

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2025.01.11

**Адреса для листування:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, 79010, Львів, Україна.

**E-mail:** tnehrych@gmail.com

**Надійшла до редакції:** 21.02.2025

**Прийнята до друку:** 08.04.2025

**Опублікована:** 20.06.2025

### ORCID IDs

Тетяна Негрич:

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

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>

Зоя Россоха:

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

Наталія Горovenко:

<https://orcid.org/0000-0003-4227-7166>

**Конфлікт інтересів:** автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Внески авторів

Розробка концепції: Зоя Россоха, Тетяна Негрич, Наталія Горovenко;

Збір та аналіз даних: Майя Лафаренко, Назар Негрич, Зоя Россоха;

Підготовка рукопису: Лілія Фіщук, Зоя Россоха, Майя Лафаренко;

Рецензування та остаточна версія рукопису: Майя Лафаренко, Зоя Россоха, Наталія Горovenко, Тетяна Негрич.

**Етичне схвалення:** дослідження було схвалене комісією з етики наукових досліджень, експериментальних розробок та наукових робіт ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол схвалення № 12 від 20.11. 2023).

**Фінансування:** Автори не отримували фінансової підтримки для проведення цього дослідження.



© Всі автори, 2025

## ВПЛИВ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *RFC* (rs 1051266) ТА ЇХ ПОЄДНАННЯ НА РИЗИК РОЗВИТКУ ТА ПЕРЕБІГ МНОЖИННОГО СКЛЕРОЗУ

Тетяна Негрич<sup>1</sup>, Майя Лафаренко<sup>1</sup>, Назар Негрич<sup>1</sup>, Зоя Россоха<sup>2</sup>, Лілія Фіщук<sup>2</sup>, Наталія Горovenко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

<sup>2</sup>Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна

Порушення у функціонуванні фолатного циклу можуть відігравати роль у патогенезі множинного склерозу (МС). Генетичні варіанти ферментів і транспортерів фолатного обміну, зокрема *MTHFR* (rs1801133, rs1801131) та *RFC* (rs1051266), можуть модулювати ризик розвитку МС і його клінічний перебіг.

**Мета дослідження** – визначити вплив варіантів генів *MTHFR* (rs1801133, rs1801131), *RFC* (rs1051266), а також їх поєднання на ризик розвитку, перебіг та можливість прогнозування неврологічних ушкоджень при МС із перспективою пошуку нових терапевтичних стратегій профілактики.

**Матеріали та методи.** Дослідили 113 хворих на МС та 70 осіб контрольної групи. Генотипування проводили методом полімеразно-ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів. Клінічна оцінка пацієнтів охоплювала визначення індексу інвалідазації EDSS.

**Результати.** Виявили, що наявність алеля 1298С за геном *MTHFR* (rs1801131) асоційована з підвищеним ризиком розвитку МС, тоді як алель 1298А має протективний ефект.

Також встановили, що алель 80А та генотип 80GA за *RFC* (rs1051266) підвищують ризик МС, а алель 80G та генотип 80GG чинять протективний вплив. У пацієнтів із генотипом 80GA показник EDSS був значуще найнижчим порівняно з пацієнтами з генотипами 80GG та 80AA. Виявили поєднаний вплив варіантів генів *MTHFR* та *RFC*, що він модифікує ризик МС і його клінічні прояви.

**Висновки.** Генетичні варіанти *MTHFR* (rs1801131) та *RFC* (rs1051266) впливають на ризик розвитку та перебіг МС. Поєднання генотипів 1298AC + 80GA асоційоване з підвищеним ризиком МС, тоді як 80GG у поєднанні з функціонально сприятливими варіантами *MTHFR* знижує цей ризик.

**Ключові слова:** множинний склероз, *MTHFR*, *RFC*, фолатний обмін, EDSS.

## THE IMPACT OF VARIANTS OF THE *MTHFR* (rs1801133, rs1801131) AND *RFC* (rs1051266) GENES AND THEIR COMBINATIONS ON THE RISK AND PROGRESSION OF MULTIPLE SCLEROSIS

Tetyana Nehrych<sup>1</sup>, Maya Lafarenko<sup>1</sup>, Nazar Nehrych<sup>1</sup>, Zoya Rossokha<sup>2</sup>, Liliya Fishchuk<sup>2</sup>, Nataliia Gorovenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup> P.L. Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Aim.** Impairments in folate cycle function may play a role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). Genetic variants of folate metabolism enzymes and transporters, particularly *MTHFR* (rs1801133, rs1801131) and *RFC* (rs1051266), may modulate the risk of MS development and its clinical course.

**Objective.** To determine the impact of variants of the *MTHFR* (rs1801133, rs1801131) and *RFC* (rs1051266) genes, as well as their combinations, on the risk, progression, and potential prediction of neurological damage in MS, with a view toward identifying new preventive therapeutic strategies.

**Materials and Methods.** The study included 113 MS patients and 70 healthy controls. Genotyping was performed using a polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism analysis. Clinical evaluation included assessment of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score.

**Results.** The 1298C allele of *MTHFR* (rs1801131) was associated with an increased risk of MS, while the 1298A allele had a protective effect. Additionally, the 80A allele and 80GA genotype of *RFC* (rs1051266) were linked to a higher risk of MS, whereas the 80G allele and 80GG genotype exhibited a protective effect. In patients with the 80GA genotype, the EDSS score was significantly lower compared to those with the 80GG and 80AA genotypes. A combined effect of variants of the *MTHFR* and *RFC* genes was identified, modifying the risk of MS and its clinical manifestations.

**Conclusions.** Genetic variants of *MTHFR* (rs1801131) and *RFC* (rs1051266) impact the risk of developing and the course of MS. The combination of genotypes 1298AC+80GA was associated with an increased risk of MS, whereas 80GG, in combination with functionally favorable *MTHFR* variants, reduced this risk.

**Keywords:** multiple sclerosis, *MTHFR*, *RFC*, folate metabolism, EDSS.

## OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2025.01.11

**For correspondence:** Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69 Pekarska Street, Lviv, Ukraine, 79010  
**E-mail:** [tnehrych@gmail.com](mailto:tnehrych@gmail.com)

**Received:** 21 Feb, 2025

**Accepted:** 08 Apr, 2025

**Published:** 20 Jun, 2025

### ORCID IDs

Tetyana Nehrych:

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

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>

Zoya Rossokha:

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

Nataliia Gorovenko:

<https://orcid.org/0000-0003-4227-7166>

**Conflict of Interest:** The authors declared no Conflict of Interest.

### Authors' Contributions:

Concept Development: Zoya Rossokha, Tetyana Nehrych and Nataliia Gorovenko; Data Acquisition and Analysis: Maya Lafarenko, Nazar Nehrych, and Zoya Rossokha; Manuscript Preparation: Liliya Fishchuk, Zoya Rossokha, and Maya Lafarenko; Review and Final Version of the Manuscript: Maya Lafarenko, Zoya Rossokha, Nataliia Gorovenko, and 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 this research.



© All authors, 2025

## Вступ

Множинний склероз (МС) – це хронічне аутоімунне захворювання центральної нервової системи (ЦНС), якому характерні: запалення, демієлінізація та нейродегенерація, тривалий перебіг з прогресивним неврологічним ушкодженням та інвалідизацією [1]. Патогенез цього захворювання складний та до кінця не вивчений. Одним із факторів, що може впливати на патогенез МС, є порушення в функціонуванні фолатного циклу – біохімічних процесах реметилування гомоцистеїну – непротеїногенної амінокислоти [2]. Зокрема, недавні дослідження пояснюють декілька можливих механізмів впливу порушень фолатного циклу на ризик розвитку МС: метилування ДНК, оксидативний стрес, синтез нейромедіаторів, регуляція імунної відповіді, участь в енергетичному метаболізмі [3-7]. Порушення функціонування фолатного циклу у хворих на МС можуть бути пов'язані з варіантами генів фолатного обміну. Починаючи з ключового гена MTHFR результати вивчення асоціацій генів фолатного циклу з розвитком та перебігом МС у різних популяційних вибірках засвідчили відмінності та розбіжності [8-12].

Ген MTHFR кодує метилентетрагідрофолатредуктазу, внутрішньоклітинний фермент, що відіграє ключову роль у метаболізмі фолієвої кислоти. Зокрема, він каталізує перетворення 5,10-метилентетрагідрофолату на 5-метилтетрагідрофолат – біологічно активну форму фолату, що також задіяний у процесах реметилування гомоцистеїну (ГЦ), синтезі ДНК і метилуванні ДНК.

Найбільш поширеними та вивченими варіантами гена MTHFR є rs1801133 (677C>T або Ala222Val) та rs1801131 (1298A>C або Glu429Ala) і їх наявність асоціюється зі зниженням активності метилентетрагідрофолатредуктази. Наслідком наявності низько-функціональних варіантів гена MTHFR є зниження функціональної активності ферменту, що кодується, та зростання рівня ГЦ, що чинить безпосередній руйнівний вплив на нервові клітини. Окрім того, опосередковано внаслідок зниженого реметилування не утворюються в достатній мірі такі сполуки, як метіонін та S-аденозилметіонін, необхідні для підтримання функціонування та відновлення мієліну [13].

Відомо, що рівні показників фолатного обміну (ГЦ, фолієва кислота, вітамін B12 і т. ін.) у нервовій системі суттєво відрізняються від тих, які виявляють у периферійній крові [14]. Варто зазначити, що на сьогодні рівень ГЦ у периферійній крові деякі дослідники розглядають як біомаркер МС [15], хоча найбільш важливим у цьому контексті, з нашої точки зору, є фокус на оптимальному забезпеченні фолатами мозку.

Транспорт фолатів у мозок здійснюється через гематоенцефалічний бар'єр з використанням трьох основних транспортних систем: рецептора фолату альфа (FR $\alpha$ ), протонно-зв'язаного транспортера фолатів (PCFT) та переносника відновлених фолатів (SLC19A1) [16]. SLC19A1 є одним із найбільш досліджених трансмембранних транспортних білків для транспортування 5-метилтетрагідрофолату в мозок.

Ген RFC кодує мембранний фосфатний антипортер SLC19A1, що транспортує фолати, структурно схожі антифолати та різні органічні фосфати, зокрема похідні тіаміну [17]. Нещодавно для SLC19A1 була визначена нова роль, як головного транспортера сигнальних молекул (циклічних динуклеотидів), що стимулюють широкий спектр реакцій імунної системи [18]. Найбільш поширеним і широко дослідженим варіантом гена RFC є rs1051266 (80G>A або Arg27His). Дослідники вважають, що цей варіант може знижувати афінність транспортера до субстрату [19], впливаючи на ефективність транспорту фолатів у мозок. Ми виявили, що 80G>A може впливати на рівні фолатів у центральній нервовій системі [20].

Оскільки транспортна система фолатів у мозок, опосередкована SLC19A1 є найбільш дослідженою та перспективною в контексті формування персоналізованого лікування фоліновою кислотою [21], необхідні дослідження генетичного ризику, опосередкованого цим геном, та його взаємодіями з іншими генами фолатного циклу.

Тому **мета цієї роботи** в контексті оцінки ризику, прогнозування перебігу та пошуку нової терапевтичної стратегії у профілактиці неврологічних ушкоджень при МС – визначення впливу варіантів генів MTHFR

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system, characterized by inflammation, demyelination, gliosis, and neurodegeneration, leading to progressive neurological damage and disability over time [1]. The pathogenesis of MS remains intricate and not fully elucidated. One potential factor influencing MS pathogenesis is the disruption of the folate cycle, specifically the biochemical processes involved in the remethylation of homocysteine (Hcy), a non-proteinogenic amino acid [2]. Recent studies highlight several possible mechanisms through which folate cycle disruptions may contribute to MS development, including DNA methylation, oxidative stress, neurotransmitter synthesis, immune response regulation, and involvement in energy metabolism [3–7]. Disruptions in the functioning of the folate cycle in patients with MS may be associated with variants of folate metabolism genes. Starting with the key MTHFR gene, studies on the association of folate cycle genes with the development and progression of MS in different population samples have demonstrated variations and inconsistencies [8–12].

The MTHFR gene encodes methylenetetrahydrofolate reductase, an intracellular enzyme that plays a key role in folic acid metabolism. Specifically, it catalyzes the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate—the biologically active form of folate, which, in turn, is involved in Hcy remethylation, DNA synthesis, and DNA methylation.

The most common and well-studied variants of the MTHFR gene are rs1801133 (677C>T or Ala222Val) and rs1801131 (1298A>C or Glu429Ala), the presence of which is associated with a reduced activity of methylenetetrahydrofolate reductase. The presence of low-functioning variants of the MTHFR gene results in reduced enzymatic activity and an increase in Hcy levels, which exerts a direct neurotoxic effect on nerve cells. Additionally, due to impaired remethylation, synthesizing essential compounds such as methionine and S-adenosylmethionine is insufficient, compromising the maintenance and repair of myelin [13].

It is established that the levels of folate metabolism markers (such as Hcy, folic acid, vitamin B12, etc.) in the central nervous system significantly differ from those found in peripheral blood [14]. Currently, peripheral blood Hcy levels are utilized as a biomarker for MS [15]. Nonetheless, from our perspective, the most critical focus should be ensuring optimal folate availability in the brain.

The transport of folates into the brain occurs through the blood-brain barrier via three main transport systems: folate receptor alpha (FR $\alpha$ ), proton-coupled folate transporter (PCFT), and reduced folate carrier (SLC19A1) [16]. Among these, SLC19A1 is one of the most extensively studied transmembrane transport proteins responsible for facilitating the passage of 5-methyltetrahydrofolate into the brain.

The RFC gene encodes a membrane-bound phosphate antiporter, SLC19A1, responsible for transporting folates, structurally similar antifolates, and various organic phosphates, including thiamine derivatives [17]. Recently, a novel function of SLC19A1 has been identified as a primary transporter of signaling molecules, specifically cyclic dinucleotides, which play a role in modulating a wide array of immune system responses [18]. The RFC gene's most common and widely studied variant is rs1051266 (80G>A or Arg27His). Researchers suppose that this variant may reduce the affinity of the transporter for the substrate [19], affecting the efficiency of folate transport to the brain. It has been shown that 80G>A may affect folate concentrations within the central nervous system [20].

Since the folate transport system to the brain mediated by SLC19A1 is the most studied and promising in the context of personalized folic acid treatment [21], further research is crucial to elucidate genetic risk factors associated with this gene and its interactions with other genes involved in the folate cycle.

Therefore, the aim of this study, in the context of assessing risk, predicting the course, and exploring new therapeutic strategies for the prevention of neurological damage in MS, was to determine the impact of variants of the MTHFR (rs1801133, rs1801131) and RFC

(rs1801133, rs1801131), RFC (rs 1051266) а також їх поєднання на ризик розвитку, перебіг та можливість прогнозування неврологічних ушкоджень при МС з перспективою пошуку нових терапевтичних стратегій профілактики.

### Матеріали та методи

До дослідження були залучені 113 хворих на МС, які проходили лікування та перебувають під наглядом у Львівському обласному центрі розсіяного склерозу при комунальному некомерційному підприємстві Львівської обласної ради «Львівська обласна клінічна лікарня». Діагноз МС встановлювали згідно з критеріями МакДональда у редакції 2017 року [22].

Критерії залучення пацієнтів до дослідження були такі: вік 18–60 років; наявність вірогідного МС згідно з критеріями МакДональда; тривалість МС не менш як шість місяців; надання добровільної письмової інформованої згоди на участь у дослідженні. Критерії вилучення пацієнтів: вік до 18-ти та після 60-ти років; наявність супутніх чи гострих хронічних захворювань; вагітність.

Серед хворих переважно більшість становили жінки – 75 (66.4%), чоловіків було 38 (33.6%). Середній вік пацієнтів становив  $40.1 \pm 11.6$  років, середній вік дебюту захворювання –  $31.1 \pm 10.7$  років, а середня тривалість захворювання –  $9.4 \pm 6.9$  років.

У 79.6% хворих був діагностований ремітуюче-рецидивний тип перебігу захворювання. Вторинно-прогресивний тип МС простежувався у 15.9% пацієнтів, а первинно-прогресуючий тип – у 4.4%.

Для більш точної оцінки клінічного стану захворювання застосовували розширену шкалу статусу інвалідизації (Expanded Disability Status Scale, EDSS). Медіана показника EDSS становила 3.5 [2.0; 4.5] балів, що свідчить про помірну інвалідизацію у більшості обстежених пацієнтів. До групи порівняння було зараховано 70 клінічно здорових осіб (35 чоловіків та 35 жінок) без неврологічних захворювань і неврологічних скарг в анамнезі.

Усі учасники надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Усі процедури, виконані пацієнтам під час дослідження,

відповідають етичним стандартам інституційного та національного комітетів з етики, а також Гельсінській декларації 1964 року та внесеним до неї поправкам або аналогічним етичним стандартам. Проведення дослідження схвалене комісією з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок та наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол схвалення№ 12 від 20 листопада 2023 р.).

Молекулярно-генетичним методом визначали варіанти генів фолатного обміну MTHFR (rs1801133, rs1801131) та RFC (rs1051266). Для цього зразки периферійної крові пацієнтів забирали та транспортували із використанням реагенту для стабілізації DNA/RNA Shield (Zymo Research, США) згідно з інструкцією. Геномну ДНК виділяли з біологічних зразків із використанням набору Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, США) відповідно до рекомендацій виробника. Генотипування за досліджуваними варіантами генів проводили з використанням методів полімеразно-ланцюгової реакції та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР-ПДРФ), а також алелів специфічної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) відповідно до протоколів, опублікованих раніше [23]. Для виконання ПЛР використовували набір DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) та специфічні олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина). Рестрикційний аналіз здійснювали з використанням ендонуклеаз рестрикції HinfI та HhaI (ThermoScientific, USA). Продукти рестрикційного аналізу розділяли за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі (агароза фірми «Cleaver Scientific», Великобританія) з додаванням бромистого етидію як барвника та візуалізували і зберігали за допомогою системи гель-електрофорезу.

Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS v.27. Категоріальні змінні наведені як абсолютні величини і частоти; кількісні змінні – або як середнє  $\pm$  стандартне відхилення для нормально розподілених даних, або як медіана [Q1, Q3] для ненормально розподілених даних. Для проведення порівняння між групами/підгрупами за категоріальними змінними вико-

(rs1051266) genes, as well as their combinations, on the risk, progression, and potential prediction of neurological damage in MS, with a view toward identifying new preventive therapeutic strategies.

### Materials and Methods

The study included 113 MS patients, all receiving treatment and being monitored at the Multiple Sclerosis Center of the Lviv Regional Clinical Hospital. The diagnosis of MS was established according to the McDonald criteria (2017 edition) [22].

Participants were included in the study if they satisfied the following criteria: aged between 18 and 60, diagnosed with MS in accordance with the McDonald criteria, with a disease duration of at least 6 months, and had provided written informed consent. Exclusion criteria comprised individuals under 18 or over 60 years of age, those with concurrent or acute chronic illnesses, and pregnant individuals.

Among the study cohort, females predominated, comprising 75 individuals (66.4%), while males constituted 38 individuals (33.6%). The mean age of participants was  $40.1 \pm 11.6$ . The mean age at disease onset was  $31.1 \pm 10.7$ , and the mean duration of the disease was  $9.4 \pm 6.9$ .

Relapsing-remitting MS was diagnosed in 79.6% of patients. Secondary progressive MS was observed in 15.9% of the cohort, and primary progressive MS was identified in 4.4% of the patients.

The Expanded Disability Status Scale (EDSS) was utilized to assess the clinical status of the disease accurately. The median EDSS score was 3.5 [2.0; 4.5], indicating a moderate level of disability in most of the patients evaluated. For comparison, a control group of 70 clinically healthy individuals, free from neurological disorders or complaints in their medical history, was also included.

All participants provided written informed consent prior to participation. The study adhered to ethical standards established by institutional and national ethics committees in compliance with the Declaration of Helsinki (1964) and its subsequent amendments or equivalent ethical guidelines. The research was approved by the

Ethics Committee for Scientific Research, Experimental Development, and Scholarly Works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Protocol No. 12, November 20, 2023).

Molecular-genetic techniques were utilized to identify variants in folate metabolism genes, specifically MTHFR (rs1801133, rs1801131) and RFC (rs1051266). Peripheral blood samples were collected from patients and stabilized using DNA/RNA Shield reagent (Zymo Research, USA) following the manufacturer's protocol. Genomic DNA was isolated from these samples using the Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA), adhering to the manufacturer's instructions. Genotyping of specific gene variants was performed employing Polymerase Chain Reaction (PCR) and allele-specific PCR methodologies, as described in established protocols [23]. PCR amplification was conducted with DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) and specific oligonucleotide primers (Metabion, Germany). Restriction fragment length polymorphism analysis was performed using restriction endonucleases (Thermo Scientific, USA). The resultant restriction fragments were resolved by electrophoresis on a 2% agarose gel (Agarose from Cleaver Scientific, UK) with ethidium bromide staining and visualized and documented using a gel electrophoresis system.

Statistical analyses were performed using SPSS v.27. Categorical variables were reported as absolute counts and frequencies, while continuous variables were summarized as either means  $\pm$  standard deviations for normally distributed data or medians [Q1, Q3] for non-normally distributed data. Comparisons between groups or subgroups for categorical variables were conducted using Pearson's chi-squared test, including Yates' correction where applicable. For continuous variables, the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test was employed. The association between genotypes or genotype combinations and risk was evaluated by calculating odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). Statistical significance was defined as a p-value of  $<0.05$  for all tests.

### Results

An analysis of the genotype frequency distribution for the studied MTHFR (rs1801133, rs1801131) and RFC (rs1051266) gene variants

ристовували критерій Пірсона  $\chi^2$  (зокрема і з поправкою Єйтса); за кількісними змінними – критерій Манна-Вітні або критерій Краскала-Волліса. Для оцінки ризику, асоційованого з генотипом/сполученням генотипів, розраховували відношення шансів (OR) у межах 95% довірчого інтервалу (CI). Відмінності вважали вірогідними для всіх типів аналізу на рівні  $p < 0.05$ .

### Результати

У процесі дослідження проведений аналіз розподілу частот генотипів за досліджуваними варіантами генів MTHFR (rs1801133, rs1801131) та RFC (rs10512660) у групі зі 113 хворих на МС та 70 осіб контрольної групи (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, для варіанта rs1801133 гена MTHFR ми не виявили істотних відмінностей.

Проте для іншого варіанту гена MTHFR rs1801131 відмінності були істотно значущими. Очевидно, що наявність алеля 1298C за варіантом rs1801131 гена MTHFR асоційована з підвищенням ризику розвитку МС більш як у 1.5 раза. На противагу цьому, за наявності алеля 1298A – ризик розвитку хвороби значно знижується.

У хворих на МС на відміну від групи контролю також встановили вірогідно вищі час-

тоти поширення генотипу 80GA та алеля 80A за варіантом rs1051266 гена RFC, тобто виявили асоціацію для варіантів цього гена із підвищенням ризику розвитку захворювання. Поширення генотипу 80GG та алеля 80G були істотно знижені у хворих на МС на відміну від групи контролю, що засвідчило протективний ефект, а саме – зниження ризику розвитку МС для носіїв цього алеля та генотипу.

Зважаючи на можливий поєднаний вплив варіантів генів фолатного обміну в процесі розвитку МС, нами було проаналізовано розподіл частот сполучень генотипів за досліджуваними варіантами генів у групі хворих на МС та в осіб групи порівняння. У процесі цього аналізу визначені істотні відмінності, наведені у таблиці 2.

Як видно із даних, наведених у таблиці 2, з підвищенням ризику розвитку МС у обстежених хворих виявлені асоційовані поєднання генотипів 1298AC+80GA за варіантами генів MTHFR (rs1801131) та RFC (rs1051266), за яких, як відомо, знижується функціональна активність генів та відповідні метаболічні перетворення. Причому, визначена величина OR за наявності цього поєднання досліджених варіантів генів більша ніж величина OR, визначена для окремих генотипів за цими варіантами генів.

Таблиця 1

### Результати аналізу розподілу частот генотипів за варіантами генів MTHFR та RFC у хворих на МС порівняно з контрольною групою

Ген, варіант	Генотип, алель	Частота генотипів, алелів, n (%)		$\chi^2$	p	OR (CI)
		хворі на МС (n=113)	група порівняння (n=70)			
MTHFR rs1801133	677CC	62 (54.9)	37 (52.9)	0.07	0.7909	1.08 (0.60-1.97)
	677CT	46 (40.7)	28 (40.0)	0.01	0.9244	1.09 (1.56-1.89)
	677TT	5 (4.4)	5 (7.1)	0.20	0.6515	0.60 (0.17-2.56)
	677C	170 (75.0)	102 (73.0)	0.25	0.6149	1.13 (0.70-1.83)
	677T	56 (25.0)	38 (27.0)			0.88 (0.55-1.43)
MTHFR rs1801131	1298AA	46 (40.7)	38 (54.3)	3.21	0.0732	0.58 (0.32-1.06)
	1298AC	55 (48.7)	29 (41.4)	0.91	0.3392	1.34 (0.73-2.45)
	1298CC	12 (10.6)	3 (4.3)	1.54	0.2147	2.65 (0.72-9.76)
	1298A	147 (65.0)	105 (75.0)	4.0	0.0456	0.62 (0.39-0.99)
	1298C	79 (35.0)	35 (25.0)			1.61 (1.01-2.58)
RFC rs1051266	80GG	32 (28.3)	34 (48.6)	7.96	0.0056	0.42 (0.22-0.78)
	80GA	56 (49.6)	23 (32.9)	4.91	0.0266	2.01 (1.08-3.73)
	80AA	25 (22.1)	13 (18.6)	0.33	0.5648	1.25 (0.59-5.63)
	80G	120 (53.0)	91 (65.0)	5.02	0.0251	0.61 (0.39-0.94)
	80A	106 (47.0)	49 (35.0)			1.64 (1.06-2.53)

was conducted in 113 patients with MS and 70 individuals in the control group (Table 1).

As seen in Table 1, no significant differences were found for the rs1801133 variant of the MTHFR gene.

In contrast, significant differences were identified for another variant of the MTHFR gene, rs1801131. It was determined that the presence of the 1298C allele in the rs1801131 variant of the MTHFR gene is associated with an over 1.5-fold increased risk of developing MS, whereas the presence of the 1298A allele significantly reduces the risk of the disease.

Among MS patients, compared to the control group, significantly higher frequencies of

the 80GA genotype and 80A allele were also observed for the rs1051266 variant of the RFC gene, indicating an association between these gene variants and an increased risk of developing the disease. Conversely, the distribution of the 80G allele was significantly lower among MS patients compared to the control group, suggesting a protective effect, specifically a reduced risk of developing MS for carriers of this allele.

Given the potential combined impact of folate metabolism gene variants in the development of MS, we analyzed the distribution of genotype combination frequencies for the studied gene variants in the group of MS patients and the comparison group. This analysis revealed significant differences, which are presented in Table 2.

Table 1

### Distribution of Genotype Frequencies for MTHFR and RFC Gene Variants in the Study and Control Groups

Gene, Variant	Genotype, Allele	Genotype Frequencies, Allele Frequencies, n (%)		χ <sup>2</sup>	p	OR (CI)
		Patients with MS (n=113)	Control group (n=70)			
<i>MTHFR</i> rs1801133	677CC	62 (54.9%)	37 (52.9%)	0.07	0.7909	1.08 (0.60–1.97)
	677CT	46 (40.7%)	28 (40.0%)	0.01	0.9244	1.09 (1.56–1.89)
	677TT	5 (4.4%)	5 (7.1%)	0.20	0.6515	0.60 (0.17–2.56)
	677C	170 (75.0%)	102 (73.0%)	0.25	0.6149	1.13 (0.70–1.83)
	677T	56 (25.0%)	38 (27.0%)			0.88 (0.55–1.43)
<i>MTHFR</i> rs1801131	1298AA	46 (40.7%)	38 (54.3%)	3.21	0.0732	0.58 (0.32–1.06)
	1298AC	55 (48.7%)	29 (41.4%)	0.91	0.3392	1.34 (0.73–2.45)
	1298CC	12 (10.6%)	3 (4.3%)	1.54	0.2147	2.65 (0.72–9.76)
	1298A	147 (65.0%)	105 (75.0%)	4.0	0.0456	0.62 (0.39–0.99)
	1298C	79 (35.0%)	35 (25.0%)			1.61 (1.01–2.58)
<i>RFC</i> rs1051266	80GG	32 (28.3%)	34 (48.6%)	7.96	0.0056	0.42 (0.22–0.78)
	80GA	56 (49.6%)	23 (32.9%)	4.91	0.0266	2.01 (1.08–3.73)
	80AA	25 (22.1%)	13 (18.6%)	0.33	0.5648	1.25 (0.59–5.63)
	80G	120 (53.0%)	91 (65.0%)	5.02	0.0251	0.61 (0.39–0.94)
	80A	106 (47.0%)	49 (35.0%)			1.64 (1.06–2.53)

Table 2

### Analysis of Genotype Combinations for MTHFR and RFC Genes in Comparative Groups

Gene Variants	Genotype Combinations	Patients with MS (n=113)		Control group (n=70)		χ <sup>2</sup>	p	OR	95% CI
		n	%	n	%				
<i>MTHFR</i> rs1801133 + <i>RFC</i> rs1051266	677CC+ 80GG	19	16.8	21	30	4.40	0.0359	0.47	0.23–0.96
<i>MTHFR</i> rs1801131+ <i>RFC</i> rs1051266	1298AA+ 80GG	14	12.4	17	24.28	4.35	0.0371	0.44	0.20–0.96
<i>MTHFR</i> rs1801131+ <i>RFC</i> rs1051266	1298AC+ 80GG	12	10.6	16	22.85	5.00	0.0254	0.40	0.18–0.91
<i>MTHFR</i> rs1801131+ <i>RFC</i> rs1051266	1298AC+ 80GA	32	28.3	7	10	8.65	0.0033	3.56	1.47–8.59

Таблиця 2

**Аналіз поширення частот поєднання генотипів за генами MTHFR та RFC у хворих на МС порівняно з контрольною групою**

Варіанти генів	Сполучення генотипів	Хворі на МС (n=113)		Група порівняння (n=70)		$\chi^2$	p	OR	95% CI
		n	%	n	%				
MTHFR rs1801133 + RFC rs1051266	677CC+80GG	19	16.8	21	30	4.40	0.0359	0.47	0.23-0.96
MTHFR rs1801131+ RFC rs1051266	1298AA+80GG	14	12.4	17	24.28	4.35	0.0371	0.44	0.20-0.96
MTHFR rs1801131+ RFC rs1051266	1298AC+80GG	12	10.6	16	22.85	5.00	0.0254	0.40	0.18-0.91
MTHFR rs1801131+ RFC rs1051266	1298AC+80GA	32	28.3	7	10	8.65	0.0033	3.56	1.47-8.59

Інші виявлені істотні поєднання варіантів генів мали протекційний ефект – знижували ризик розвитку МС. Це були поєднання варіантів генів фолатного обміну зі звичайною функціональною активністю 677CC+80GG, 1298AA+80GG, та помірно зниженою 1298AC+80GG (завдяки варіанту гена MTHFR). Отже, при аналізі впливу поєднань варіантів досліджуваних генів на ризик розвитку МС ми встановили, що всі протекційні комбінації містили генотип 80GG за геном RFC.

На наступному етапі (табл. 3) був проаналізований вплив варіантів генів MTHFR та RFC на такі клінічні параметри хворих на МС, як тип перебігу МС, кількість балів за шкалою EDSS та вік дебюту захворювання.

При проведенні порівняльного аналізу поширеності частот генотипів у підгрупах хворих на МС з різними типами перебігу захворювання – ремітуюче-рецидивним (РР), вторинно-прогресивним (ВП) та первинно-прогресивним (ПП) – вірогідних відмінностей у поширенні генотипів між

підгрупами не виявили. Також не було встановлено значущих асоціацій між варіантами досліджуваних генів і віком дебюту захворювання, хоча простежувалися тенденції, а саме – наймолодший вік дебюту захворювання ( $24.6 \pm 7.2$ ) був виявлений для хворих із генотипом 677TT за геном MTHFR.

Найменша кількість балів EDSS була ідентифікована у пацієнтів з генотипом 80GA, порівняно з пацієнтами з генотипом 80AA за варіантом rs1051266 гена RFC ( $p=0.001$ ).

Подальший аналіз засвідчив, що у пацієнтів із генотипом 80GA простежувалася менша тривалість перебігу хвороби порівняно з пацієнтами з генотипами 80AA та 80GG, але ця різниця не була істотно вірогідною ( $p=0.43$ , рис. 1).

Отже, у групі обстежених пацієнтів не було виявлено асоціацій між віком на момент дебюту захворювання, тривалістю його перебігу та дослідженими генотипами. Було визначено тільки асоціацію генотипу 80GA за геном RFC зі зниженням середнього показника EDSS

Таблиця 3

**Аналіз впливу досліджуваних варіантів генів на клінічні параметри хворих на МС**

Клінічні параметри 677CC		MTHFR rs1801133			MTHFR rs1801131			RFC rs1051266		
		677CT	677TT	1298AA	1298AC	1298CC	80GG	80GA	80AA	
Тип перебігу МС, n (%)	РР	49 (54.4)	39 (43.3)	2 (2.2)	35 (38.9)	46 (51.1)	9 (10.0)	32 (28.3)	56 (49.6)	25 (22.1)
	ВП	11 (61.1)	5 (27.8)	2 (11.1)	8 (44.4)	8 (44.4)	2 (11.1)	5 (27.8)	6 (33.3)	7 (38.9)
	ПП	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)
Середній показник EDSS, бали		3,0 [2.0; 5.1]	3.3 [1.5; 4.5]	3.5 [2.8; 4.0]	3.5 [2.0; 4.1]	3.0 [1.5; 4.0]	4.8 [2.3; 6.0]	4.0 [2.1; 5.9]	2.0 [1.5; 3.5]	4.0 [2.5; 6.0]
Середній вік дебюту МС, роки		31.6±9.6	31.1±12.4	24.6±7.2	30.3±10.8	31.2±10.9	34.0±10.0	31.3±10.0	30.6±11.8	32.2±9.0

РР – ремітуюче-рецидивний; ВП – вторинно-прогресивний; ПП – первинно-прогресивний

Table 2 shows that genotype combinations 1298AC+80GA for the MTHFR (rs1801131) and RFC (rs1051266) gene variants are associated with an increased risk of MS developing in the examined patients. These combinations are known to reduce the functional activity of genes and their corresponding metabolic processes. Moreover, the determined OR for this combination of gene variants was higher than the OR calculated for individual genotypes of these variants.

Other significant genotype combinations had a protective effect, reducing the risk of developing MS. These included combinations of folate metabolism gene variants with normal functional activity, such as 677CC+80GG, 1298AA+80GG, and moderately reduced activity, such as 1298AC+80GG (due to the MTHFR gene variant). Thus, in the analysis of the impact of genotype combinations of the studied genes on the risk of developing MS, it was found that all protective combinations included the 80GG genotype of the RFC gene.

At the next stage (Table 3), we analyzed the impact of MTHFR and RFC gene variants on the parameters of MS patients, such as the type of MS progression, EDSS score, and age at disease onset.

In a comparative analysis of genotype frequency distribution among MS patient

subgroups with different disease types—relapsing-remitting, secondary-progressive, and primary-progressive—no significant differences in genotype distribution were identified between the subgroups. Additionally, no significant associations were found between the studied gene variants and the age of disease onset. However, certain trends were observed. Notably, the youngest age of disease onset ( $24.6 \pm 7.2$  years) was found in patients with the 677TT genotype of the MTHFR gene.

The lowest EDSS score was identified in patients with the 80GA genotype compared to those with the 80AA genotype of the RFC gene rs1051266 ( $p=0.001$ ).

Further analysis revealed that patients with the 80GA genotype had a shorter disease duration compared to those with the 80AA and 80GG genotypes; however, this difference was not statistically significant ( $p=0.43$ ) (Figure 1).

Thus, no associations were found between the age of disease onset, disease duration, and the studied genotypes in the examined patient group. However, an association was identified between the 80GA genotype of the RFC gene and a lower average EDSS score ( $2.0 [1.5; 3.5]$ ), indicating less severe neurological damage and moderate disability in patients with this genotype.

Table 3

**Analysis of the Influence of Investigated Gene Variants on Clinical Parameters in Patients with Multiple Sclerosis**

Clinical Parameters 677CC		MTHFR rs1801133			MTHFR rs1801131			RFC rs1051266		
		677CT	677TT	1298AA	1298AC	1298CC	80GG	80GA	80AA	25
Type of MS Course	RR	49 (54.4%)	39 (43.3%)	2 (2.2%)	35 (38.9%)	46 (51.1%)	9 (10.0%)	32 (28.3%)	56 (49.6%)	25 (22.1%)
	SP	11 (61.1%)	5 (27.8%)	2 (11.1%)	8 (44.4%)	8 (44.4%)	2 (11.1%)	5 (27.8%)	6 (33.3%)	7 (38.9%)
	PP	2 (40.0%)	2 (40.0%)	1 (20.0%)	3 (60.0%)	1 (20.0%)	1 (20.0%)	2 (40.0%)	2 (40.0%)	1 (20.0%)
Mean EDSS Score, Points		3.0 [2.0; 5.1]	3.3 [1.5; 4.5]	3.5 [2.8; 4.0]	3.5 [2.0; 4.1]	3.0 [1.5; 4.0]	4.8 [2.3; 6.0]	4.0 [2.1; 5.9]	2.0 [1.5; 3.5]	4.0 [2.5; 6.0]
Mean Age of MS Onset, Years		31.6± 9.6	31.1± 12.4	24.6± 7.2	30.3± 10.8	31.2± 10.9	34.0± 10.0	31.3± 10.0	30.6± 11.8	32.2± 9.0

RR—Relapsing-remitting multiple sclerosis; SP—Secondary progressive multiple sclerosis; PP—Primary progressive multiple sclerosis

(2.0 [1.5; 3.5]), що свідчить про менш означені неврологічні симптоми та помірну інвалідизацію у пацієнтів із цим генотипом.

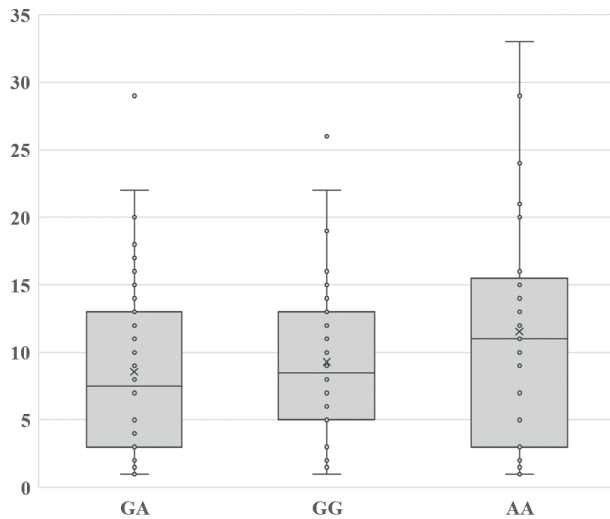


Рисунок 1. Тривалість перебігу захворювання у хворих на МС із різними генотипами за варіантом rs1051266 гена RFC

Зважаючи на визначену нами асоціацію генотипу 80GA за геном RFC у хворих на МС із найменшою кількістю балів за шкалою EDSS (що свідчить про легший перебіг хвороби при цьому генотипі), ми проаналізували середній показник EDSS при різних варіантах генів MTHFR та RFC з урахуванням тривалості перебігу хвороби, розподіливши хворих на три підгрупи: з тривалістю перебігу до 5 років, 5-10 років і понад 10 років (табл. 4, рис. 2).

Згідно з даними, наведеними у таблиці 4, показник EDSS був найменший у хворих на

МС із генотипом 80GA на відміну від генотипів 80GG та 80AA у загальній групі хворих, та у всіх трьох підгрупах залежно від тривалості перебігу.

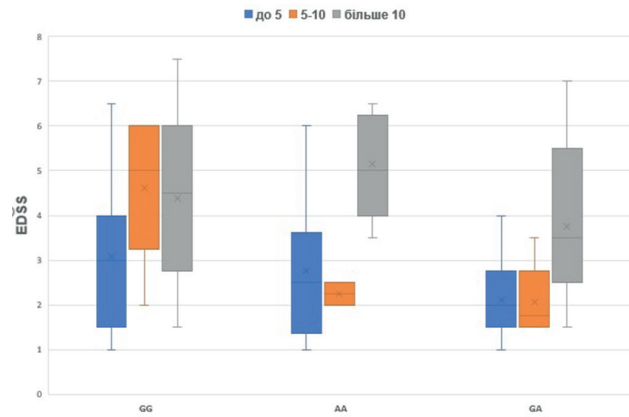


Рисунок 2. Розподіл показників шкали інвалідизації EDSS у хворих на МС залежно від тривалості хвороби та варіантів за геном RFC. Істотні вірогідні відмінності у рівні показника EDSS були встановлені для хворих на МС із генотипом 80GA порівняно з генотипом 80GG при тривалості перебігу хвороби 5-10 років ( $p < 0.05$ ) та для хворих із генотипом 80GA порівняно з генотипом 80AA при тривалості перебігу хвороби понад 10 років ( $p < 0.05$ ). Отже, за наявності генотипу 80GA у хворих на МС простежується помірна інвалідизація, що зберігається впродовж тривалого перебігу хвороби.

Як видно з таблиці 4 та рисунку 2, показник EDSS був найнижчий у пацієнтів із генотипом 80GA у всіх трьох вікових підгрупах, але істотні вірогідні відмінності були встановлені для хворих на МС із тривалістю захворювання 5-10 років і понад 10 років. Отже, за наявності генотипу 80GA простежується менш агресивний перебіг хвороби впродовж тривалого часу.

Таблиця 4

**Показник EDSS залежно від тривалості перебігу МС та генотипів досліджених генів**

Ген, варіант	Генотипи	Середній показник EDSS у загальній групі	Середній показник EDSS у групі до 5 років, (n=46)	Середній показник EDSS у групі 5-10 років, (n=18)	Середній показник EDSS у групі понад 10 років, (n=49)
<i>MTHFR</i> rs1801133	677CC	3.0 [2.0; 5.1]	2.0 [1.5; 3.0]	3.3 [2.3; 5.6]	4.0 [3.1; 6.0]
	677CT	3.3 [1.5; 4.5]	2.0 [1.5; 3.6]	2.0 [1.5; 4.5]	4.5 [3.5; 6.0]
	677TT	3.5 [2.8; 4.0]	-	2.0	3.8 [3.5; 4.0]
<i>MTHFR</i> rs1801131	1298AA	3.5 [2.0; 4.1]	2.0 [1.5; 3.9]	2.0 [2.0; 3.0]	4.0 [3.5; 6.0]
	1298AC	3.0 [1.5; 4.0]	2.0 [1.5; 3.0]	2.5 [1.5; 4.5]	3.5 [2.8; 5.3]
	1298CC	4.8 [2.3; 6.0]	3.0 [2.0; -]	4.5 [2.0; 5.9]	6.0 [3.0; 6.8]
<i>RFC</i> rs1051266	80GG	4.0 [2.1; 5.9]	3.0 [1.5; 4.0]	5.0 [3.3; 6.0]	5.0 [3.3; 6.0]
	80GA	2.0 [1.5; 3.5]	2.0 [1.5; 2.8]	1.8 [1.5; 2.8]	3.5 [2.5; 5.5]
	80AA	4.0 [2.5; 6.0]	2.5 [2.5; 3.6]	2.3 [2.0; 2.3]	5.0 [4.0; 6.3]

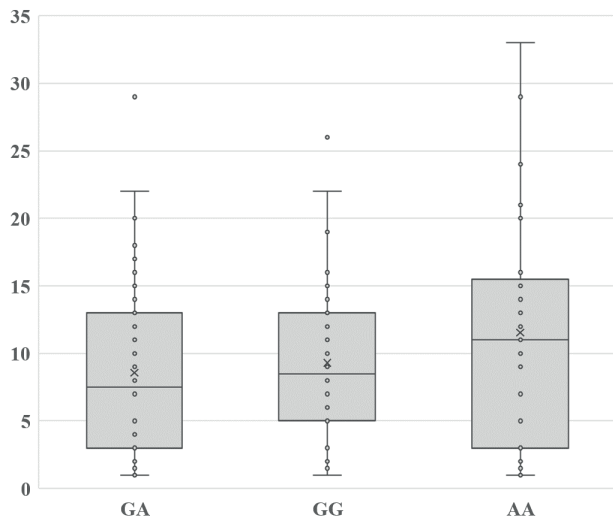


Figure 1. Duration of Disease Progression in MS Patients Depending on Genotypes of the RFC Gene rs1051266 Variant

Given the identified association of the 80GA genotype of the RFC gene with the lowest EDSS score in patients with MS (indicating a milder disease course for this genotype), we analyzed the mean EDSS score across different MTHFR and RFC gene variants, considering the disease duration. Patients were divided into three subgroups based on disease duration: up to 5 years, 5–10 years, and more than 10 years (Table 4, Figure 2), without disability according to the scale.

As shown in Table 4, the EDSS score was the lowest in MS patients with the 80GA genotype compared to the 80GG and 80AA genotypes in the overall group of patients and within all three subgroups based on disease duration.

However, statistically significant differences in EDSS scores were observed for patients with the 80GA genotype compared to the 80GG genotype in the 5–10-year disease duration group ( $p < 0.05$ ) and for patients with the 80GA genotype compared to the 80AA genotype in the more than 10-year disease duration group ( $p < 0.05$ ). Thus, the presence of the 80GA genotype in MS patients is associated with moderate disability, which remains consistent over the long course of the disease.

Table 4 and Figure 2 show that the EDSS score was the lowest in patients with the 80GA genotype across all three disease duration subgroups. However, statistically significant differences were observed in patients with MS lasting 5–10 years and more than 10 years. This suggests that the presence of the 80GA genotype is associated with a less aggressive disease course over time.

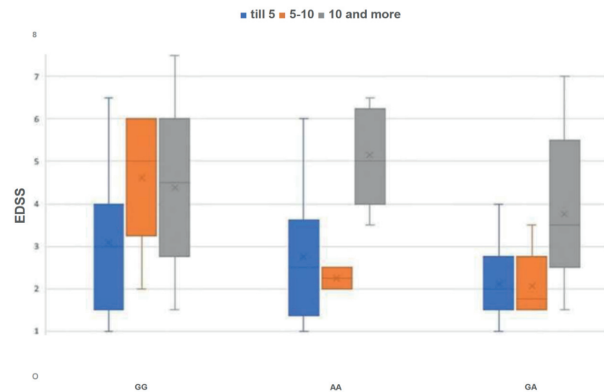


Figure 2 Distribution of EDSS Disability Scale Scores in Patients with MS

Table 4

**EDSS Score Depending on MS Duration and Genotypes of the Studied Genes**

Gene Variants	Genotype	Average EDSS Score in MS Patients (n=113)	Average EDSS Score in the Subgroup of MS Patients with Disease Duration up to 5 Years (n=46)	Average EDSS Score in the Subgroup of MS Patients with Disease Duration of 5–10 Years (n=18)	Average EDSS Score in the Subgroup of MS Patients with Disease Duration Over 10 Years (n=49)
MTHFR C677T	677CC	3.0 [2.0; 5.1]	2.0 [1.5; 3.0]	3.3 [2.3; 5.6]	4.0 [3.1; 6.0]
	677CT	3.3 [1.5; 4.5]	2.0 [1.5; 3.6]	2.0 [1.5; 4.5]	4.5 [3.5; 6.0]
	677TT	3.5 [2.8; 4.0]	-	2.0	3.8 [3.5; 4.0]
MTHFR A1298C	677AA	3.5 [2.0; 4.1]	2.0 [1.5; 3.9]	2.0 [2.0; 3.0]	4.0 [3.5; 6.0]
	677AC	3.0 [1.5; 4.0]	2.0 [1.5; 3.0]	2.5 [1.5; 4.5]	3.5 [2.8; 5.3]
	677CC	4.8 [2.3; 6.0]	3.0 [2.0; -]	4.5 [2.0; 5.9]	6.0 [3.0; 6.8]
RFC rs1051266	80GG	4.0 [2.1; 5.9]	3.0 [1.5; 4.0]	5.0 [3.3; 6.0]	5.0 [3.3; 6.0]
	80GA	2.0 [1.5; 3.5]	2.0 [1.5; 2.8]	1.8 [1.5; 2.8]	3.5 [2.5; 5.5]
	80AA	4.0 [2.5; 6.0]	2.5 [2.5; 3.6]	2.3 [2.0; 2.3]	5.0 [4.0; 6.3]

Відтак на когорті зі 113 пацієнтів ми визначили генетичний ризик розвитку прогресивного МС, пов'язаного з варіантами генів MTHFR (rs1801131, rs1801133) та RFC (rs1051266), їх поєднання, та продемонстрували вплив варіанту гена RFC (rs1051266) на прогресування хвороби і тяжкість її перебігу.

### Обговорення

У нашому дослідженні не були визначені значущі асоціації за варіантом rs1801133 гена MTHFR із ризиком розвитку МС, але виявлена значуща асоціація алеля 1298С за варіантом rs1801131 гена MTHFR зі збільшенням ризику розвитку МС та протекційний вплив алеля 1298А цього гена на розвиток хвороби.

Також ми не встановили істотного впливу сполучень генотипів за варіантами rs1801133 та rs1801131 гена MTHFR на ризик розвитку МС. Подібні результати були отримані N. Fekih Mrissa та співавторами для пацієнтів із МС [8]. У дослідженні Alatab та ін. також не було визначено вірогідного впливу варіанта rs1801133 на ризик розвитку МС [9]. Група вчених на чолі з Choraży M. не виявила значущих асоціацій між цими варіантами гена MTHFR та МС у польській популяції хворих [10].

На відміну від цього, F. Naghibalhossaini та ін. виявили, що особи з алелем 677Т за варіантом rs1801133 мали підвищену генетичну схильність до розвитку МС [11]. Також ці автори показали істотний вплив поєднання генотипів за варіантами rs1801133 та rs1801131 гена MTHFR на ризик розвитку МС. Результати дослідження S. Sakina та ін. свідчать про те, що варіанти гена MTHFR – rs1801133 та rs1801131 – можуть бути пов'язані з ризиком розвитку МС [12].

Така різниця у результатах досліджень, на нашу думку, є наслідком популяційних відмінностей і ген-факторних взаємодій. Важливим чинником розбіжностей у результатах може бути різний дизайн досліджень. Виявлена нами різниця у результатах описаних вище досліджень вказує на необхідність масштабного продовження цих робіт з урахуванням також і комбінованого впливу, бо варіанти генів фолатного обміну, як відомо, є потужним модифікаційним фактором

для низки мультифакторних патологічних захворювань і станів.

Ген RFC, що кодує мембранний фосфатний антипортер, а той своєю чергою транспортує фолати у мозок, є мало досліджений у хворих на МС. У нашому дослідженні виявлена асоціація алеля 80А за геном RFC із підвищеним ризиком розвитку МС. На противагу нашому результату, у схожому дослідженні, проведеному B. Ineichen та співавторами, не була встановлена різниця у частотах поширення генотипів між хворими на рецидивно-ремітуючий МС і здоровими особами контрольної групи [20]. У цьому дослідженні було показано, що 80G алель за геном RFC асоційований з більш раннім віком початку МС. Тоді як у когорті пацієнтів, обстежених нами, виявлено, що носії генотипу 80GG мають більший середній показник EDSS при тривалості перебігу хвороби 5-10 років. Водночас середній показник EDSS був істотно менший у хворих із генотипом 80GA при тривалості перебігу хвороби понад 5 років.

Оскільки генотип 80GA за геном RFC, як і інші у нашому дослідженні, не був асоційований із віком дебюту захворювання та тривалістю його перебігу, то можна висловити гіпотезу про модифікаційний вплив цього генотипу на перебіг МС. Виявлений нами модифікаційний вплив може бути зумовлений перевагою гетерозиготного варіанту 80GA, оскільки при ньому, теоретично, не утворюється ні надлишку, ні дефіциту у транспорті фолатів у мозок, що ймовірно особливо важливо для пацієнтів із тривалим перебігом МС.

SLC19A1 є трансмембранним транспортним білком для поглинання фолатів і їх транспорту через гематоенцефалічний бар'єр, а оскільки фолати є кофакторами синтезу метіоніну, то їх дефіцит може призвести до нижчої здатності до реметилювання та погіршення синтезу метильних груп, що необхідні для забезпечення чисельних регуляторних механізмів, а також і відновлення нервових клітин [20]. Модуляція поглинання фолатів у гематоенцефалічному бар'єрі через SLC19A1 може мати практичне клінічне значення завдяки можливості напрацювання нових теоретичних підходів до від-

Thus, in a cohort of 113 patients, we determined the genetic risk of progressive MS associated with variants of the MTHFR (rs1801131, rs1801133) and RFC (rs1051266) genes, their combinations, and demonstrated the impact of the RFC gene variant (rs1051266) on disease progression and severity.

### Discussion

In our study, no significant associations were identified between the rs1801133 variant of the MTHFR gene and the risk of developing MS. However, a significant association was found between the 1298C allele of the rs1801131 variant of the MTHFR gene and an increased risk of developing MS, as well as a protective effect of the 1298A allele against the disease.

Additionally, there was no significant impact of genotype combinations for the rs1801133 and rs1801131 variants of the MTHFR gene on the risk of developing MS. Similar results were reported by N. Fekih Mrissa and co-authors in studies involving MS patients [8]. Similarly, the study by Alatab et al. did not reveal a significant effect of the rs1801133 variant on MS risk [9]. A study by Choraży et al. found no significant associations between the MTHFR gene variants and MS in the Polish population [10].

In contrast, Naghibalhossaini et al. indicated that individuals carrying the 677T allele of the rs1801133 variant had an increased genetic predisposition to developing MS [11]. They also reported a significant effect of genotype combinations involving the rs1801133 and rs1801131 variants of the MTHFR gene on MS risk. Similarly, Cakina et al. suggested a potential association between the MTHFR gene variants rs1801133 and rs1801131 and the risk of developing MS [12].

In our opinion, such differences in research findings stem from population-specific variations and gene-environment interactions. Another significant factor contributing to these discrepancies could be differences in study design. The identified difference in the results of the studies mentioned above highlights the need for large-scale, continued research, also considering the combined effect, as folate metabolism gene variants are known to be a powerful modifying factor for a range of multifactorial pathological diseases and conditions.

The RFC gene, which encodes the membrane phosphate antiporter responsible for transporting folates into the brain, has been poorly studied in patients with MS. Our study identified an association between the 80A allele of the RFC gene and an increased risk of developing MS. In contrast to our findings, a similar study conducted by Ineichen et al. found no difference in the distribution frequencies of genotypes between patients with relapsing-remitting MS and healthy controls [20]. In their study, the 80G allele of the RFC gene was associated with an earlier age of MS onset. The cohort of patients examined in our study showed that carriers of the 80GG genotype had a higher average EDSS score in cases with a disease duration of 5-10 years. Conversely, the average EDSS score was significantly the lowest in patients with the 80GA genotype for a disease duration exceeding 5 years.

Since the 80GA genotype of the RFC gene, like the other variants in our study, was not associated with the age of disease onset or its duration, we can hypothesize a modifying effect of this genotype on the course of MS. The observed modifying influence may be due to the heterozygous advantage of the 80GA variant, as it theoretically prevents both an excess and a deficiency in folate transport to the brain. This balance may be particularly crucial for patients with a long disease duration.

SLC19A1 is a transmembrane transport protein critical for the uptake and transport of folates across the blood-brain barrier. Since folates are essential cofactors in methionine synthesis, their deficiency can compromise remethylation processes and diminish the synthesis of methyl groups, which are vital for numerous regulatory mechanisms, including repairing and maintaining neural cells [20]. Modulating folate absorption through SLC19A1 at the blood-brain barrier may have practical clinical significance, offering the potential to develop new theoretical approaches for neural cell regeneration. It is well-documented that folinic acid, transported through SLC19A1, exhibits significant clinical efficacy in the brain [24]. Folinic acid could be particularly beneficial for MS patients who also present with autoantibodies against folate receptor alpha (FR $\alpha$ ) (FRAA), which impair FR $\alpha$  function [25]. Therefore, optimizing conditions to

новлення нервових клітин. Бо із низки робіт відомо, що найкраще через SLC19A1 до мозку транспортується та демонструє клінічний ефект фолінова кислота [24]. При цьому фолінова кислота може бути використана для пацієнтів із МС, у яких також виявляють аутоантитіла до рецепторів FRα (FRAA), котрі перешкоджають функціонуванню FRα [25], і тому необхідно створити умови для посилення транспортування через SLC19A1.

При проведенні статистичного аналізу для сполучень генотипів за генами MTHFR, RFC ми визначили модифікаційний вплив їх поєднання на зміну генетичного ризику, а саме його зниження при поєднанні з гомозиготним варіантом 80GG та зростання при поєднанні з генотипом 80GA. Дуже важливими є отримані нами результати щодо впливу поєднань генотипів за варіантами генів MTHFR, RFC у контексті вивчення механізмів оптимального забезпечення фолатами мозку у хворих на МС.

Для хворих на МС було вивчене клінічне значення показників фолатного обміну та встановлені суперечливі результати щодо впливу його показників – гомоцистеїну, вітаміну B12, фолієвої кислоти – на ризик розвитку хвороби та її перебіг. Так, окреме дослідження показало, що пацієнти з МС мали більш високий рівень гомоцистеїну, що він був пов'язаний з прогресуванням хвороби [26], але це не було підтверджено в іншому дослідженні [27].

Дослідження показників фолатного обміну (рівнів ГЦ, фолатів, вітаміну B12) проводять переважно у хворих на МС у периферійній крові, і лише у поодиноких дослідженнях було встановлено, що їхній рівень у спинно-мозковій рідині різниться. Зокрема, рівень ГЦ у плазмі завжди є нижчий, а у спинно-мозковій рідині – вищий. На вказані відмінності впливає стан генетично контролю-

ваної системи транспорту фолатів та їхніх метаболітів у головний мозок [28–30].

Отже, показники фолатного обміну у периферійній крові вкрай опосередковано свідчать про стан фолатного обміну у головному мозку. Зважаючи на це, перспективним є вивчення генетичних та епігенетичних механізмів, що регулюють метаболізм і транспорт фолатів у головний мозок. Тому подальші масштабні дослідження варто, на нашу думку, сфокусувати на поєднаному впливі генетичних варіантів та їх взаємодії з факторами середовища, а також на механізмах генетичної й епігенетичної регуляції транспорту фолатів у головний мозок у хворих на МС.

### Висновок

При виконанні роботи був оцінений генетичний ризик розвитку МС, зумовлений варіантами генів фолатного обміну. Виявлені асоціації варіантів генів MTHFR (1298C алель), RFC (80A алель, 80GA генотип) зі зростанням ризику розвитку МС, а варіантів генів MTHFR (1298A алель), RFC (80G алель, 80GG генотип) зі зменшенням ризику розвитку МС. Поєднання досліджених варіантів генів чинили модифікаційний вплив на ризик розвитку МС. Показник EDSS був істотно менший за наявності у хворих на МС генотипу 80GA порівняно з генотипами 80GG та 80AA.

Отже, наше дослідження свідчить про необхідність подальших масштабних робіт у напрямі вивчення поєданого впливу генетичних варіантів та їх взаємодії з факторами середовища, а також механізмів генетичної й епігенетичної регуляції транспорту фолатів у головний мозок через транспортер SLC19A1. Це може стати підґрунтям для напруження персоналізованої терапії задля профілактики неврологічних ушкоджень при прогресивному перебігу МС.

### Список літератури

1. Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. [Updated 2024 Mar 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan [cited 2024]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>
2. Nevmerzhytska NM, Orzheshkovskiy VV, Dzevulska IV. Mechanisms of toxic effects of homocysteine on the nervous system. *Neurophysiol.* 2019;51:379–87. doi:10.1007/s11062-020-09832-x
3. Webb LM, Guerau-de-Arellano M. Emerging role for methylation in multiple sclerosis: beyond DNA. *Trends Mol Med.* 2017;23(6):546–62. doi:10.1016/j.molmed.2017.04.004

enhance folate transport via SLC19A1 may be essential for improving therapeutic outcomes in these patients.

In the statistical analysis of genotype combinations for the MTHFR and RFC genes, we identified a modifying effect of their combination on genetic risk. Specifically, the risk decreased in combination with the homozygous 80GG variant and increased in combination with the 80GA genotype. Our findings regarding the impact of genotype combinations for the MTHFR and RFC gene variants are particularly significant in the context of studying mechanisms for optimal folate delivery to the brain in MS patients.

The clinical relevance of folate metabolism indicators in patients with MS has been extensively explored, revealing inconsistent findings concerning the effects of Hcy, vitamin B12, and folic acid levels on disease risk and progression. For instance, one study demonstrated that MS patients exhibited elevated Hcy levels, which were linked to disease progression [26]. However, this finding was not corroborated by another study [27].

Studies on folate metabolism markers (Hcy, folate, and vitamin B12 levels) are predominantly conducted in peripheral blood samples of MS patients, with only a few studies demonstrating differences in their levels in cerebrospinal fluid. For instance, plasma Hcy levels are consistently lower, while those in cerebrospinal fluid are higher. These differences are influenced by the state of the genetically controlled system responsible for transporting folates and their metabolites into the brain [28–30].

Thus, folate metabolism markers in peripheral blood only indirectly reflect the state of folate metabolism in the brain. Considering this, the study of genetic and epigenetic mechanisms regulating folate metabolism and transport in the brain appears to be a promising area of research. Future large-scale studies should focus on the combined impact of genetic variants and their interactions with environmental factors, as well as the mechanisms of genetic and epigenetic regulation of folate transport in the brain of MS patients.

### Conclusion

This study assessed the genetic risk of developing MS associated with folate metabolism gene variants. Associations were identified between the MTHFR gene (1298C allele), RFC gene (80A allele, 80GA genotype), and an increased risk of developing MS. Conversely, the MTHFR gene (1298A allele) and RFC gene (80G allele, 80GG genotype) were associated with a decreased risk of developing MS. Combinations of the studied gene variants had a modifying effect on the risk of MS development. The EDSS score was significantly lower in MS patients with the 80GA genotype compared to the 80GG and 80AA genotypes.

Our preliminary study highlights the necessity for further large-scale research focusing on the combined impact of genetic variants, their interaction with environmental factors, and the genetic and epigenetic mechanisms governing folate transport into the brain via SLC19A1. Such investigations could facilitate the development of personalized therapeutic strategies aimed at mitigating neurological damage in progressive MS.

### References

1. Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. [Updated 2024 Mar 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan [cited 2024]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499849/>
2. Nevmerzhytska NM, Orzheshkovskyy VV, Dzevulska IV. Mechanisms of toxic effects of homocysteine on the nervous system. *Neurophysiol.* 2019;51:379–87. doi:10.1007/s11062-020-09832-x
3. Webb LM, Guerau-de-Arellano M. Emerging role for methylation in multiple sclerosis: beyond DNA. *Trends Mol Med.* 2017;23(6):546–62. doi:10.1016/j.molmed.2017.04.004
4. Li Z, Li W, Zhou D, et al. Alleviating oxidative damage-induced telomere attrition: a potential mechanism for inhibition by folic acid of apoptosis in neural stem cells. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):590–602. doi:10.1007/s12035-021-02623-3
5. Fava M, Mischoulon D. Folate in depression: efficacy, safety, differences in formulations, and clinical issues. *J Clin Psychiatry.* 2009;70 Suppl 5:12–7. doi:10.4088/JCP.8157su1c.03

4. Li Z, Li W, Zhou D, et al. Alleviating oxidative damage-induced telomere attrition: a potential mechanism for inhibition by folic acid of apoptosis in neural stem cells. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):590–602. doi:10.1007/s12035-021-02623-3
5. Fava M, Mischoulon D. Folate in depression: efficacy, safety, differences in formulations, and clinical issues. *J Clin Psychiatry.* 2009;70 Suppl 5:12–7. doi:10.4088/JCP.8157su1c.03
6. Kurniawan H, Kobayashi T, Brenner D. The emerging role of one-carbon metabolism in T cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2021;68:193–201. doi:10.1016/j.copbio.2020.12.001
7. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, et al. Oxidative stress, neuroinflammation and mitochondria in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9):901. doi:10.3390/antiox9090901
8. Fekih Mrissa N, Mrad M, Klai S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(9):1657–60. doi:10.1016/j.clineuro.2013.02.025
9. Alatab S, Hossein-nezhad A, Mirzaei K, et al. Inflammatory profile, age of onset, and the MTHFR polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Mol Neurosci.* 2011;44(1):6–11. doi:10.1007/s12031-010-9486-y
10. Chorąży M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Gościak J, et al. Association between polymorphisms of a folate-homocysteine-methionine-SAM metabolizing enzyme gene and multiple sclerosis in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol.* 2019;53(3):19–98. doi:10.5603/PJNNS.a2019.0019
11. Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A, et al. Association between MTHFR genetic variants and multiple sclerosis in a southern Iranian population. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4(2):87–93.
12. Cakina S, Ocak O, Ozkan A, et al. Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia Neuropathol.* 2019;57(1):36–40. doi:10.5114/fn.2019.83829
13. Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, et al. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(7):453–62. doi:10.1074/mcp.M200050-MCP200
14. Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis.* 2018;33(5):1393–9. doi:10.1007/s11011-018-0224-4
15. Peng H, Wu X, Lin J, et al. Genetically predicted circulating homocysteine, vitamin B12, and folate levels and risk of multiple sclerosis: evidence from a two-sample Mendelian randomization analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;56:103255. doi:10.1016/j.msard.2021.103255
16. Whetstone JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002;367(Pt 3):629–40. doi:10.1042/BJ20020512
17. Luteijn RD, Zaver SA, Gowen BG, et al. SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides. *Nature.* 2019;573(7774):434–8. Erratum in: *Nature.* 2020;579(7800):E12. doi:10.1038/s41586-019-1553-0
18. Matherly LH, Hou Z. Folate transporter offers clues for anticancer drugs. *Nature.* 2022;612(7938):39–41. doi:10.1038/d41586-022-03767-5
19. Candelaria M, Ojeda J, Gutiérrez-Hernández O, et al. G80A single nucleotide polymorphism in reduced folate carrier-1 gene in a Mexican population and its impact on survival in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Invest Clin.* 2016;68(3):154–62.
20. Ineichen BV, Keskitalo S, Farkas M, et al. Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple sclerosis: a case-control study. *Neurosci Lett.* 2014;562:75–8. doi:10.1016/j.neulet.2014.01.008
21. Gök V, Erdem Ş, Haliloğlu Y, et al. Immunodeficiency associated with a novel functionally defective variant of SLC19A1 benefits from folinic acid treatment. *Genes Immun.* 2023;24(1):12–20. doi:10.1038/s41435-022-00191-7
22. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162–73. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
23. Rossokha Z, Fishchuk L, Vorobei L, et al. Hyperhomocysteinemia in men and women of married couples with reproductive disorders. What is the difference? *Syst Biol Reprod Med.* 2023;69(1):75–85. doi:10.1080/19396368.2022.2124896
24. Alam C, Hoque MT, Finnell RH, et al. Regulation of reduced folate carrier (RFC) by vitamin D receptor at the blood-brain barrier. *Mol Pharm.* 2017;14(11):3848–58. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00572
25. Mashayekhi F, Hadipour E, Shabani S, et al. Folate receptor alpha autoantibodies in the serum of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *Clin Neurol Neurosurg.* 2024;237:108161. doi:10.1016/j.clineuro.2024.108161
26. Ali RH, Abdel-Razik I, AlAhmar MSE, et al. Homocysteine serum level as a biomarker of multiple sclerosis disability and cognitive impairment. *J Mult Scler.* 2023;10(1):481.

6. Kurniawan H, Kobayashi T, Brenner D. The emerging role of one-carbon metabolism in T cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2021;68:193–201. doi:10.1016/j.copbio.2020.12.001
7. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, et al. Oxidative stress, neuroinflammation and mitochondria in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(9):901. doi:10.3390/antiox9090901
8. Fekih Mrissa N, Mrad M, Klai S, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(9):1657–60. doi:10.1016/j.clineuro.2013.02.025
9. Alatab S, Hossein-nezhad A, Mirzaei K, et al. Inflammatory profile, age of onset, and the MTHFR polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Mol Neurosci.* 2011;44(1):6–11. doi:10.1007/s12031-010-9486-y
10. Choraży M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Gościk J, et al. Association between polymorphisms of a folate-homocysteine-methionine-SAM metabolizing enzyme gene and multiple sclerosis in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol.* 2019;53(3):19–98. doi:10.5603/PJNNS.a2019.0019
11. Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A, et al. Association between MTHFR genetic variants and multiple sclerosis in a southern Iranian population. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4(2):87–93.
12. Cakina S, Ocak O, Ozkan A, et al. Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia Neuropathol.* 2019;57(1):36–40. doi:10.5114/fn.2019.83829
13. Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, et al. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(7):453–62. doi:10.1074/mcp.M200050-MCP200
14. Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis.* 2018;33(5):1393–9. doi:10.1007/s11011-018-0224-4
15. Peng H, Wu X, Lin J, et al. Genetically predicted circulating homocysteine, vitamin B12, and folate levels and risk of multiple sclerosis: evidence from a two-sample Mendelian randomization analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;56:103255. doi:10.1016/j.msard.2021.103255
16. Whetstone JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002;367(Pt 3):629–40. doi:10.1042/BJ20020512
17. Luteijn RD, Zaver SA, Gowen BG, et al. SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides. *Nature.* 2019;573(7774):434–8. Erratum in: *Nature.* 2020;579(7800):E12. doi:10.1038/s41586-019-1553-0
18. Matherly LH, Hou Z. Folate transporter offers clues for anticancer drugs. *Nature.* 2022;612(7938):39–41. doi:10.1038/d41586-022-03767-5
19. Candelaria M, Ojeda J, Gutiérrez-Hernández O, et al. G80A single nucleotide polymorphism in reduced folate carrier-1 gene in a Mexican population and its impact on survival in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Invest Clin.* 2016;68(3):154–62.
20. Ineichen BV, Keskitalo S, Farkas M, et al. Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple sclerosis: a case-control study. *Neurosci Lett.* 2014;562:75–8. doi:10.1016/j.neulet.2014.01.008
21. Gök V, Erdem Ş, Haliloğlu Y, et al. Immunodeficiency associated with a novel functionally defective variant of SLC19A1 benefits from folinic acid treatment. *Genes Immun.* 2023;24(1):12–20. doi:10.1038/s41435-022-00191-7
22. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162–73. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
23. Rossokha Z, Fishchuk L, Vorobei L, et al. Hyperhomocysteinemia in men and women of married couples with reproductive disorders. What is the difference? *Syst Biol Reprod Med.* 2023;69(1):75–85. doi:10.1080/19396368.2022.2124896
24. Alam C, Hoque MT, Finnell RH, et al. Regulation of reduced folate carrier (RFC) by vitamin D receptor at the blood-brain barrier. *Mol Pharm.* 2017;14(11):3848–58. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00572
25. Mashayekhi F, Hadipour E, Shabani S, et al. Folate receptor alpha autoantibodies in the serum of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *Clin Neurol Neurosurg.* 2024;237:108161. doi:10.1016/j.clineuro.2024.108161
26. Ali RH, Abdel-Razik I, AlAhmar MSE, et al. Homocysteine serum level as a biomarker of multiple sclerosis disability and cognitive impairment. *J Mult Scler.* 2023;10(1):481.
27. Dardiotis E, Arseniou S, Sokratous M, et al. Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;17:190–7. doi:10.1016/j.msard.2017.08.004
28. Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H, et al. Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler.* 2003;9(3):239–45. doi:10.1191/1352458503ms9180a

27. Dardiotis E, Arseniou S, Sokratous M, et al. Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;17:190–7. doi:10.1016/j.msard.2017.08.004
28. Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H, et al. Increased plasma homocysteine levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler.* 2003;9(3):239–45. doi:10.1191/1352458503ms918oa
29. Obeid R, Kostopoulos P, Knapp JP, et al. Biomarkers of folate and vitamin B12 are related in blood and cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 2007;53(2):326–33. doi:10.1373/clinchem.2006.076448
30. Lafarenko M, Nehrych N, Fishchuk L, Popova O, Rossokha Z, Nehrych T. The 4A/B polymorphism of the NOS3 gene as a predictor of susceptibility and progression of multiple sclerosis. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2024Dec.27;76(2). <https://doi.org/10.25040/ntsh2024.02.20>

29. Obeid R, Kostopoulos P, Knapp JP, et al. Biomarkers of folate and vitamin B12 are related in blood and cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 2007;53(2):326–33. doi:10.1373/clinchem.2006.076448
30. Lafarenko M, Nehrych N, Fishchuk L, Popova O, Rossokha Z, Nehrych T. The 4A/B polymorphism of the NOS3 gene as a predictor of susceptibility and progression of multiple sclerosis. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2024Dec.27;76(2). <https://doi.org/10.25040/ntsh2024.02.20>