<6 балів та ≥6 балів) ми виявили асоціацію генотипу 4bb з тяжким перебігом захворювання ($\chi^2=3.88$, $p=0.0489$, $OR=4.95$ (1.08-22.66)). У пацієнтів з тяжким перебігом генотип 4bb виявля-

но у 90 % хворих, генотип 4ba – у 10 % хворих, а генотип 4aa взагалі не було виявлено.

Оскільки при аналізі впливу варіанту 4a/b на клінічні характеристики у пацієнтів із МС виявили вірогідні асоціації генотипу 4bb з BMI пацієнтів та тяжкістю перебігу МС, методом бінарної логістичної регресії виконали оцінку ген-факторної взаємодії. При використанні цього методу застосували дихотомічні позначення для встановлених вірогідних показників та довели наявність ген-факторної взаємодії у тяжкості перебігу МС (табл. 4).

Отже, ми встановили роль варіанту 4a/b гена *NOS3* у розвитку та перебігу МС, а також ген-факторну взаємодію між генотипом 4bb та BMI у розвитку тяжкого перебігу МС.

Таблиця 3

**Вплив генотипів за варіантом 4a/b гена *NOS3*
на клінічні характеристики хворих на множинний склероз**

Показник	<i>NOS3</i> 4a/b			P	
	4bb	4ba	4aa		
BMI, кг/м ²	24.4±4.5	23.9±4.0	19.5±1.3	0.007*	
Стать	жінки	53 (70.7 %)	17 (22.7 %)	5 (6.7 %)	0.75
	чоловіки	25 (65.8 %)	11 (28.9 %)	2 (5.3 %)	
Вік дебюту МС, роки	29.0 [23.0; 41.3]	29.0 [19.0; 32.8]	30.0 [23.0; 32.0]	0.27	
Тривалість перебігу, роки	9.0 [3.0; 13.0]	7.5 [5.0; 13.8]	3.0 [2.0; 16.0]	0.80	
Тип перебігу МС	рем-рец	60 (66.7 %)	24 (26.7 %)	6 (6.7 %)	0.93
	вт-пр	14 (77.8 %)	3 (16.7 %)	1 (5.6 %)	
	п-пр	4 (80.0 %)	1 (20.0 %)	0 (0.0 %)	
Бали за шкалою EDSS	3.5 [2.0; 5.5]	3.5 [1.5; 4.0]	2.5 [1.5; 3.0]	0.09	
Тяжкість перебігу МС	легкий/або середньої важкості (EDSS<6)	60 (64.5 %)	26 (28.0 %)	7 (7.5 %)	0.0489*
	важкий (EDSS≥6)	18 (90.0 %)	2 (10.0 %)	0 (0.0 %)	
Сімейна обтяженість	так	16 (69.6 %)	6 (26.1 %)	1 (4.3 %)	1.00
	ні	62 (68.9 %)	22 (24.4 %)	6 (6.7 %)	

* – позначено вірогідні відмінності
BMI – індекс маси тіла

Таблиця 4

**Ген-факторна взаємодія варіанту гена *NOS3* та BMI
у розвитку тяжкого перебігу множинного склерозу**

Параметр	B	Середньоквадратична похибка	Вальд	Exp (B)	95 % довірчий інтервал для Exp(B)	
					нижня	верхня
<i>NOS3</i> 4a/b * BMI	-0.068	0.033	4.367	0.934	0.877	0.996
Константа	-1.188	0.267	19.828	0.305		

Our findings revealed that body mass index (BMI) was significantly higher in patients with the 4ba and 4bb genotypes compared to those with the 4aa genotype. Patients with the 4ba and 4aa genotypes also exhibited an earlier disease onset; however, these differences were not statistically significant compared to the age of onset in patients with the 4bb genotype. Additionally, the duration of the disease, its clinical course type, and the degree of neurological impairment (as assessed by the EDSS scale) showed no statistically significant differences across the genotypes of the *NOS3* gene variant studied.

By stratifying patients into two subgroups based on disease severity according to the EDSS score (<6 and ≥6 points), a significant association was observed between the 4bb genotype and severe disease progression ($\chi^2=3.88$, $p=0.0489$, $OR=4.95$ [1.08–22.66]). Among patients with severe disease course, 90% carried the 4bb genotype, 10% had the 4ba genotype, and the 4aa genotype was not detected in this subgroup.

Given the significant associations of the 4bb genotype with BMI and disease severity in MS patients identified in our analysis, we evaluated gene-factor interaction using binary logistic regression. This method applied dichotomous categorization for the significant variables observed, confirming the presence of a gene-factor interaction influencing MS severity (Table 4).

Thus, we have elucidated the role of the *NOS3* 4a/b variant in the mechanisms underlying the development and clinical progression of multiple sclerosis, as well as identified a gene-factor interaction between the 4bb genotype and BMI contributing to the advancement of severe MS.

Discussion

Extensive research underscores the potential involvement of NO in the pathogenesis of MS. NO, a product of eNOS activity, is a biologically active molecule with diverse physiological functions, including the regulation of vascular

Table 3

The Impact of *NOS3* 4a/b Genotypes on the Clinical Characteristics of MS Patients

Indicator	<i>NOS3</i> 4a/b Genotypes			P	
	4bb	4ba	4aa		
BMI, kg/m ²	24.4±4.5	23.9±4.0	19.5±1.3	0.007*	
Gender	Female	53 (70.7%)	17 (22.7%)	5 (6.7%)	0.75
	Male	25 (65.8%)	11 (28.9%)	2 (5.3%)	
Age of onset, years	29.0 [23.0; 41.3]	29.0 [19.0; 32.8]	30.0 [23.0; 32.0]	0.27	
Disease duration, years	9.0 [3.0; 13.0]	7.5 [5.0; 13.8]	3.0 [2.0; 16.0]	0.80	
MS type	Relapsing-remitting	60 (66.7%)	24 (26.7%)	6 (6.7%)	0.93
	Secondary progressive	14 (77.8%)	3 (16.7%)	1 (5.6%)	
	Primary progressive	4 (80.0%)	1 (20.0%)	0 (0.0%)	
EDSS score	3,5 [2.0; 5.5]	3,5 [1.5; 4.0]	2.5 [1.5; 3.0]	0.09	
Severity of MS	Mild/Moderate (EDSS < 6)	60 (64.5%)	26 (28.0%)	7 (7.5%)	0,0489*
	Severe (EDSS ≥ 6)	18 (90.0%)	2 (10.0%)	0 (0.0%)	
Family history	Yes	16 (69.6%)	6 (26.1%)	1 (4.3%)	1,00
	No	62 (68.9%)	22 (24.4%)	6 (6.7%)	

* – Statistically Significant Differences BMI – Body Mass Index

Table 4

Gene-Factor Interaction Between the *NOS3* Variant and BMI in the Development of Severe MS

Parameter	B	Standard Error	Wald	Exp (B)	95% Confidence Interval for Exp(B)	
					Lower	Upper
<i>NOS3</i> 4a/b * BMI	-0.068	0.033	4.367	0.934	0.877	0.996
Constant	-1.188	0.267	19.828	0.305		

Обговорення

Численні дослідження свідчать про потенційну роль NO в патогенезі МС. NO є одним із продуктів ферментативної активності eNOS. Ця біологічно активна молекула виконує важливі функції в організмі, зокрема бере участь у регуляції судинного тону, нейротрансмісії, метаболізму, імунних реакціях, а також у процесах запалення та окислювально-відновних реакціях [9]. Як молекула, яка здатна швидко дифундувати через клітинні мембрани, NO впливає на різноманітні клітинні процеси і може змінювати функцію клітин, що робить її ключовим компонентом у багатьох фізіологічних та патофізіологічних процесах [10]. Доведено, що у хворих на МС простежується підвищена концентрація продуктів NO (нітратів та нітритів) в спинномозковій рідині, крові та сечі. Опосередковані дані свідчать про те, що NO може відігравати важливу роль у розвитку таких ознак захворювання, як порушення гематоенцефалічного бар'єру, пошкодження та демієлінізація олігодендроцитів, дегенерація аксонів. З іншого боку, NO при МС має також корисні імуномодуючі ефекти, що свідчить про його складну роль в патогенезі захворювання [11]. Також очевидним є те, що безпосередньо сам фермент eNOS був високо експресований у внутрішньопаренхімальних судинних ендотеліальних клітинах пацієнтів з МС [12].

Незважаючи на наявні дані, роль варіантів гена *NOS3* у ризику розвитку МС залишається мало вивченою, а результати небагатьох досліджень є суперечливими. У цьому дослідженні ми зосередили увагу на вивченні ролі варіанта 4a/b гена *NOS3*. Згідно з наявними даними, цей генетичний маркер асоційований з широким спектром захворювань, зокрема, неврологічних – захворюваннями дрібних судин головного мозку; імунними захворюваннями – тиреоїдитом Хашимото, ревматоїдним артритом та системним червоним вовчаком [13–15].

Результати цього дослідження свідчать про те, що варіант 4a/b гена *NOS3* є визначальним чинником у ризику розвитку МС, зокрема, за наявності генотипу 4bb цей ризик знижується, а за наявності 4a алеля – підвищується. У дослідженні AlFadhli зі співавт. не було визначено суттєвої різниці у розпо-

ділі генотипів за варіантом 4a/b гена *NOS3* між пацієнтами з МС та здоровими особами [16]. Однак варто зазначити, що вони виявили асоціації гаплотипів за варіантами гена *NOS3*, що містять алелі за варіантом 4a/b зі схильністю до ризику розвитку МС.

У цьому дослідженні не було визначено істотного впливу варіанта 4a/b гена *NOS3* на такі клінічні характеристики пацієнтів з МС, як вік дебюту захворювання, тип перебігу МС та сімейна обтяженість. Натомість інша група вчених виявила, що алель 4a асоційований із раннім початком захворювання на МС – вони зафіксували вірогідне підвищення частоти алеля 4a у групі пацієнтів із дебютом захворювання до 26 років [16].

Ми визначили, що генотип 4bb асоційований із тяжким перебігом МС, але не знайшли в науковій літературі досліджень, схожих за дизайном, у яких вивчався досліджуваний нами варіант гена. Однак при дослідженні ролі іншого варіанту гена *NOS3* – rs2070744 – не було виявлено істотного впливу генетичного маркера на тяжкість МС, вік дебюту, клінічний підтип МС або генотип HLA-DRB1*1501 [17].

Оцінюючи ризик розвитку МС, ми визначили асоціацію генотипу 4bb за геном *NOS3* зі зниженням ризику розвитку МС. Але на противагу цьому встановили, що у пацієнтів з цим генотипом простежується тяжкий перебіг захворювання, збільшення BMI та адитивна взаємодія цих чинників тяжкого перебігу. Виявлені результати можуть мати кілька пояснень. Протективний ефект (або зниження ризику розвитку) зумовлюється фізіологічними рівнями NO у носіїв генотипу 4bb, які зменшують окислювальний стрес та сприяють нейропротекції, що може бути корисним для осіб групи ризику. Однак із розвитком та перебігом захворювання, що супроводжується, зокрема, запаленням і гіперактивацією імунної системи, може порушуватися функціонування eNOS, що нівелює протективну дію генотипу 4bb. Варто також зазначити, що у роботі Elizalde зі співавт. продемонстровано асоціацію між вищими рівнями eNOS та, відповідно, NO у осіб із ожирінням [18]. Не треба також забувати, що пацієнти з МС отримують глюкокортикоїдну терапію, яка зумовлює збільшення ваги

tone, neurotransmission, metabolism, immune responses, and roles in inflammation and redox reactions [9].

Due to its ability to diffuse rapidly across cellular membranes, NO affects many cellular processes, modulating cell functions and making it a critical mediator in numerous physiological and pathological conditions [10]. Elevated concentrations of NO derivatives (nitrates and nitrites) have been detected in the cerebrospinal fluid, blood, and urine of MS patients. Evidence suggests that NO may contribute to hallmark disease features such as blood-brain barrier disruption, oligodendrocyte damage and demyelination, and axonal degeneration.

However, NO also exerts immunomodulatory effects, which may provide protective benefits, highlighting its dual and complex role in MS pathogenesis [11]. Furthermore, studies have shown increased expression of eNOS in intraparenchymal vascular endothelial cells of MS patients, emphasizing its critical role in disease mechanisms [12].

Despite existing evidence, the role of *NOS3* gene variants in the risk of developing MS remains poorly understood, with the limited studies available yielding conflicting results. Our research focused specifically on the role of the 4a/b variant of the *NOS3* gene. According to existing data, this genetic marker is associated with a wide range of diseases, including neurological conditions such as cerebral small vessel disease and immune disorders such as Hashimoto's thyroiditis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus [13–15].

Our study demonstrates that the 4a/b variant of the *NOS3* gene is a critical factor influencing the risk of developing MS. Specifically, the 4bb genotype is associated with a decreased risk, whereas the presence of the 4a allele significantly increases susceptibility to the disease. In contrast, Alfadhli et al. reported no significant differences in the distribution of *NOS3* 4a/b genotypes between MS patients and healthy controls [16]. Nonetheless, their study highlighted associations between haplotypes involving alleles of the 4a/b variant and an increased predisposition to MS.

Our study found no significant association between the *NOS3* 4a/b variant and clinical characteristics such as age at disease onset, MS subtype, or family history of the disease. However, another research group identified an association between the 4a allele and early-onset MS. Their findings demonstrated a significantly higher frequency of the 4a allele in patients whose disease onset occurred before the age of 26 [16].

We found that the 4bb genotype is associated with severe progression of MS. To date, no studies with a similar design have explored the specific *NOS3* variant investigated in our research. However, a study of another *NOS3* variant, rs2070744, reported no significant influence of this genetic marker on MS severity, age of onset, clinical subtype, or the HLA-DRB1*1501 genotype [17].

In our assessment of MS risk, the *NOS3* 4bb genotype was found to be associated with a reduced risk of developing MS. However, paradoxically, among patients with this genotype, we observed severe disease progression, elevated BMI, and an additive interaction between these factors contributing to disease severity.

Several explanations could account for these findings. The protective effect (i.e., reduced risk of development) may be attributed to physiological NO levels in carriers of the 4bb genotype, which mitigate oxidative stress and promote neuroprotection. This effect could be particularly beneficial in at-risk populations. However, during disease progression, which involves inflammation and immune system hyperactivation, the function of eNOS may become impaired, negating the protective effects of the 4bb genotype.

Furthermore, Elizalde et al. demonstrated a correlation between higher levels of eNOS-derived NO and obesity, suggesting a potential link between metabolic dysregulation and elevated NO levels [18]. It is also important to consider that MS patients often receive glucocorticoid therapy, which contributes to weight gain and may simultaneously suppress eNOS expression, further complicating the interplay of these factors [19].

та одночасно може пригнічувати експресію eNOS [19].

На нашу думку, для більш повного розуміння генетичних механізмів, що лежать в основі виявлених ефектів, подальші дослідження цього типу доцільно проводити одночасно з дослідженнями загальногеномних асоціацій (GWAS). Тоді як GWAS допомагає визначити ширші паттерни генетичного ризику, розподіленого по всьому геному, цілеспрямоване дослідження конкретних варіантів генів, таких як *NOS3*, дає змогу отримати уявлення про функціональні шляхи та їхні клінічні наслідки. Крім того, результати численних GWAS підтверджують гіпотезу про те, що розвиток МС, імовірно, зумовлений не кількома мутаціями з великим ефектом, а численними варіантами з малим ефектом, які розподілені по всьому геному [20].

У висновках: виконане дослідження засвідчило значущість варіанта 4a/b гена *NOS3* у розвитку та перебігу МС, зокрема встановлено, що генотип 4bb знижує ризик розвитку МС, натомість алель 4a асоційований із підвищеним ризиком розвитку МС. При виконанні роботи не виявили впливу дослідженого варіанта гена на вік дебюту захворювання, тип перебігу чи ступінь неврологічних ушкоджень. Однак виявили асоціацію генотипу 4bb із тяжким перебігом МС та підвищенням ВМІ і взаємодію цих чинників у зростанні ризику тяжкого перебігу захворювання. Це свідчить про складність ролі гена *NOS3* в патогенезі МС, що потребує подальших досліджень для кращого розуміння механізмів впливу цього генетичного чинника та його взаємодії з іншими факторами.

Список літератури

1. Atlas of MS. November 18, 2024. <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>
2. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells – partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2022;22(9):576-588. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00694-4>
3. Yuan Y, Sun J, Dong Q, Cui M. Blood-brain barrier endothelial cells in neurodegenerative diseases: Signals from the “barrier”. *Front Neurosci.* 2023;17:1047778. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1047778>
4. Guo X, Zhao Z. Vascular inflammation in the central nervous system. *Neural Regen Res.* 2022;17(8):1728-1730. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332140>
5. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(1):190-193. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8267>
6. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
7. Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M, Mohebbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *Indian J Med Res.* 2006;124(6):683-688.
8. Tsybaliuk VI, Vasylieva IG, Kostyuk MR, et al. Analiz asotsiatsii polimorfizmiv heniv FGB ta eNOS3 iz ryzykom rozvytku intrakranialnoho hemorahichnoho ta aterotrombotychnoho ishemichnoho insultiv [An analysis of association FGB and eNOS3 genes polymorphisms with intracranial hemorrhagic and atherothrombotic ischemic]. *J NAMSU Ukr.* 2019;4:389-396. <https://doi.org/10.37621/JNAMSU-2019-4-389-396> (In Ukrainian).
9. Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell.* 2022;185(16):2853-2878. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>
10. Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(30):e2303259. <https://doi.org/10.1002/adv.202303259>
11. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002;1(4):232-41. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00102-3)
12. Broholm H, Andersen B, Wanscher B, et al. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2004;109(4):261-269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00207.x>
13. Hassan A, Gormley K, O’Sullivan M, et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke.* 2004;35(3):654-659. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000117238.75736.53>

In our opinion, to gain a more comprehensive understanding of the genetic mechanisms underlying identified effects, further studies must be conducted parallel to genome-wide association studies (GWAS). While GWAS helps identify broader patterns of genetic risk distributed across the genome, focused research on specific gene variants, like *NOS3*, provides insight into functional pathways and their clinical implications. Moreover, the results of numerous GWAS support the hypothesis that MS is not caused by a small number of mutations with significant effects but is likely caused by many small risk effects spread across the genome [20].

In conclusion, this study highlighted the significance of the *NOS3* 4a/b variant in the

mechanisms underlying the development and progression of MS. Specifically, the 4bb genotype was found to reduce the risk of developing MS. In contrast, the 4a allele was associated with an increased risk. No significant influence of the studied *NOS3* variant was observed on the age of disease onset, clinical subtype, or degree of neurological impairment. However, an association was identified between the 4bb genotype and severe disease progression, as well as an increase in BMI, with these factors interacting to heighten the risk of severe MS. These findings underscore the complex role of the *NOS3* gene in MS pathogenesis, warranting further research to understand better the mechanisms of this genetic factor and its interactions with other contributing variables.

References

1. Atlas of MS. November 18, 2024. <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>
2. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells – partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol.* 2022;22(9):576-588. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00694-4>
3. Yuan Y, Sun J, Dong Q, Cui M. Blood-brain barrier endothelial cells in neurodegenerative diseases: Signals from the “barrier”. *Front Neurosci.* 2023;17:1047778. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1047778>
4. Guo X, Zhao Z. Vascular inflammation in the central nervous system. *Neural Regen Res.* 2022;17(8):1728-1730. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332140>
5. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(1):190-193. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8267>
6. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
7. Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M, Mohebbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *Indian J Med Res.* 2006;124(6):683-688.
8. Tsymbaliuk VI, Vasyliieva IG, Kostyuk MR, et al. Analiz asotsiatsii polimorfizmiv henyiv FGB ta eNOS3 iz ryzykom rozvytku intrakranialnoho hemorahičnoho ta aterotrombotyčnoho ishemičnoho insultiv [An analysis of association FGB and eNOS3 genes polymorphisms with intracranial hemorrhagic and atherothrombotic ischemic]. *J NAMS Ukr.* 2019;4:389-396. <https://doi.org/10.37621/JNAMSU-2019-4-389-396> (In Ukrainian).
9. Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell.* 2022;185(16):2853-2878. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>
10. Andrabi SM, Sharma NS, Karan A, et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(30):e2303259. <https://doi.org/10.1002/adv.202303259>
11. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002;1(4):232-41. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(02)00102-3)
12. Broholm H, Andersen B, Wanscher B, et al. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2004;109(4):261-269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00207.x>
13. Hassan A, Gormley K, O’Sullivan M, et al. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke.* 2004;35(3):654-659. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000117238.75736.53>
14. AlFadhli S. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases. *Dis Markers.* 2013;34(5):349-356. <https://doi.org/10.3233/DMA-130983>

14. AlFadhli S. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene intron-4 27bp repeat polymorphism on its expression in autoimmune diseases. *Dis Markers*. 2013;34(5):349-356. <https://doi.org/10.3233/DMA-130983>
15. Katkam SK, Indumathi B, Tasneem FSD, Rajasekhar L, Kutala VK. Impact of eNOS 27-bp VNTR (4b/a) gene polymorphism with the risk of Systemic Lupus Erythematosus in south Indian subjects. *Gene*. 2018;658:105-112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.021>
16. AlFadhli S, Mohammed EM, Al Shubaili A. Association analysis of nitric oxide synthases: NOS1, NOS2A and NOS3 genes, with multiple sclerosis. *Ann Hum Biol*. 2013;40(4):368-375. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.786756>
17. Agúndez JAG, García-Martín E, Rodríguez C, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) rs2070744 polymorphism and risk for multiple sclerosis. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020;127(8):1167-1175. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02211-0>
18. Elizalde M, Rydén M, van Harmelen V, et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res*. 2000;41(8):1244-1251.
19. Liu Y, Mladinov D, Pietrusz JL, Usa K, Liang M. Glucocorticoid response elements and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res*. 2009;81(1):140-147. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn231>
20. Cotsapas C, Mitrovic M. Erratum: Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology*. 2018;7(8):e1038. <https://doi.org/10.1002/cti2.1038>. Erratum for: *Clin Transl Immunology*. 2018;7(6):e1018. <https://doi.org/10.1002/cti2.1018>.

15. Katkam SK, Indumathi B, Tasneem FSD, Rajasekhar L, Kutala VK. Impact of eNOS 27-bp VNTR (4b/a) gene polymorphism with the risk of Systemic Lupus Erythematosus in south Indian subjects. *Gene*. 2018;658:105-112. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.021>
16. AlFadhli S, Mohammed EM, Al Shubaili A. Association analysis of nitric oxide synthases: NOS1, NOS2A and NOS3 genes, with multiple sclerosis. *Ann Hum Biol*. 2013;40(4):368-375. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.786756>
17. Agúndez JAG, García-Martín E, Rodríguez C, et al. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) rs2070744 polymorphism and risk for multiple sclerosis. *J Neural Transm (Vienna)*. 2020;127(8):1167-1175. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02211-0>
18. Elizalde M, Rydén M, van Harmelen V, et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res*. 2000;41(8):1244-1251.
19. Liu Y, Mladinov D, Pietrusz JL, Usa K, Liang M. Glucocorticoid response elements and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res*. 2009;81(1):140-147. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn231>
20. Cotsapas C, Mitrovic M. Erratum: Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology*. 2018;7(8):e1038. <https://doi.org/10.1002/cti2.1038>. Erratum for: *Clin Transl Immunology*. 2018;7(6):e1018. <https://doi.org/10.1002/cti2.1018>.