

Czynniki środowiskowe i ich związek z rozwojem stwardnienia rozsianego

Ingrid A.F. Van der Mei, PhD,^{a,b} Steve Simpson Jr, MPH,^a Jim Stankovich, PhD,^a Bruce V. Taylor, MD^a

^a Menzies Research Institute, University of Tasmania, Tasmania, Australia

^b Menzies Research Institute, University of Tasmania, Tasmania, Australia

Adres do korespondencji:
Menzies Research Institute,
University of Tasmania,
17 Liverpool Street, Hobart,
Tasmania, Australia 7000

e-mail: Ingrid.vanderMei@utas.edu.au

Neurol Clin 29 (2011) 233-255

Neurologia po Dyplomie
2012; 7 (2): 19-33

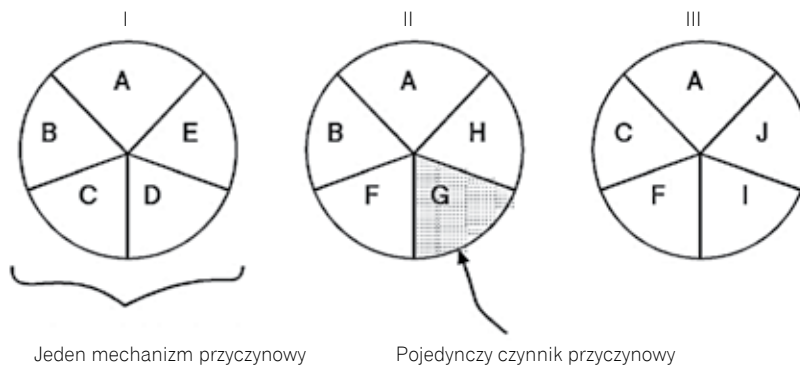
SŁOWA KLUCZOWE: stwardnienie rozsiane, czynniki środowiskowe, interakcje geny-środowisko, przegląd, przyczyna

Niniejszy przegląd omawia czynniki środowiskowe oraz związane ze stylem życia, mogące odgrywać rolę w rozwoju stwardnienia rozsianego (SM). Autorzy wykorzystują założenia modelu przyczynowego Rothmana¹ do omówienia wzajemnych interakcji między różnymi czynnikami, które mogą wykazywać związek przyczynowy ze stwardnieniem rozsianym. Cechą kluczową ekspozycji na czynniki środowiskowe jest czas, w jakim ona następuje, oraz sekwencja zdarzeń, która może wywierać wpływ na jej następstwa. Omawiany jest aspekt czasowy poszczególnych czynników środowiskowych.

Model przyczynowy stwardnienia rozsianego

Stwardnienie rozsiane jest złożoną, wieloczynnikową chorobą, w której wiele czynników genetycznych i środowiskowych wywiera wpływ na obraz kliniczny. Model przyczynowy według Rothmana,¹ przedstawiany w formie wykresu kołowego, stanowi użyteczne narzędzie do zrozumienia wpływu poszczególnych czynników etiologicznych, pozwalające na schematyczne przedstawienie sposobu, w jaki pojedyncze czynniki mogą wpływać na siebie wzajemnie. Poszczególne czynniki mogą być przedstawione graficznie jako tzw. kawałki tortu (rycina), a złożony mechanizm przyczynowy wymaga wspólnego działania wielu składowych. Każdy pojedynczy czynnik przyczynowy (czyli zdarzenie lub zjawisko) odgrywa istotną rolę w powstawaniu choroby u poszczególnych pacjentów. Aby doszło do zachorowania na określoną chorobę, musi skumulować się kilka czynników, ale u poszczególnych chorych mogą się one różnić. Rycina przedstawia trzy różne mechanizmy przyczynowe mogące prowadzić do rozwoju tej samej choroby, w tym przypadku SM. Czynnikiem A może być na przykład wysokie miano przeciwciał przeciwko wirusowi Epsteina-Barr (EBV), czynnikiem B ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe o niskiej częstotliwości (UVR), czynnikiem C palenie tytoniu, a czynnikiem D – posiadanie genotypu HLA-DR15*1501 (HLA-DR15). Poszczególne fragmenty reprezentują czynniki genetyczne lub środowiskowe (znane i nieznanne), odgrywające rolę przyczynową w rozwoju stwardnienia rozsianego.

Należy pamiętać, że w poszczególnych grupach pacjentów występują różne czynniki; niektóre z tych pojedynczych czynników mogą brać udział w różnych mechanizmach, podczas gdy inne jedynie w nielicznych. Dlatego określona choroba może być spowodowana współwystępowaniem różnych czynników. Może to tłumaczyć, dlaczego u niektórych chorych dochodzi do rozwoju stwardnienia rozsianego, mimo że nie stwierdza się u nich wysokiego miana przeciwciał przeciwko wirusowi Epsteina-Barr lub genotypu HLA-DR15. Ponadto pojedynczy określony czynnik nie musi działać w tym samym czasie. W stwardnieniu rozsianym różne czynniki przyczynowe wykazują działanie w poszczególnych etapach życia (ciąża, okres prenatalny, dzieciństwo, wiek dorosły).



RYCINA. Trzy figury, obrazujące związki przyczynowe dla danej choroby u trzech osób lub grup ludzi (przedruk z Rothman KJ. What is causation? W: Rothman KJ. Epidemiology, an introduction. New York: Oxford University Press; 2002. Rozdział 2; za pozwoleniem).

W epidemiologii używa się terminu „wnioskowanie przyczynowe” dla określenia, jak silnie dany czynnik związany jest z występowaniem danej choroby. Według kryteriów opracowanych przez Hilla² termin ten zawiera informacje na temat spójności wyników uzyskiwanych z różnych badań, siły występujących powiązań, zależności między dawką a odpowiedzią, istnienia dowodów na biologiczne podłoże działania danego mechanizmu, związków czasowych oraz potwierdzenia w badaniach doświadczalnych (randomizowane próby kliniczne).¹ Wszystkie te aspekty brano pod uwagę w poniższym omówieniu możliwych czynników ryzyka.

Wirus Epsteina-Barr

Uważa się, że potencjalnymi czynnikami odpowiedzialnymi za wywoływanie chorób autoimmunologicznych działających na drodze molekularnej mimikry mogą być zakażenia. Przykładem może być infekcja *Campylobacter* i zespół Guillaina-Barrego. Inny możliwy mechanizm działania polega na biernej modulacji układu immunologicznego. Wirus Epsteina-Barr (EBV) jest jedynym czynnikiem zakaźnym, w przypadku którego istnieją przekonujące i spójne dowody na związek z zachorowaniem na SM. Wirus ten należy do grupy wirusów *Herpes*. Pierwotne zakażenie EBV w wieku dziecięcym bywa na ogół bezobjawowe, natomiast jeżeli dochodzi do niego w wieku późniejszym, objawia się ono pod postacią mononukleozy zakaźnej, określanej także jako gorączka gruźlowa. Po okresie pierwotnej ekspozycji wirus w postaci utajonej znajduje się w limfocytach typu B. Jest to wynikiem ograniczonej ekspresji genów wirusa z niewielkim namnażaniem w tkance limfatycznej.³ U osób z prawidłową czynnością układu odpornościowego zazwyczaj nie dochodzi do nawrotów choroby, niekiedy mogą wystąpić subkliniczne epizody reaktywacji wirusa.⁴

W ciągu 20 lat wzrosła liczba dowodów na związek między zakażeniem EBV a SM. Pochodzą one z prac epidemiologicznych dotyczących występowania stwardnienia rozsianego oraz danych z badań serologicznych i (lub) zachorowania na mononukleozę zakaźną, badań nad odpowiedzią immunologiczną organizmu w stosunku do wirusa i prac neuropatologicznych.

W licznych badaniach dotyczących zależności kliniczno-serologicznych z uwzględnieniem grup kontrolnych wykazano, że stwardnienie rozsiane występuje niezwykle rzadko u osób bez przeciwciał przeciwko wirusowi Epsteina-Barr w klasie IgG (iloraz szans na podstawie metaanaliz wynosi 0,06 [0,03-0,13]).⁵ Z drugiej strony u większości chorych na stwardnienie rozsiane stwierdza się obecność przeciwciał IgG przeciwko wirusowi EBV (99%, w grupie kontrolnej 90%).⁶ Ponadto u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym o wiele częściej stwierdza się przebyłą mononukleozę (w łącznej analizie 14 badań łączne ryzyko względne wynosiło 2,3 [1,7-3,0]).⁷ W nowszych badaniach ryzyko to jest podobne i waha się od 2,06 (1,71-2,48) do 2,50 (1,73-2,86).⁸⁻¹⁰ Uzyskano rozbieżne dane dotyczące czasu między zachorowaniem na mononukleozę zakaźną a rozwojem SM. W jednym z badań wykazano, że ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane jest większe, jeżeli pacjent przebył mononukleozę po 15 roku życia,¹¹ w innym z kolei stwierdzono, że ryzyko jest większe, jeżeli miało to miejsce wcześniej.⁹ Niezależnie od wieku zachorowania na mononukleozę, ryzyko rozwoju SM jest stałe. W jednym z badań wykazano, że zwiększone ryzyko rozwoju stwardnienia rozsianego może utrzymywać się nawet do 30 lat po przebyciu mononukleozy.⁹

Wykazano związek między wysokim mianem przeciwciał przeciwko EBV a zachorowaniem na stwardnienie rozsiane. Co istotne, zależność tę stwierdzono również w badaniach prospektywnych,¹²⁻¹⁶ w których wykazano, że wysokie miano przeciwciał przeciwko wirusowi Epsteina-Barr są

obecne przed zachorowaniem na SM, a nie po jego wystąpieniu. Najsilniejszy związek wykazano dla antygeny jądrowego wirusa Epsteina-Barr (Epstein-Barr nuclear antigen, EBNA), czego przejawem jest znacznie podwyższone miano przeciwciał przeciwko EBNA-1, mniejsze natomiast przeciwko EBNA-2 oraz antygenowi kapsydu wirusa (viral capsid antigen, VCA).^{12, 14-16} Obecność antygeny EBNA-1 stwierdza się w zakażonych komórkach pamięci B u zdrowych nosicieli.¹⁷ Antygen jądrowy EBNA składa się z 6 białek, z których jedno (EBNA-1) jest wykrywane podczas rutynowych badań. Przeciwciała przeciwko EBNA-2 pojawiają się w ostrej fazie zakażenia i zanikają w miarę zdrowienia, natomiast przeciwciała przeciwko EBNA-1 są stwierdzane w okresie rekonwalescencji i miano ich pozostaje stabilne w ciągu całego życia.

Nie jest jasny związek między przebyciem mononukleozą zakaźną a wysokim mianem przeciwciał przeciwko EBV. Niestety w prospektywnych badaniach dotyczących EBNA brakuje danych dotyczących mononukleozy zakaźnej. W retrospektywnym badaniu klinicznym z grupą kontrolną, przeprowadzonym na Tasmanii, w którym 25,7% pacjentów i 14,3% osób z grupy kontrolnej przebyło mononukleozę zakaźną (iloraz szans 2,10 [1,24-3,55]),¹⁸ średnie miano przeciwciał przeciwko EBNA (u osób, u których je stwierdzano) było większe u tych, którzy chorowali w przeszłości na mononukleozę, w porównaniu z tymi, którzy nie przebyli tego zakażenia. Zależność tę stwierdzano zarówno u osób, które przebyły mononukleozę (312 vs 295 j.), jak i w grupie kontrolnej (264 vs 253 j.). Różnica ta była jednak podobna w grupie chorych i grupie kontrolnej ($p=0,77$ dla tego związku).

Interesujące jest zagadnienie, czy wysokie miano przeciwciał przeciwko EBNA pojawia się bezpośrednio po pierwotnym zakażeniu wirusem Epsteina-Barr, czy też wzrost miana następuje później, czy też może oba te zjawiska zachodzą równolegle. Badania z oceną długoterminową sugerują, że wśród osób, które zachorowały na SM miano przeciwciał w klasie IgG przeciwko antygenowi EBNA były podobne wśród osób poniżej 20 roku życia, które przechorowały mononukleozę i tych, które nie przebyły tej choroby. Między 25 a 29 rokiem życia miano było 2-3 razy większe u osób, które przebyły mononukleozę, podobnie u osób po 30 roku życia.¹⁵ Wyniki te wskazują, że miano przeciwciał rośnie między 20 a 30 rokiem życia i później pozostaje stabilne.¹⁵ Jednak w niektórych przypadkach podwyższone miano przeciwciał przeciwko EBNA może pojawić się wcześniej. Obecność przeciwciał przeciwko wirusowi EBV stwierdza się znacznie częściej wśród dzieci ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z grupą kontrolną (99 vs 72%, $p=0,001$,¹⁹ lub 86 vs 64%, $p=0,02520$). Wyższe miano przeciwciał przeciwko EBNA-1 występują częściej u dzieci ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z grupą kontrolną, co jednak może wynikać z większej liczby chorych z przeciwciałami w klasie IgG przeciwko EBNA-1.¹⁹

Zwiększoną odpowiedź humoralną i komórkową przeciwko wirusowi EBV obserwowano także u pacjentów z SM. Na przykład wzrost swoistych dla wirusa EBV komórek T

CD4⁺ i CD8⁺ stwierdzano w płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi chorych na stwardnienie rozsiane, co może wynikać z nieprawidłowej aktywacji układu odpornościowego w zętknięciu z wirusem.²¹⁻²² Ponadto w kilku badaniach wykazano u chorych ze stwardnieniem rozsianym reaktywność immunoglobulin w płynie mózgowo-rdzeniowym przeciwko antygenom EBV.^{21,23} Cepok i wsp.²³ przeanalizowali immunoglobuliny z płynu mózgowo-rdzeniowego, używając profilu ekspresji genów, zawierającego 37 000 oznaczonych białek, pochodzących z cDNA mózgu człowieka. Wykazali oni, że w SM najczęściej obserwuje się reaktywność wobec dwóch sekwencji peptydów należących do dwóch białek wirusa EBV, nazwanych EBNA-1 oraz BRRF2. Ponadto klony komórek T rozpoznające immunodominujące epitopy białka podstawowego mieliny, pochodzące od chorych na stwardnienie rozsiane, reagują krzyżowo z białkami pochodzącymi z wirusa EBV, podobnie jak EBV-reaktywne komórki T izolowane od tych pacjentów.²⁴

Jednak dowody na obecność wirusa Epsteina-Barr w tkankach mózgu w badaniach *post mortem* są niejednoznaczne. W badaniu z 2007 roku przeprowadzonym przez Serafiniego i wsp.²⁵ stwierdzono gromadzenie się komórek B i komórek plazmatycznych zakażonych wirusem EBV w oponach mózgowo-rdzeniowych oraz zmianach w okolicy okołonaczyniowej istoty białej u chorych na stwardnienie rozsiane. Ponadto wydaje się, że reaktywacja wirusa jest ograniczona do ektopowych skupisk komórek B oraz ostrych zmian.²⁵ Jednak wyniki ostatnio opublikowanych 2 badań były odmienne.^{26,27} W jednym z nich, w którym użyto wielu metod, w tym hybrydyzacji *in situ*, metod immunocytochemicznych i metody reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, nie wykazano obecności EBV w zmianach w istocie białej. Stwierdzono małą liczbę komórek zakażonych wirusem EBV w 2 z 12 próbek pobranych z opon mózgowo-rdzeniowych chorych na stwardnienie rozsiane.²⁶ W drugim badaniu również nie wykazano obecności latentnego czy czynnego zakażenia wirusem EBV w mózgu lub płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na stwardnienie rozsiane. Nie stwierdzono też śródkanałowych swoistych przeciwciał przeciwko EBV.²⁷

W ostatnio opublikowanym przeglądzie przedstawiono rozmaite hipotezy na temat mechanizmu, w jaki wirus EBV może prowadzić do rozwoju SM: hipoteza krzyżowej reaktywności EBV, hipoteza uszkodzenia pośredniego, hipoteza autoreaktywnych komórek B, zakażonych wirusem, hipoteza udziału alfa-B-krystaliny.²⁸ Hipoteza reaktywności krzyżowej zakłada, że limfocyty T aktywowane w wyniku kontaktu z antygenami wirusa EBV reagują krzyżowo z antygenami ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W hipotezie uszkodzenia pośredniego działanie układu immunologicznego jest pierwotnie skierowane przeciwko reaktywacji wirusa EBV, czego pośrednim następstwem jest uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego. Hipoteza autoreaktywnych komórek B zakażonych wirusem EBV zakłada, że u osób podatnych genetycznie, komórki te przez wpływ na narząd docelowy

indukują wytwarzanie chorobotwórczych autooprzeciwciał oraz dostarczają kostymulujących sygnałów przetrwania dla komórek T, co zapobiega ich obumarciu w wyniku aktywacji indukowanej apoptozy. Hipoteza udziału alfa-B-krystaliny mówi, że ekspozycja na czynniki zakaźne indukuje ekspresję alfa-B-krystaliny będącej białkiem szoku termicznego w komórkach układu limfatycznego, w których w warunkach prawidłowych do ekspresji tej nie dochodzi. Układ odpornościowy błędnie rozpoznaje alfa-B-krystalinę jako antygen drobnoustroju i stymuluje produkcję limfocytów T CD4⁺ skierowanych przeciwko niemu. Limfocyty T atakują alfa-B-krystalinę pochodzącą z oligodendrocytów ośrodkowego układu nerwowego, w następstwie czego dochodzi do zmian zapalnych i demielinizacji. Możliwy jest także podwójny mechanizm działania wirusa EBV. Występuje on, gdy dochodzi do jednoczesnego zakażenia autoreaktywnych komórek B znajdujących się w układzie nerwowym odpowiadających za przewlekłą fazę choroby, oraz indukcji alfa-B-krystaliny w komórkach B, co powoduje aktywację komórek T i produkcję limfocytów CD4⁺, które zwracają się przeciwko temu białku w oligodendrocytach, w odpowiedzi na zakażenie OUN wirusem Epsteina-Barr.

Ogólnie mówiąc, istnieją przekonujące dowody epidemiologiczne wskazujące na rolę wirusa Epsteina-Barr w patogenie SM. Ponadto wydaje się, że u chorych na stwardnienie rozsiane zaburzony jest mechanizm odpowiedzi układu immunologicznego na zakażenie EBV. Jednak dowody na obecność wirusa EBV w mózgu są niejednoznaczne i trudno jest definitywnie ustalić mechanizm działania wirusa.

Ekspozycja na słońce/witamina D₃

Od dawna wiadomo jest, że stwardnienie rozsiane cechuje się charakterystyczną dystrybucją, ze wzrostem częstotliwości zachorowania wraz z rosnącą szerokością geograficzną,^{29,30} co zostało potwierdzone w metaanalizach dotyczących rozpowszechnienia i częstości występowania SM.^{31,32} Interesujące dane pochodzą z badania przeprowadzonego w Australii, w którym wykazano, że częstość zachorowania na pierwszy w życiu incydent demielinizacji rośnie wraz ze stopniem szerokości geograficznej o 9,55% na każdy stopień.³³ Mimo że różnice w występowaniu alleli HLA-DRB1 mogą w pewnym stopniu tłumaczyć odmienności w częstości występowania stwardnienia rozsianego w krajach europejskich,^{34,35} wydaje się, że zależność od stopnia szerokości geograficznej ma też podłoże środowiskowe. Potwierdzają to obserwacje o związku częstości zachorowania z szerokością geograficzną we względnie jednolitych etnicznie populacjach w Australii^{36,37} i Nowej Zelandii.³⁸ Ponadto ryzyko zachorowania związane z szerokością geograficzną zmienia się przy zmianie miejsca zamieszkania po urodzeniu.^{39,40} Przyjmuje się, że ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane jest determinowane przed 15 rokiem życia,⁴¹ chociaż dane dotyczące

migracji pochodzące z Australii wskazują, że okres ten może rozciągać się aż do wieku dorosłego.⁴⁰ W 1961 roku zaobserwowano związek między zachorowaniem na SM a nasileniem promieniowania ultrafioletowego otoczenia (UVR),⁴² lecz dopiero w latach 90. nowe spojrzenie na fotoimmunologię wskazało na możliwość innych mechanizmów, co dało początek badaniom w tym kierunku.

Obecne dane epidemiologiczne, pochodzące zarówno z pojedynczych opisów przypadków, jak i prospektywnych badań kohortowych, wskazują na związek między małą osobniczą ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe lub małym stężeniem wolnej witaminy D a zwiększonym ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane. Prospektywne badania kliniczne, oceniające stężenie 25-hydroksywitaminy D (25(OH)D) przed rozpoczęciem choroby wykazało, że większe stężenie 25(OH)D w surowicy było związane z mniejszym ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane (iloraz szans 0,59 [0,36-0,97] na 50-nmol/l wzrostu 25(OH)D).⁴³ Warto zauważyć, że chociaż podaż z pożywieniem odpowiada za około 5% wolnej witaminy 25(OH)D, suplementacja witaminy D również wiąże się z ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane (ryzyko względne 0,59 [0,38-0,91], przy porównaniu dziennego spożycia ≥ 400 IU suplementów witaminy D dziennie z brakiem suplementacji).⁴⁴

Mimo że w badaniach epidemiologicznych oceniano osobniczą ekspozycję na słońce, nie prowadzono badań prospektywnych poświęconych temu zagadnieniu. W badaniu z udziałem bliźniąt jednojajowych wykazano, że większa ekspozycja na światło słoneczne w dzieciństwie może być związana z mniejszym ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane.⁴⁵ Dużą zaletą badania jest to, że brano pod uwagę takie czynniki, jak wiek, płeć, szerokość geograficzna miejsca urodzenia, kolor skóry, status społeczno-ekonomiczny, wywiad rodzinny i genotyp. W porównawczym badaniu z udziałem chorych ze stwardnieniem rozsianym, przeprowadzonym na Tasmanii (szerokość geograficzna południowa 41-43°), stwierdzono, że dłuższe przebywanie na słońcu między 6 a 15 rokiem życia istotnie zmniejszało ryzyko zachorowania na SM. Co więcej, w badaniach tych wykazano, że ekspozycja w zimie była istotniejsza niż w lecie.⁴⁶ Natomiast badanie porównawcze przeprowadzone w Norwegii (szerokość geograficzna północna 66-71°) wykazało, że największe znaczenie miała letnia ekspozycja na słońce między 16 a 20 rokiem życia.⁴⁷ Mniejsze znaczenie zimowej ekspozycji na światło słoneczne w tym badaniu może tłumaczyć fakt, że podczas zimy w Norwegii natężenie promieniowania ultrafioletowego jest tak małe, że w ciągu 4 miesięcy w roku nie jest syntetyzowana witamina D. W Skandynawii w powyższej szerokości geograficznej większa jest także suplementacja witaminy D w diecie.^{47,48} W dwóch badaniach wykazano, że związana z zawodem ekspozycja na światło słoneczne zmniejsza śmiertelność z powodu stwardnienia rozsianego.^{49,50} W badaniu wykorzystującym porównanie rejestrów, gdzie rak skóry był używany jako zastępczy marker osobniczej ekspozycji na

słońce, stwierdzono, że częstość zachorowania na ten nowotwór była znacznie mniejsza u chorych ze stwardnieniem rozsianym w porównaniu z grupą kontrolną (ryzyko względne 0,49 [0,24-0,91]).⁵¹ Ogólnie rzecz biorąc, uzyskano zgodne wyniki w identyfikacji powiązań między różnymi rodzajami ekspozycji na słońce i witaminą D a zachorowaniem na stwardnienie rozsiane lub śmiertelnością z powodu tej choroby.

W odniesieniu do ekspozycji na słońce i witaminy D istotny jest fakt, że nie są one ograniczone tylko do jednego etapu życia. Przeciwnie, w wielu badaniach stwierdza się wpływ tych czynników na SM w różnych okresach życia, od wczesnego dzieciństwa do dorosłości. Niektóre badania sugerują, że dzieciństwo i wiek dojrzewania mogą być szczególnie istotne, w innych natomiast podkreśla się, że równie istotna może być łączna ekspozycja (np. w przypadku raka skóry) lub ekspozycja w wieku dorosłym (np. związana z wykonywanym zawodem).

Oceny wpływu ekspozycji na słońce lub witaminy D w życiu płodowym można dokonać pośrednio przez obserwację zależności od pory roku, w której doszło do narodzin. W dużej zbiorczej analizie urodzeń na półkuli północnej stwierdzono większą częstość (ok. 10%) występowania stwardnienia rozsianego u osób urodzonych wiosną (czyli będących w łonie matki zimą), a nieco mniejszą (ok. 10%) u osób urodzonych jesienią (a więc będących w łonie matki latem).⁵² Wyniki zgodne z powyższymi uzyskano w niedawnym badaniu dotyczącym półkuli południowej (większa częstość wiosną i mniejsza jesienią).⁵³ Co więcej, w najnowszym badaniu zaobserwowano znaczący odwrotny związek między nasileniem promieniowania UV w pierwszym trymestrze ciąży a ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane. Biorąc poprawkę na nasilenie promieniowania UV w otoczeniu w pierwszym trymestrze ciąży, związek z porą roku ulega zasadniczej zmianie, co sugeruje, że głównym czynnikiem sprawczym związanym z okresem urodzin jest ekspozycja na promieniowanie UVR. Stwierdzono, że ekspozycja matki na promieniowanie ultrafioletowe oraz jej stężenie witaminy D w surowicy odgrywają istotną rolę w rozwoju mózgu potomstwa,^{54,55} co może stanowić możliwy mechanizm opisywanych powiązań. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że niedobór witaminy D u matki powoduje nieprawidłowy rozwój mózgu,⁵⁵⁻⁶² zwłaszcza w późniejszych stadiach.⁶⁰ U myszy z niedoborem witaminy D obserwuje się zaburzenia apoptozy⁵⁶ i neurogenezy⁵⁷ w trakcie rozwoju mózgu, których następstwem są zmiany strukturalne. Ponadto stwierdza się zmianą lub zaburzoną ekspresję kilku kluczowych białek w mózgu, w tym związanych z powstawaniem synaps⁵⁸⁻⁶⁰ i neuroprzekazników.^{59,60} Zmiany w ekspresji tych białek obserwuje się również w przebiegu stwardnienia rozsianego i innych chorób neurologicznych, lecz w tych przypadkach może być to raczej następstwem, a nie przyczyną choroby układu nerwowego.

Na podstawie badań epidemiologicznych trudno obecnie określić, czy promieniowanie ultrafioletowe wywiera wpływ jedynie przez metabolizm witaminy D, czy też istnieje inny, niezależny od niego mechanizm. Jest wiele dowodów na immunomodulacyjne działanie zarówno UVR, jak i aktywnego metabolitu witaminy D – 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (1,25(OH)₂D₃).

Wykazano, że 1,25-dihydroksycholekalcyferol hamuje aktywność limfocytów T pomocniczych typu 1,⁶³⁻⁶⁶ równoległe zaś stymuluje aktywność limfocytów T pomocniczych typu 2 i limfocytów T regulatorowych.⁶⁵⁻⁶⁷ Ponadto zmniejsza lub hamuje wytwarzanie przez komórki T_H1 cytokin, m.in. interleukiny 1 (IL-1),⁶⁸⁻⁶⁹ interferonu γ (IFN γ),⁷⁰⁻⁷² i czynnika martwicy nowotworu α (TNF α),^{69,73} jak również cytokiny IL-17.^{69,71,74} Stymuluje on natomiast wytwarzanie przez komórki T_H2 oraz T_{reg} cytokin,^{65,66,70} w tym interleukiny 10 (IL-10)^{71,74-76} i transformującego czynnika wzrostu β (TGF β).^{74,77,78} W zwierzęcym modelu stwardnienia rozsianego doświadczalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu (experimental autoimmune encephalitis, EAE) po podaniu myszom 1,25-dihydroksycholekalcyferolu stwierdzono istotny wpływ na rozwój i przebieg choroby. Podanie 1,25(OH)₂D₃ przed indukcją zapobiegało powstawaniu EAE^{79,80} i wpływało korzystnie na przebieg choroby po podaniu w jej trakcie.⁸⁰⁻⁸²

Badania epidemiologiczne u chorych na stwardnienie rozsiane wskazują, że u osób z większym stężeniem 25(OH)D w surowicy odpowiedź immunologiczna odbywała się raczej przy udziale limfocytów T pomocniczych typu 2 niż 1, a jednocześnie limfocyty T regulatorowe tłumili zależną od limfocytów T pomocniczych 1 proliferację komórek.⁸³ W innej pracy wykazano, że u osób z większym stężeniem 1,25(OH)₂D₃ odsetek limfocytów T regulatorowych był większy niż u chorych z mniejszym stężeniem 1,25(OH)₂D₃.⁸⁴ W najnowszych badaniach stwierdzono jednak, że u chorych na stwardnienie rozsiane nie ma związku między stężeniem 25(OH)D czy 1,25(OH)₂D₃ w surowicy a liczbą lub odsetkiem limfocytów T regulatorowych, aczkolwiek większe stężenie 25(OH)D było związane z nasiloną funkcją tych komórek.⁸⁵ 1,25(OH)₂D₃ hamuje proliferację limfocytów T pomocniczych typu 1 u chorych ze stwardnieniem rozsianym, a także zmniejsza liczbę komórek produkujących IL-6 i IL-17, równoległe stymulując dojrzewanie komórek wytwarzających IL-10 i limfocytów T regulatorowych.⁸⁶

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) ma także działanie immunomodulujące niezależnie od metabolizmu witaminy D.⁸⁷⁻⁸⁹ Na najbardziej podstawowym poziomie zachodząca pod wpływem promieniowania UV apoptoza komórek układu odpornościowego w naskórku⁹⁰ może działać immunosupresyjnie do czasu ich odbudowy. Promieniowanie ultrafioletowe moduluje aktywność kluczowych komórek układu odpornościowego w skórze, czyli komórek Langerhansa, hamując proces prezentacji antygeny⁹¹ i stymulując ich migrację do miejscowych węzłów chłonnych,⁹² w których dochodzi do wybiórczej

aktywacji limfocytów pomocniczych typu 2 oraz limfocytów T regulatorowych.^{93,94} Oprócz bezpośredniego wpływu na przeżycie i aktywację miejscowych komórek układu immunologicznego, wykazano, że promieniowanie ultrafioletowe wpływa na miejscowy i ogólnoustrojowy układ odpornościowy przez udział w produkcji cytokin i innych związków immunologicznie czynnych. Stwierdzono ponadto, że promieniowanie ultrafioletowe pośrednio lub bezpośrednio indukuje wytwarzanie przez keratynocyty niektórych związków o działaniu immunomodulującym, w tym IL-4⁹⁵ i IL-10.⁹⁵⁻⁹⁷

Podsumowując, powyższe dane wskazują, że małe stężenie witaminy D i (lub) mała ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe mogą być istotnymi czynnikami sprzyjającymi rozwojowi stwardnienia rozsianego. Czynniki te wywierają wpływ przez zmianę aktywności układu immunologicznego, zarówno miejscowo, jak i ogólnoustrojowo. Wydaje się, że ich działanie może zachodzić na wszystkich etapach życia. Jest możliwe, że ważny okres małej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe i niskiego stężenia witaminy D jest zróżnicowany osobniczo. Może to zależeć od pojawienia się lub zmiany w zakresie innych czynników w określonym momencie (np. wzrost miana przeciwciał przeciwko EBNA).

Palenie tytoniu

W licznych badaniach, w tym prospektywnych,⁹⁸⁻¹⁰¹ stwierdzono istnienie zależności między paleniem tytoniu a zachorowaniem na SM. Wyniki były na ogół zgodne, w kilku badaniach powiązania tego nie potwierdzono, a w żadnym nie wykazano zależności odwrotnej. Wpływ oddziaływania jest umiarkowany. W metaanalizie 6 badań epidemiologicznych przeprowadzonej w 2007 roku szacunkowy łączny stosunek osób, które paliły w przeszłości, do osób, które nie paliły nigdy, wynosił 1,34 (1,17-1,54).¹⁰² Warto zauważyć, że w trzech badaniach retrospektywnych wskaźnik ten był nieco większy (iloraz szans 1,51 [1,22-1,87]), w porównaniu do trzech badań prospektywnych (1,24 [1,04-1,48]), co sugeruje, że wpływ potencjalnego błędu w badaniach retrospektywnych może zwiększać szansę pozytywnego wyniku. W kilku późniejszych badaniach szacunkowy wskaźnik ryzyka dla osób palących wynosił 1,4-2,18.¹⁰³⁻¹⁰⁷ W jednym z najnowszych badań nie wykazano tego związku w rodzinnych przypadkach stwardnienia rozsianego,¹⁰⁸ jednak przyjęcie jako grupy kontrolnej zdrowego rodzeństwa, o podobnym narażeniu na czynniki środowiskowe i profilu genetycznym, mogło prowadzić do zbyt niskiego podobieństwa grup badanych.

Zależność odpowiedzi od dawki zaobserwowano w odniesieniu do rosnącej liczby wypalanych papierosów,^{98,101,105,109} czasu palenia tytoniu,¹⁰⁵ oraz paczkołat (połączenie liczby wypalanych papierosów i czasu palenia tytoniu),¹⁰⁴ co zwiększa prawdopodobieństwo związku przyczynowego palenia tytoniu i zachorowania na SM. Na przykład w badaniu Nurses' Health Cohorts stwierdzono, że w porównaniu

z osobami nigdy nie palącymi u palących od 1 do 9 paczkołat ryzyko względne wynosiło 1,1 (0,8-1,6), od 10 do 24 paczkołat – 1,5 (1,2-2,1), a u palących powyżej 25 paczkołat – 1,7 (1,2-2,4).⁹⁸ Nie można jednakże wykluczyć, że wpływ palenia tytoniu jest modyfikowany przez inny czynnik. W większości badań uwzględniano lub dopasowywano grupy pod względem takich wskaźników, jak wiek, płeć, miejsce zamieszkania lub status społeczno-ekonomiczny, w kilku brano także pod uwagę takie czynniki ryzyka, jak pochodzenie,^{98,104,110} szerokość geograficzna miejsca zamieszkania⁹⁸ czy markery ekspozycji na wirusa Epstein-Barr.¹⁰⁷ W ostatniej z prac, w której analizowano zbiorcze dane pochodzące z trzech badań, wykazano związek między paleniem tytoniu a mianem przeciwciał w klasie IgG przeciwko EBNA. Stwierdzono, że wpływ palenia tytoniu był wyraźny u osób z wysokim mianem przeciwciał (iloraz szans 1,7 [1,1-2,6]), natomiast związku takiego nie stwierdzono u chorych z niskim mianem (iloraz szans 0,97 [0,7-1,3], test interakcji $p=0,001$).¹⁰⁷ Interakcja ta stanowi przykład związków przyczynowych opisanych powyżej. Wyższe miano przeciwciał ujawnia wpływ palenia tytoniu, czego brakuje u osób z niskim mianem.

Badając wpływ czasu palenia tytoniu wykazano zależność typu dawka-odpowiedź zarówno w odniesieniu do czasu,¹⁰⁵ jak i liczby paczkołat,¹⁰⁴ co sugeruje, że wpływ palenia tytoniu ulega kumulacji z czasem. W niektórych badaniach stwierdzono wpływ czynnego palenia, natomiast nie znaleziono go u osób, które paliły w przeszłości,⁹⁹ w innych pracach z kolei ten ostatni wpływ był znacznie mniejszy.¹⁰⁴ W ostatnim z omawianych badań wykazano interesującą zależność: zwiększone ryzyko rozwoju stwardnienia rozsianego utrzymuje się do 5 lat po zaprzestaniu palenia tytoniu.¹⁰⁴ Tylko w jednej pracy zaobserwowano efekt odwrotny: zwiększone ryzyko u osób palących w przeszłości, w porównaniu z czynnymi palaczami,¹⁰³ aczkolwiek może być to związane ze stosunkowo niewielką liczebnością w grupie osób obecnie niepalących. Palenie bierne związane jest z dwukrotnym wzrostem ryzyka zachorowania w przypadku SM o początku w dzieciństwie (ryzyko względne 2,12 [1,43-3,15]),¹¹¹ co wskazuje, że efekt ten zachodzi także u osób poniżej 16 roku życia. Dodatkowo wpływ ten był większy u osób w wieku powyżej 10 lat (ryzyko względne 2,49 [1,53-4,08]) w porównaniu z grupą młodszą (ryzyko względne 1,47 [0,73-2,96]), co również wskazuje na znaczenie czasu ekspozycji na bierne palenie.¹¹¹ W prospektywnym badaniu klinicznym nie wykazano wpływu palenia przez matkę w czasie ciąży na rozwój stwardnienia rozsianego u potomstwa.¹¹² W badaniu tym jednak nie uwzględniono danych dotyczących palenia tytoniu przez ojca dziecka, co mogłoby być pomocne w ocenie, ponieważ matki palące w ciąży mogą palić także w dalszym okresie życia dziecka.

Mechanizmy biologiczne działania tytoniu nie są jasne, ponieważ zawiera on wiele składników prozapalnych i przeciwzapalnych. Tytoń i dym powstający w wyniku palenia papierosów zawierają ponad 4500 związków i substancji

chemicznych, w tym kilka znanych czynników rakotwórczych i innych środków o działaniu toksycznym.¹¹³ Niektóre z tych substancji mają działanie immunomodulujące, na przykład nikotyna. Działanie immunomodulujące nikotyny dobrze poznano, wykazano jej wpływ na odporność zarówno wrodzoną, jak i nabytą. Stwierdzono, że nikotyna wiąże się z limfocytami typu T i pobudza ich receptory, co w przypadku braku cząstek kostymulujących prowadzi do stanu anergii tych komórek.¹¹⁴ Wykazano, że długotrwałe narażenie na dym tytoniowy może wywierać istotny wpływ na aktywność układu odpornościowego, prowadzić do osłabienia funkcjonowania wrodzonych komórek odpornościowych w drogach oddechowych, a także oddziaływać ogólnoustrojowo, zwiększając liczbę, lecz prowadząc do zahamowania funkcji i reaktywności leukocytów krwi obwodowej oraz obniżając stężenie i skracając czas półtrwania krążących przeciwciał.¹¹³ Ponadto stwierdzono, że dym papierosowy może nasilać działanie cząsteczek sygnałowych apoptozy (Fas) na powierzchni komórek układu odpornościowego, zwiększając tym samym tempo ich eliminacji drogą apoptozy.¹¹⁴

Wykazano również, że dym papierosowy ma działanie antyestrogenowe oraz prozapalne.^{114,115} Zawiera on i indukuje wytwarzanie wolnych rodników,^{114,115} co prowadzi do uszkodzenia tkanek i DNA. Obserwuje się zwiększenie stężenia białka C-reaktywnego i IL-6.¹¹⁴ Ponadto, przy obniżaniu stężenia krążących przeciwciał zwiększa jednocześnie stężenie krążących autoprzeciwciał,^{113,115} zwłaszcza przeciwko ds-DNA.¹¹⁵ Zaobserwowano także, że nikotyna moduluje aktywność immunologiczną komórek, ich różnicowanie i reaktywność na bodźce oraz wpływa na działanie aktywowanych komórek układu odpornościowego, w tym na lizę komórek typu T i wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-2, IL-12, interferon γ , TNF α i białko zapalne makrofagów 1 α .^{116,117} Mimo że nikotyna może powodować stan anergii komórek T, wykazano przeciwny wpływ jej małych dawek na komórki dendrytyczne, przez stymulację ekspresji cząsteczek kostymulujących i zwiększanie wydzielania IL-2, co w konsekwencji pobudza proliferację komórek T i wytwarzanie cytokin prozapalnych.^{117,118}

Podsumowując, ze wszystkich badań wynika, że palenie tytoniu może być w umiarkowanym stopniu czynnikiem ryzyka wystąpienia stwardnienia rozsianego. Ryzyko to rośnie z długością czasu palenia i liczbą wypalanych papierosów. Zwiększone ryzyko wydaje się kumulować w czasie i zmniejszać się po zaprzestaniu palenia.

Zakażenia jako czynnik ochronny

Zakażenia mogą odgrywać rolę ochronną. Bach¹¹⁹ wykazał, że rosnąca częstość występowania chorób autoimmunologicznych i alergicznych, takich jak SM, cukrzyca typu 1, choroba Leśniowskiego-Crohna czy astma zbiegła się w czasie ze zmniejszeniem częstości występowania odry, świnki, gorączki

reumatycznej, zapalenia wątroby typu A i gruźlicy. Obserwacje te mogą być związane z zachorowaniem na choroby zakaźne w dzieciństwie. W przypadku chorób atopowych istnieją dowody potwierdzające tzw. hipotezę higieny, zakładającą, że wzrost higieny i mniejsza liczba osób w rodzinie w ostatnich dziesięcioleciach mogą być powiązane ze zmniejszeniem zachorowań na infekcje w dzieciństwie i zwiększonym ryzykiem zachorowania na choroby atopowe.¹²⁰

Jako marker ryzyka wystąpienia infekcji stosowano strukturę rodzeństwa. W publikacji z 2005 roku wykazano, że większa liczba młodszego rodzeństwa wiązała się z mniejszym ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane. Ryzyko to malało także przy mniejszej różnicy wieku między rodzeństwem.¹²¹ Autorzy połączyli te dwa elementy, obliczając łączną ekspozycję dla młodszego rodzeństwa w wieku do 6 lat, a wynik ten ściśle korelował ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na SM. Jednak kolejne badania przyniosły niespójne wyniki. W badaniu przeprowadzonym w Szwecji wykazano, że posiadanie co najmniej trójki młodszego rodzeństwa czy co najmniej dwójki starszego wiązało się ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane.¹²² Podobne badanie w Danii nie wykazało żadnych różnic.¹²³ Badanie kliniczne z grupą kontrolną nie wykazało powyższych zależności w odniesieniu do młodszego rodzeństwa. Stwierdzono w nim, że w rodzinach z co najmniej czwórką potomstwa bycie najstarszym dzieckiem (odpowiednik posiadania trójki młodszego rodzeństwa, i nieposiadania starszego) wiązało się ze zwiększeniem ryzyka (ryzyko względne 2,1 [1,2-3,5]), natomiast nie wykazano tego w przypadku rodzin z dwojgiem lub trojgiem dzieci (ryzyko względne 0,8 [0,5-1,2]).¹¹ W badaniu tym nie stwierdzono również wpływu kolejności urodzenia oraz wykazano słaby wpływ ochronny w przypadku rosnącej liczby starszego rodzeństwa.¹¹ Podsumowując, badania uwzględniające kolejność narodzin, w których analizuje się liczbę starszego (lecz nie młodszego) rodzeństwa, nie wykazały żadnych zależności.²⁶

Posiadanie młodszego rodzeństwa może stanowić źródło ekspozycji na powtarzające się zakażenia wieku dziecięcego. Co interesujące, autorzy stwierdzili, że posiadanie większej liczby rodzeństwa związane jest z mniejszym ryzykiem zachorowania na mononukleozę zakaźną i obecnością niższego miana przeciwciał w klasie IgG przeciwko wirusowi EBV niż w grupach kontrolnych.¹²¹ Ponadto, posiadanie większej liczby rodzeństwa wiąże się z wyższym mianem przeciwciał w klasie IgG przeciwko wirusowi opryszczki typu 1 (herpes simplex, HSV-1) w porównaniu z grupą kontrolną.¹²⁴ Obecność przeciwciał w klasie IgG przeciwko HSV-1 było związane odwrotnie proporcjonalnie z zachorowaniem na SM,^{124,125} co wykazano także w badaniach dotyczących tej choroby u dzieci.¹²⁵ Jednym z możliwych mechanizmów biologicznych jest to, że posiadanie młodszego rodzeństwa sprzyja powtarzalnemu narażeniu na powszechne w wieku dziecięcym infekcje, takie jak zakażenie wirusem opryszczki (HSV-1), co może chronić przed rozwojem chorób autoimmunologicznych

w późniejszym życiu.^{121,125} Posiadanie młodszego rodzeństwa wydaje się związane z obecnością antygeny HLA-DR15 – wykazano bowiem, że obecność antygeny HLA-DR15 oraz mała liczba rodzeństwa czterokrotnie zwiększa ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane, a więc znacznie więcej niż sama obecność wspomnianego antygeny oraz sama mała liczba rodzeństwa.¹⁸ Interakcję tę obserwowano niezależnie od miana przeciwciał IgG przeciwko EBNA, co wskazuje, że nie może być ona wyjaśniona jedynie przez samo podwyższenie miana przeciwciał przeciwko EBNA. Nie zaobserwowano natomiast analogicznej interakcji między posiadaniem antygeny HLA-DR15 a obecnością przeciwciał w klasie IgG przeciwko wirusowi HSV-1.¹⁸ Opisane wyniki wskazują na możliwość niedostatecznego funkcjonowania układu odpornościowego u osób z haplotypem HLA-DR15, nie tylko w stosunku do wirusa Epsteina-Barr, lecz także wobec innych wirusów wywołujących zakażenia wieku dziecięcego.¹²⁵

Konieczne są dalsze badania dotyczące tego zagadnienia, aczkolwiek wpływ posiadania rodzeństwa był badany u dzieci starszych, w niewielkim stopniu korzystających z opieki; analogiczne badania warto by było przeprowadzić u dzieci młodszych.

Inne czynniki

W kilku badaniach oceniano związek między zakażeniem ludzkim wirusem *Herpes* typu 6 (HHV) a stwardnieniem rozsianym, aczkolwiek wyniki nie były jednoznaczne. W przeglądzie piśmiennictwa z lat 1965-2001, zawierającego 28 prac, w których oceniano surowicę, płyn mózgowo-rdzeniowy i/lub materiał neuropatologiczny pod kątem obecności i miana przeciwciał lub bezpośredniej obecności wirusa HHV-6, nie znaleziono istotnych różnic między grupą zakażoną wirusem a grupą kontrolną, jak również związku między zakażeniem HHV-6 a stwardnieniem rozsianym.¹²⁶ Kolejne badania prowadzono w podobny sposób, porównując grupy chorych na stwardnienie rozsiane i grupy kontrolne pod względem zakażenia wirusem HHV-6 i (lub) jego reaktywacji. Jednak w żadnej pracy nie oceniano próbek pobranych przed wystąpieniem objawów, jak miało to miejsce w przypadku zakażenia wirusem EBV, więc nie można było ustalić związku czasowego.

Wielu naukowców intryguje przewaga kobiet wśród osób z chorobami autoimmunologicznymi. Znaczący wzrost odsetka kobiet w porównaniu do mężczyzn wśród chorych na stwardnienie rozsiane odnotowano w Kanadzie¹²⁷ (wzrost o 1,014 rocznie w latach 1931-1980) i Oslo¹²⁸ (stosunek kobiet do mężczyzn: wzrost z 1,48 do 2,30 od 1910 do 1980 roku). Niedawno wykazano, że w przypadku pierwszego incydentu demielinizacji stosunek kobiet do mężczyzn był znacznie większy w niższej szerokości geograficznej, i wynosił odpowiednio 6,7 w Brisbane (27° szerokości południowej), 3,4 w Newcastle (33°) oraz 2,5 w Geelong (37°) i na Tasmanii (43°).³³ Możliwe, że czynniki środowiskowe, na

przykład ekspozycja na światło słoneczne, różnie wpływają na kobiety i mężczyzn w różnych szerokościach geograficznych. Na przykład mężczyźni częściej przebywają na otwartej przestrzeni niż kobiety,¹²⁹ a różnice między płciami mogą być bardziej zaznaczone w środowisku o większym natężeniu promieniowania UV. Odwrotną zależność pod względem płci w odniesieniu do długości geograficznej zaobserwowano w Australii odnośnie do zachorowań na czerniaka skóry.¹³⁰ W ostatnio opublikowanym przeglądzie przedstawiono wiele różnic między kobietami a mężczyznami, które mogą wpływać na różnice w częstości zachorowania na choroby autoimmunologiczne.¹³¹ Należą do nich na przykład różnice w ekspozycji na czynniki środowiskowe, odpowiedzi biologicznej na działanie czynników środowiskowych (np. odpowiedź na ekspresję genu dla witaminy D u myszy),¹³² globalną aktywność układu immunologicznego (np. liczba limfocytów T, stosunek CD4⁺ do CD8⁺), stężenie hormonów płciowych i ich pośrednie działanie (np. estrogen, progesteron, androgeny, prolaktyna i hormon uwalniający hormon luteinizujący), częstość występowania alleli genów lub ryzyko związane z określonym genotypem (np. HLA-DR15 występuje częściej u kobiet chorych na stwardnienie rozsiane niż u chorych mężczyzn),¹³³ oraz interakcje między na przykład hormonami płciowymi a genami.¹³¹

Rozważano znaczenie wielu innych czynników środowiskowych. Kilka z nich zasługuje na większą uwagę, ponieważ brakuje wystarczających lub jednoznacznych dowodów na ich znaczenie. Do czynników tych można zaliczyć zakażenie *Chlamydia pneumoniae*, rozpuszczalniki organiczne, stres psychiczny, urazy fizyczne i tłuszcze zawarte w diecie.^{5,134} Przeprowadzono wiele badań także nad innymi czynnikami, lecz nie potwierdzono ich związku z zachorowaniem na stwardnienie rozsiane. Wśród nich znalazły się zakażenie wirusem opryszczki typu 1, półpaśca, odry, świnki i różyczki.⁵ W 1998 roku zwrócono uwagę na powiązanie ze szczepieniem przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B.¹³⁵ Związek między szczepieniem a zachorowaniem na stwardnienie rozsiane wykazano w jednym z badań,¹³⁶ lecz nie potwierdzono go w kilku innych.^{27,137-140} Badano także rolę niektórych czynników, mogących zapobiegać rozwojowi stwardnienia rozsianego, takich jak witamina D oraz spożywanie soków owocowych, szczepienie przeciwko tężcowi, stosowanie antybiotyków i leków przeciwhistaminowych oraz podwyższone stężenie kwasu moczowego w surowicy, jednak ich znaczenie nie zostało do końca wyjaśnione.¹³⁴

Łączne działanie czynników ryzyka

Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień, poświęconych łącznemu oddziaływaniu dwóch lub więcej czynników ryzyka. Uważa się, że dwa czynniki wzajemne na siebie działają, jeżeli wpływ pierwszego czynnika na rozwój choroby zależy od obecności drugiego i odwrotnie. W przypadku interakcji

TABELA. PRZYKŁAD ŁĄCZNEGO DZIAŁANIA DWÓCH CZYNNIKÓW PRZYCZYNOWYCH DLA DANEJ CHOROBY W BADANIU KLINICZNYM Z GRUPĄ KONTROLNĄ

Czynnik 1	Czynnik 2	OR	95% PU
Nieobecny	Nieobecny	Referencyjny	1
Obecny	Nieobecny	OR _{F1}	3,7 1,28-6,32
Nieobecny	Obecny	OR _{F2}	6,9 1,83-31,80
Obecny	Obecny	OR _{oba}	34,7 7,83-310,0
	Oczekiwany ilorzaz szans dla interakcji		Odchylenie w stosunku do oczekiwania
Metoda addytywna	3,7 + 6,9 – 1=9,6		34,7 – 9,6=25,07
Metoda multiplikatywna	3,7 × 6,9=25,7		34,7/25,7=1,4

Czynnik 1 to stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych, czynnik 2 to allel czynnika V Leiden, a schorzenie to żylna choroba zakrzepowatozatorowa.

OR_{F1} to ilorzaz szans dla wystąpienia choroby u osób z czynnikiem 1 i bez czynnika 2, OR_{F2} to ilorzaz szans dla wystąpienia choroby u osób z czynnikiem 2 i bez czynnika 1, a OR_{oba} to ilorzaz szans dla wystąpienia choroby u osób z czynnikiem 1 i 2. PU – przedział ufności.

Dane z Vandembroucke JP, Koster T, Briet E, i wsp. Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. Lancet 1994;344(8935):1453-57; zmodyfikowane z Botto LD, Khoury MJ Commentary: facing the challenge of gene-environment interaction: the two-by-four table and Beyond. Am J Epidemiol 2001;153(10)1016-20

gen-środowisko, najwięcej uwagi poświęca się głównemu genetycznemu czynnikowi ryzyka, jakim jest HLA-DR15. Wpływ narażenia na środowiskowy czynnik ryzyka może zależeć od obecności genu *HLA-DR15*. Także wpływ HLA-DR15 może mieć związek z obecnością środowiskowego czynnika ryzyka.

Do badania i oceny wzajemnych interakcji stosuje się dwie metody. Która z nich jest lepsza, stało się ostatnio przedmiotem dyskusji. Najczęściej stosuje się metodę badania interakcji z zastosowaniem skali multiplikatywnej, dodając określenie danego produktu do modelu wykładniczego, na przykład logistycznego lub dwumianowego, a następnie sprawdza się znaczenie współczynnika dodanego produktu. Według tej metody, interakcja jest zaznaczona, jeżeli wzrost ryzyka przy obecności obu czynników jest większy niż przy zsumowaniu ryzyka wynikającego z występowania dwu czynników osobno. Mimo że test ten jest łatwy w stosowaniu, są wątpliwości, czy jest on bardziej użyteczny do badania interakcji niż test z użyciem skali addytywnej. Pominięcie addytywności efektów może oznaczać, że całkowita liczba przypadków związana z występowaniem 2 czynników będzie większa niż suma przypadków wywołwana obecnością każdego z tych czynników osobno (przy braku innych czynników). W modelu przyczynowym Rothmana oznacza to, że dwa czynniki mają ten sam mechanizm przyczynowy, czyli są podobne do siebie jak dwa kawalki tortu.

Metody oceny interakcji z użyciem skali addytywnej są mniej rozwinięte. Obejmują one zastosowanie takich metod, jak względne ryzyko nadmiaru związane z interakcją (relative excess risk due to interaction, RERI), przypisywana proporcja czy wskaźnik synergii. Kilka metod pozwala obliczyć przedziały ufności.^{53,141-143} Istotne jest to, że obecność interakcji

może zależeć od wykorzystanej metodyki (skala addytywna lub multiplikatywna). Dane w tabeli, czyli ocena współdziałania dwóch czynników, przedstawiono więc w taki sposób, że wskaźniki ryzyka oszacowane dla obecności pierwszego czynnika przy braku drugiego oznaczone są jako OR_{F1}, dla sytuacji odwrotnej jako OR_{F2}, a dla łącznego występowania obu czynników jako OR_{oba}. Jako grupę odniesienia uznano brak obu czynników. Przedstawiając tak dane można oceniać interakcje przy użyciu obu skal.

INTERAKCJE MIĘDZY WIRUSEM EBV A HLA-DR15

Zmienność alleli HLA w klasie II może odgrywać istotną rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej u człowieka. Geny HLA klasy II odpowiadają za wytwarzanie cząsteczek, biorących udział w rozpoznawaniu prezentacji antygenów limfocytom T.¹⁴⁴ Cząsteczki klasy II układu HLA znajdują się na powierzchni komórek prezentujących antygen (antigen presenting cells, APC). Cząsteczki te wiążą się z peptydami, a następnie kompleks cząsteczka HLA/peptyd jest prezentowany receptorom T na limfocytach typu T.¹⁴⁴ Receptor T, wiążący niektóre własne antygeny, określan jest jako autoreaktywny receptor T. Różnice genetyczne w klasie I głównego układu zgodności tkankowej (MHC) mogą warunkować różnice w powinowactwie i zdolności pobudzania w kompleksie cząsteczek typu II, peptydu i receptora typu T. Możliwa jest wzajemna interakcja między wirusem EBV a HLA-DR15, ponieważ haplotyp HLA-DR15 wydaje się determinować odpowiedź immunologiczną przeciwko temu wirusowi, zachodzącą z udziałem limfocytów pomocniczych T CD4⁺.¹⁴⁵ W badaniu oceniającym rozpoznawanie przetworzonego epitopu antygeny EBV przez komórki T związane z HLA-DR wykazano, że allele HLA-DR, takie jak DR15, DR4 i DR11

biorą udział w prezentacji antygeny EBV, EBNA1.¹⁴⁶ Częsteczkę układu HLA klasy II odgrywają rolę koreceptora umożliwiającego wnikanie wirusa do limfocytów B,¹⁴⁷ a polimorfizm układu MHC wpływa na zmienność peptydów z nim powiązanych, czego następstwem jest precyzyjne dostrajanie odpowiedzi limfocytów T między ściśle powiązanymi alotypami.¹⁴⁸

Wyniki prac epidemiologicznych, dotyczących interakcji między HLA-DR15 a wirusem EBV, były niejednoznaczne. W badaniu duńskim wykazano związek między mianem przeciwciał w klasie IgG przeciwciała antygenowi kapsydu EBV a obecnością HLA-DRB1 u 517 zdrowych ochotników ($p=0,05$).¹⁴⁹ De Jager i wsp. zaobserwowali, że EBNA i HLA-DR15 wydają się wywierać działanie niezależnie od siebie w sposób addytywny (zagnieżdżone badanie kliniczne z grupą kontrolną w ramach programu Nurses' Health Study/Nurses' Health Study II). Łączne dane, pochodzące z trzech kontrolowanych badań dotyczących stwardnienia rozsianego (badanie kliniczne z grupą kontrolną w ramach programu Nurses' Health Study/Nurses' Health Study II, badania obejmujące chorych ze stwardnieniem rozsianym przeprowadzone na Tasmanii i w Szwecji) oceniane za pomocą skali multiplikatywnej, nie potwierdziły interakcji między HLA-DR15 a EBNA.¹⁰⁷ Wpływ zwiększonego miana przeciwciał IgG przeciwko EBV na rozwój stwardnienia rozsianego był podobny u osób z HLA-DR15 (iloraz szans 2,2 [1,6-3,0]) w porównaniu do osób bez HLA-DR15 (iloraz szans 2,4 [1,3-4,3]) ($p=0,95$ dla interakcji).¹⁰⁷ W szwedzkim badaniu dotyczącym stwardnienia rozsianego (którego wyniki ujęto w łącznych danych), nie zaobserwowano żadnej interakcji między HLA-DR15 a EBNA-1. Gdy jednak zbadano niektóre pojedyncze epitopy EBNA-1,¹⁵¹ okazało się, że obecność krótkiego fragmentu EBNA-1 (aminokwasy 385-420) była znacznie silniejszym czynnikiem rokowniczym rozwoju stwardnienia rozsianego u osób z HLA-DR15 w porównaniu do osób bez HLA-DR15.¹⁵²

W badaniu duńskim wykazano interakcję między mononukleozą zakaźną a HLA-DR15 i ryzykiem rozwoju stwardnienia rozsianego, stwierdzając, że związek między HLA-DR15 a wystąpieniem stwardnienia rozsianego był znacznie wyraźniejszy u osób z mononukleozą zakaźną w wywiadzie (iloraz szans 7,0 [3,3-15,4]), niż u chorych, którzy nie przebyli tej choroby (iloraz szans 2,4 [2,0-3,0]) (iloraz szans dla interakcji multiplikatywnej 2,9 [1,3-6,5]).¹⁵³ Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym przez Canadian Collaborative Study on the Genetic Susceptibility of MS, aczkolwiek te dane powinny być interpretowane z ostrożnością ze względu na niewielką liczbę chorych, którzy przebyli mononukleozę zakaźną oraz wynikający z tego możliwy błąd.¹⁵⁴

INTERAKCJE MIĘDZY EBV A PALENIEM TYTONIU

Tylko w jednym badaniu oceniano bezpośrednią interakcję między zakażeniem EBV a paleniem tytoniu.¹⁰⁷ Wykazano w nim, że ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane,

związane z wysokim mianem przeciwciał IgG przeciwko EBNA było większe u osób, które kiedykolwiek paliły (iloraz szans 3,9 [2,7-5,7]), w porównaniu z osobami, które nie paliły nigdy (iloraz szans 1,8 [1,4-2,3]) ($p=0,001$ dla tej interakcji). Inaczej mówiąc, wpływ palenia jest zaznaczony u osób z wysokim mianem przeciwciał IgG przeciwko EBNA (iloraz szans 1,7 [1,1-2,6]), natomiast nie występuje u osób z niskim mianem przeciwciał IgG przeciwko EBNA (iloraz szans 0,97 [0,7-1,3]).¹⁰⁷ W badaniu duńskim stwierdzono, że miana przeciwciał przeciwko antygenowi kapsydu EBV były większe u palaczy w porównaniu z 517 osobami z grupy zdrowych ochotników.¹⁴⁹ Podobne zjawisko zaobserwowano w grupach kontrolnych w badaniu przeprowadzonym na Tasmanii, natomiast nie występowało ono w badaniu szwedzkim oraz w Nurses' Health Study/Nurses' Health Study II.¹⁰⁷

Mimo że brakuje jednoznacznych dowodów na istnienie możliwych biologicznych mechanizmów takiej interakcji, istnieją pewne podobieństwa w odniesieniu do następstw narażenia na nikotynę a zakażeniem wirusem Epsteina-Barr. Na przykład wykazano, że aktywacja EBV i metabolizm nikotyny mają wspólne szlaki metaboliczne, w tym zachodzące przy udziale kinazy białka c-Jun,^{155,156} MAPK (kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny),^{157,158} PKC (kinazy białkowej C),^{157,159} i NF- κ B (czynnika jądrowego kappa B).¹⁶⁰⁻¹⁶² Ponadto może dochodzić do zmiany funkcji komórek układu immunologicznego w sposób znaczący dla rozwoju stwardnienia rozsianego. Istnieją dowody na istotną rolę limfocytów T CD8⁺²³ w powstawaniu tej choroby. Wiadomo też, że zakażenie wirusem EBV wywołuje silną i trwałą odpowiedź immunologiczną, w której biorą udział swoiste epitopy limfocytów T CD8⁺.¹⁶³ Istnieją także doniesienia o tym, że palenie tytoniu, zwłaszcza nałogowe, może zwiększać liczbę limfocytów T CD8⁺, aczkolwiek nie zostało to w pełni potwierdzone.¹⁶⁴

INTERAKCJE MIĘDZY POSIADANIEM RODZEŃSTWA W WIEKU NIEMOWLĘCYM A HLA-DR15

W pracy przeprowadzonej w Tasmanii autorzy wykazali, że łączny wpływ obecności HLA-DR15 oraz niewielkiej liczby posiadanego rodzeństwa w wieku niemowlęcym na rozwój stwardnienia rozsianego (iloraz szans 7,88 [3,43-18,11]) był prawie czterokrotnie większy niż oczekiwano na podstawie danych dotyczących obecności HLA-DR15 czy posiadania rodzeństwa ocenianych oddzielnie ($p=0,019$ dla tej interakcji) (obecność HLA-DR15, iloraz szans 2,12 [1,00-4,50], mała liczba rodzeństwa w wieku niemowlęcym, iloraz szans 1,06 [0,56-2,01]). Interakcję tę obserwowano niezależnie od miana przeciwciał IgG przeciwko EBNA ($p=0,7$ dla różnicy interakcji).¹⁸ Modyfikacja HLA-DR15 i ryzyko rozwoju stwardnienia rozsianego związane z posiadaniem rodzeństwa w wieku niemowlęcym dostarcza dowodów na poparcie koncepcji mówiącej o tym, że wpływ ochronny posiadania rodzeństwa w wieku niemowlęcym wynika z modulacji układu immunologicznego. Wyniki tych badań wskazują, że niekorzystny wpływ HLA-DR15 na rozwój stwardnienia rozsianego może

ulegać modulacji we wczesnych etapach życia człowieka. Przypuszcza się, że osłabienie wpływu HLA-DR15 przez posiadanie większej liczby rodzeństwa w wieku niemowlęcym, wynika z faktu, że u osób z haplotypem HLA-DR15 obecne są komórki receptorowe CD4⁺, co jest korzystne przy zwiększonym powinowactwie receptorów limfocytów T, będącym następstwem posiadania większej liczby rodzeństwa w wieku niemowlęcym. Przebyta w przeszłości infekcja może zmieniać odpowiedź immunologiczną grasicy,^{144,165} czego następstwem jest zmniejszenie wytwarzania limfocytów T posiadających receptory autoreaktywne.

INTERAKCJA MIĘDZY ZAKAŻENIEM EBV A EKSPOZYCJĄ NA PROMIENIOWANIE UV LUB WITAMINĄ D

Brakuje badań epidemiologicznych, oceniających interakcje między zakażeniem EBV a ekspozycją na promieniowanie UV lub witaminą D, lecz proponowane są pewne mechanizmy tych zależności. Hayes i Donald Acheson¹⁶⁶ sugerowali, że cytokina podobna do IL-10, produkowana przez EBV może zaburzać funkcję limfocytów wytwarzających przeciwzapalną IL-10, a tym samym zmniejszać ochronne działanie promieniowania UV, 25(OH)D₃ i 1,25(OH)₂D₃. Ta indukowana przez wirusa IL-10 może wywołać odpowiedź immunologiczną gospodarza, zdolną do neutralizacji lub zniszczenia IL-10 albo działać w sposób kompetycyjny jako antagonist jej receptora. Holmøy¹⁶⁷ sugeruje, że witamina D może modulować odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko EBV i ta niekorzystna aktywacja autoreaktywnych limfocytów T wywołująca stwardnienie rozsiane jest bardziej prawdopodobna, gdy stężenie witaminy D jest suboptymalne. Holmøy twierdzi także, że receptory dla witaminy D obecne są na powierzchni limfocytów B zakażonych EBV, komórek prezentujących antygen oraz aktywowanych limfocytów, i w ten sposób 1,25(OH)₂D₃ hamuje wytwarzanie i namnażanie limfocytów T oraz powoduje ich przekształcenie w kierunku mniej szkodliwego fenotypu T_H2.

INTERAKCJE MIĘDZY HLA-DR15 A EKSPOZYCJĄ NA PROMIENIOWANIE UV LUB WITAMINĄ D

W niedawnym badaniu przedstawiono dowody na interakcje między HLA-DR15 a witaminą D. Ramagopalan i wsp.¹⁶⁸ zidentyfikowali czynnik związany z odpowiedzią na witaminę D (vitamin D response element, VDRE) w proksymalnym regionie promotora HLA-DR15. VDRE jest obecny głównie w haplotypach HLA-DR15 (w ponad 600 chromosomów nie zidentyfikowano mutacji), lecz nie znaleziono go w innych haplotypach HLA-DRB1, co sugeruje selektywny wpływ mający na celu utrzymanie tego czynnika w haplocybie HLA-DR15. VDRE wykazuje aktywność w stosunku do 1,25(OH)₂D₃ i wpływa na ekspresję genów w komórkach limfocytów B, zakażonych przejściowo fragmentem promotora HLA-DR15. Ochronny zakres VDRE wymaga dalszej oceny w większej liczbie haplotypów, lecz pojawia się interesująca możliwość, że reaktywność witaminy D

wpływa w większym stopniu na rozwój stwardnienia rozsianego u osób z HLA-DR15 niż jakakolwiek inna swoistość antygenowa.

W jednej z prac oceniano interakcje między obecnością HLA-DR15 i miesiącem urodzenia w odniesieniu do zachorowania na stwardnienie rozsiane. W badaniu wzięło udział 4834 chorych na stwardnienie rozsiane i podobna liczba osób w grupie kontrolnej. U chorych na stwardnienie rozsiane urodzonych w kwietniu częściej stwierdzano obecność HLA-DR15 (10,3% HLA-DR15+ vs 7,8% HLA-DR15 urodziło się w kwietniu, $p=0,004$), podczas gdy u chorych urodzonych w listopadzie HLA-DR15 obecny był rzadziej (6,0% HLA-DR-15+ vs 7,9% HLA-DR15- urodziło się z listopadzie, $p=0,023$).¹⁶⁹ Mimo że powyższe dane potwierdzają obserwację, że może zachodzić interakcja między porą roku narodzin a HLA-DR15 u chorych na stwardnienie rozsiane, badacze nie zaobserwowali wpływu miesiąca urodzin na ryzyko zachorowania na stwardnienie rozsiane w całej grupie badanej, a ponadto nie oceniali bezpośredniej interakcji.

INNE INTERAKCJE

W badaniu klinicznym z grupą kontrolną przeprowadzonym w Tasmanii u chorych ze stwardnieniem rozsianym wykazano interakcję między polimorfizmem receptora dla witaminy D (vitamin D receptor, VDR) a ekspozycją na światło słoneczne.¹⁷⁰ Nie stwierdzono jednoznacznych jednowymiarowych związków między polimorfizmem rs11574010 (Cdx-2A>G), rs10735810 (Fok1T>C), lub rs731236 (Taq1C>T) a ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane. Wykazano natomiast istotne powiązanie między ekspozycją na światło podczas zimy w dzieciństwie i obecnością w genotypie rs11574010 a zwiększonym ryzykiem rozwoju stwardnienia rozsianego ($p=0,012$), gdzie allel „G” odpowiada za zwiększone ryzyko wystąpienia tej choroby u osób o krótkim czasie ekspozycji na światło słoneczne (≤ 2 godziny dziennie). Nie stwierdzono istotnych interakcji zarówno dla rs10735810, jak i rs731236 oraz ekspozycji na słońce. W tym samym badaniu wykazano interakcję między allelami genu receptora dla melankortyny 1 (MCR1) odpowiadającymi za rudy kolor włosów (wariant RHC, określane jako posiadający którykolwiek z alleli Arg151Cys, Arg160Trp, lub Asp294His).¹⁷¹ Stwierdzono, że odwrotny związek między zwiększoną ekspozycją na letnie światło słoneczne w wieku od 6 do 10 lat a ryzykiem zachorowania na stwardnienie rozsiane był widoczny u osób bez wariantu RHC ($p=0,005$), nie obserwowano natomiast takiego powiązania u osób z wariantem RHC ($p=0,18$, różnica w efekcie $p=0,008$), a podobne zjawiska zaobserwowano również dla innych metod oceny ekspozycji na słońce.¹⁷¹

ŁĄCZNY WPŁYW CZYNNIKÓW RYZYKA

Liczba badań dotyczących interakcji stale wzrasta. Biorąc pod uwagę dynamiczny rozwój badań dotyczących wpływu genów na podatność na stwardnienie rozsiane, można

spodziewać się zwiększenia zainteresowania związkami między genami a środowiskiem. Dane epidemiologiczne na temat interakcji dostarczają wiedzy o mechanizmach, przez które różne czynniki wywierają na siebie wpływ. Dzięki temu oraz innym dziedzinom badań, uda się być może lepiej poznać tę złożoną chorobę. Dodatkowo wykazanie wspomnianych interakcji może przyczynić się do lepszego wnioskowania przyczynowego. Biorąc pod uwagę, że randomizowane próby kliniczne dotyczące wpływu genów na rozwój SM są często niemożliwe do przeprowadzenia lub niedopuszczalne ze względów etycznych, poszukiwanie związków przyczynowych wymaga innego rodzaju badań. Stąd duże oczekiwania w stosunku do badań zajmujących się interakcjami. Cytowane powyżej doniesienia opisują niektóre z ciekawych interakcji, lecz w przypadku większości z nich konieczne może być ich powtórzenie.

Podsumowanie

Etiologia SM jest złożona. Liczne czynniki odgrywają rolę na różnych etapach życia, oddziałując na siebie wzajemnie, co może doprowadzić do rozwoju choroby. Zastosowanie modelu przyczynowego Rothmana pomaga w zrozumieniu faktu, że sposób, w jaki czynniki te łącznie wywołują chorobę, jest szczególnie i różni się u poszczególnych pacjentów, co przysparza wielu trudności epidemiologom. Definiowanie związków przyczynowych jest tylko częścią całego równania. Wiedza o tym, jak zachodzą interakcje między czynnikami wywołującymi chorobę a czynnikami ochronnymi, może pomóc w rozwiązaniu zagadki – przyglądanie się zachodzącym interakcjom oraz powiązaniom wymaga zebrania precyzyjnych danych oraz dokonania często złożonych analiz. Metodologia oceny wzajemnych oddziaływań nie jest niestety dostatecznie dobrze opracowana (interakcje multiplikatywne *vs* addytywne), co komplikuje ten obszar badań. Jednak omówione powyżej doniesienia otwierają nowe możliwości w badaniach nad stwierdzeniem rozsianym, pozwalając na lepsze zrozumienie związków przyczynowych między czynnikami środowiskowymi, jednostkowymi oraz genetycznymi, wpływającymi na ryzyko zachorowania na SM. Postęp w zakresie wiedzy na temat czynników przyczynowych, wzajemnego ich oddziaływania oraz leżących u ich podstaw mechanizmów może przyczynić się do zmniejszenia ryzyka zachorowania na stwardnienie rozsiane zarówno w całej populacji, jak i w przypadku konkretnych pacjentów, przez takie działania, jak suplementacja witaminy D czy szczepienia przeciwko wirusowi Epsteina-Barr, o ile okaże się to bezpieczne.

Artykuł z *Neurologic Clinics of North America* (Volume 29, Issue 2, May 2011, Pages 233-255, I.A.F. Van der Mei, S. Simpson, J. Stankovich, B.V. Taylor) jest publikowany za zgodą Elsevier Inc., New York, New York, USA.

Tłumaczenie Medical Tribune Polska. Ani autorzy, licencjonodawca, Elsevier Inc., i wydawca, Medical Tribune Polska, nie gwarantują ani nie odnoszą się do jakości i wartości reklamowanych produktów i usług, ani stanowiska reprezentowanego przez reklamodawców.

PIŚMIENNICTWO

- Rothman KJ, Greenland S. Causation and causal inference in epidemiology. *Am J Public Health* 2005;95(Suppl 1):S144-50.
- Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med* 1965;58:295-300.
- Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):75-82.
- Haahr S, Hollsberg P. Multiple sclerosis is linked to Epstein-Barr virus infection. *Rev Med Virol* 2006;16(5):297-310.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61(4):288-99.
- Ascherio A, Munch M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 2000;11(2):220-4.
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 2006;59(3):499-503.
- Zaadstra BM, Chorus AM, van Buuren S, et al. Selective association of multiple sclerosis with infectious mononucleosis. *Mult Scler* 2008;14(3):307-13.
- Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, et al. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007;64(1):72-5.
- Ramagopalan SV, Valdar W, Dyment DA, et al. Association of infectious mononucleosis with multiple sclerosis. A population-based study. *Neuroepidemiology* 2009;32(4):257-62.
- Hernan MA, Zhang SM, Lipworth L, et al. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology* 2001;12(3):301-6.
- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001;286(24):3083-8.
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA* 2003;289(12):1533-6.
- DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* 2006;63(6):839-44.
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, et al. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005;293(20):2496-500.
- Sundstrom P, Juto P, Wadell G, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;62(12):2277-82.
- Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, et al. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):239-44.
- van der Mei IA, Ponsonby AL, Taylor BV, et al. Human leukocyte antigen-DR15, low infant sibling exposure and multiple sclerosis: gene-environment interaction. *Ann Neurol* 2010;67(2):261-5.
- Pohl D, Krone B, Rostasy K, et al. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology* 2006;67(11):2063-5.
- Banwell B, Krupp L, Kennedy J, et al. Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 2007;6(9):773-81.
- Hollisberg P, Hansen HJ, Haahr S. Altered CD81 T cell responses to selected Epstein-Barr virus immunodominant epitopes in patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2003;132(1):137-43.
- Lunemann JD, Edwards N, Muraro PA, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* 2006;129(Pt 6):1493-506.
- Cepok S, Zhou D, Srivastava R, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005;115(5):1352-60.
- Lunemann JD, Jelcic I, Roberts S, et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN γ and IL-2. *J Exp Med* 2008;205(8):1763-73.
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204(12):2899-912.
- Willis SN, Stadelmann C, Rodig SJ, et al. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 2009;132(Pt 12):3318-28.
- Sargsyan SA, Shearer AJ, Ritchie AM, et al. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74(14):1127-35.
- Pender MP. Preventing and curing multiple sclerosis by controlling Epstein-Barr virus infection. *Autoimmun Rev* 2009;8(7):563-8.

29. McLeod JG, Hammond SR, Hallpike JF. Epidemiology of multiple sclerosis in Australia. With NSW and SA survey results. *Med J Aust* 1994;160(3):117–22.
30. Kurtzke JF. Geography in multiple sclerosis. *J Neurol* 1977;215(1):1–26.
31. Zivadinov R, Iona L, Monti-Bragadin L, et al. The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A metaanalysis study. *Neuroepidemiology* 2003;22(1):65–74.
32. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 2008;71(2):129–35.
33. Taylor BV, Lucas RM, Dear K, et al. Latitudinal variation in incidence and type of first central nervous system demyelinating events. *Mult Scler* 2010;16(4):398–405.
34. McGuigan C, Dunne C, Crowley J, et al. Population frequency of HLA haplotypes contributes to the prevalence difference of multiple sclerosis in Ireland. *J Neurol* 2005;252(10):1245–8.
35. Handel AE, Handunnethi L, Giovannoni G, et al. Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 2010;17(9):1210–4.
36. McCall MG, Brereton TL, Dawson A, et al. Frequency of multiple sclerosis in three Australian cities—Perth, Newcastle, and Hobart. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968;31(1):1–9.
37. Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain* 1988;111(Pt 1):1–25.
38. Skegg DC, Corwin PA, Craven RS, et al. Occurrence of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50(2):134–9.
39. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol* 1966;15(3):234–7.
40. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 2000;123(Pt 5):968–74.
41. Dean G, Elian M. Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63(5):565–8.
42. Acheson ED, Bachrach CA, Wright FM. Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1960;35(147):132–47.
43. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296(23):2832–8.
44. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62(1):60–5.
45. Islam T, Gauderman WJ, Cozen W, et al. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* 2007;69(4):381–8.
46. van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, et al. Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ* 2003;327(7410):316.
47. Kampman MT, Wilsgaard T, Mellgren SI. Outdoor activities and diet in childhood and adolescence relate to MS risk above the Arctic Circle. *J Neurol* 2007;254(4):471–7.
48. Brustad M, Alsaker E, Engelsen O, et al. Vitamin D status of middle-aged women at 65–71 degrees N in relation to dietary intake and exposure to ultraviolet radiation. *Public Health Nutr* 2004;7(2):327–35.
49. Freedman DM, Dosemeci M, Alavanja MC. Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case-control study based on death certificates. *Occup Environ Med* 2000;57(6):418–21.
50. Westberg M, Feychting M, Jonsson F, et al. Occupational exposure to UV light and mortality from multiple sclerosis. *Am J Ind Med* 2009;52(5):353–7.
51. Goldacre MJ, Seagroatt V, Yeates D, et al. Skin cancer in people with multiple sclerosis: a record linkage study. *J Epidemiol Community Health* 2004;58(2):142–4.
52. Willer CJ, Dymant DA, Sadovnick AD, et al. Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study. *BMJ* 2005;330(7483):120.
53. Staples J, Ponsonby AL, Lim L, et al. Low maternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis. *BMJ* 2010;340:c1640.
54. Levenson CW, Figueiroa SM. Gestational vitamin D deficiency: long-term effects on the brain. *Nutr Rev* 2008;66(12):726–9.
55. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, et al. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2010;6(3):156–66.
56. Ko P, Burkert R, McGrath J, et al. Maternal vitamin D3 deprivation and the regulation of apoptosis and cell cycle during rat brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 2004;153(1):61–8.
57. Cui X, McGrath JJ, Burne TH, et al. Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *Int J Dev Neurosci* 2007;25(4):227–32.
58. Eyles D, Brown J, Mackay-Sim A, et al. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience* 2003;118(3):641–53.
59. Feron F, Burne TH, Brown J, et al. Developmental vitamin D3 deficiency alters the adult rat brain. *Brain Res Bull* 2005;65(2):141–8.
60. Almeras L, Eyles D, Benech P, et al. Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders. *Proteomics* 2007;7(5):769–80.
61. Eyles DW, Feron F, Cui X, et al. Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(Suppl 1):S247–57.
62. O'Loan J, Eyles DW, Kesby J, et al. Vitamin D deficiency during various stages of pregnancy in the rat; its impact on development and behaviour in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(3):227–34.
63. Tsoukas CD, Provvedini DM, Manolagas SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984;224(4656):1438–40.
64. Bhalla AK, Amento EP, Krane SM. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. *Cell Immunol* 1986;98(2):311–22.
65. Lemire J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3—a hormone with immunomodulatory properties. *Z Rheumatol* 2000;59(Suppl 1):24–7.
66. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53(1–6):599–602.
67. Meehan MA, Kerman RH, Lemire JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the generation of nonspecific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in a human MLR. *Cell Immunol* 1992;140(2):400–9.
68. Tsoukas CD, Watry D, Escobar SS, et al. Inhibition of interleukin-1 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69(1):127–33.
69. Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 2009;182(8):4624–32.
70. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(1) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167(9):4974–80.
71. Jeffery LE, Burke F, Mura M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183(9):5458–67.
72. Baeke F, Korf H, Overbergh L, et al. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1/2):221–7.
73. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, et al. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77(1):47–57.
74. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, et al. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(1):23–33.
75. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000;164(5):2405–11.
76. Heine G, Niesner U, Chang HD, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol* 2008;38(8):2210–8.
77. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J Immunol* 1998;160(11):5314–9.
78. Garcion E, Sindji L, Nataf S, et al. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2003;105(5):438–48.
79. Lemire JM, Archer DC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991;87(3):1103–7.
80. Cantorna MT, Archer CE, DeLuca HF. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(15):7861–4.

81. Garcion E, Nataf S, Berod A, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;45(2): 255–67.
82. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res* 2007;85(11):2480–90.
83. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2009;4(8):e6635.
84. Royal W 3rd, Mia Y, Li H, et al. Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;213(1/2):135–41.
85. Smolders J, Menheere P, Thewissen M, et al. Regulatory T cell function correlates with serum 25-hydroxyvitamin D, but not with 1,25-dihydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcium levels in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1/2):243–6.
86. Correale J, Ysraelit MC, Gaitan MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009;132(Pt 5):1146–60.
87. Garssen J, van Loveren H. Effects of ultraviolet exposure on the immune system. *Crit Rev Immunol* 2001;21(4):359–97.
88. Murphy GM. Ultraviolet radiation and immunosuppression. *Br J Dermatol* 2009; 161(Suppl 3):90–5.
89. Schwarz T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J Med* 2005; 54(4):165–71.
90. Kulms D, Zeise E, Poppelmann B, et al. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 2002;21(38):5844–51.
91. Weiss JM, Renkl AC, Denfeld RW, et al. Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur J Immunol* 1995;25(10):2858–62.
92. Dandie GW, Clydesdale GJ, Jacobs I, et al. Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells. *Mutat Res* 1998;422(1):147–54.
93. Simon JC, Cruz PD Jr, Bergstresser PR, et al. Low dose ultraviolet B-irradiated Langerhans cells preferentially activate CD41 cells of the T helper 2 subset. *J Immunol* 1990;145(7):2087–91.
94. Simon JC, Hara H, Denfeld RW, et al. UVB-irradiated dendritic cells induce nonproliferating, regulatory type T cells. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15(5):330–4.
95. Shreedhar V, Giese T, Sung VW, et al. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* 1998;160(8):3783–9.
96. Nishigori C, Yarosh DB, Ullrich SE, et al. Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(19):10354–9.
97. Rivas JM, Ullrich SE. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 1992;149(12):3865–71.
98. Hernan MA, Oleky MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 2001;154(1):69–74.
99. Hernan MA, Jick SS, Logroscino G, et al. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 2005;128(Pt 6):1461–5.
100. Thorogood M, Hannaford PC. The influence of oral contraceptives on the risk of multiple sclerosis. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(12):1296–9.
101. Villard-Mackintosh L, Vessey MP. Oral contraceptives and reproductive factors in multiple sclerosis incidence. *Contraception* 1993;47(2):161–8.
102. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler* 2007;13(5):610–5.
103. Rodriguez Regal A, del Campo Amigo M, Paz-Esquete J, et al. A case-control study of the influence of the smoking behaviour in multiple sclerosis. *Neurologia* 2009;24(3):177–80 [in Spanish].
104. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, et al. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology* 2009;73(9): 696–701.
105. Pekmezovic T, Drulovic J, Milenkovic M, et al. Lifestyle factors and multiple sclerosis: a case-control study in Belgrade. *Neuroepidemiology* 2006;27(4): 212–6.
106. Silva KR, Alvarenga RM, Fernandez YFO, et al. Potential risk factors for multiple sclerosis in Rio de Janeiro: a case-control study. *Arq Neuropsiquiatr* 2009; 67(2A):229–34.
107. Simon KC, van der Mei IA, Munger KL, et al. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology* 2010;74(17):1365–71.
108. Jafari N, Hoppenbrouwers IA, Hop WC, et al. Cigarette smoking and risk of MS in multiplex families. *Mult Scler* 2009;15(11):1363–7.
109. Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, et al. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(6):715–22.
110. Warren SA, Warren KG, Greenhill S, et al. How multiple sclerosis is related to animal illness, stress and diabetes. *Can Med Assoc J* 1982;126(4): 377–82, 385.
111. Mikaeloff Y, Caridade G, Tardieu M, et al. Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children. *Brain* 2007;130 (Pt 10):2589–95.
112. Montgomery SM, Bahmanyar S, Hillert J, et al. Maternal smoking during pregnancy and multiple sclerosis amongst offspring. *Eur J Neurol* 2008;15(12):1395–9.
113. Soperi M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):372–7.
114. Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, et al. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(6):715–22.
115. Costenbader KH, Karlson EW. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* 2006;15(11):737–45.
116. Harel-Meir M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Tobacco smoking and autoimmune rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3(12):707–15.
117. Gahring LC, Rogers SW. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *AAPS J* 2005;7(4):E885–94.
118. Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* 2003;107(4):604–11.
119. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911–20.
120. Leeder SR, Corkhill R, Irwig LM, et al. Influence of family factors on the incidence of lower respiratory illness during the first year of life. *Br J Prev Soc Med* 1976;30(4):203–12.
121. Ponsonby AL, van der Mei I, Dwyer T, et al. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2005;293(4):463–9.
122. Montgomery SM, Lambe M, Olsson T, et al. Parental age, family size, and risk of multiple sclerosis. *Epidemiology* 2004;15(6):717–23.
123. Bager P, Nielsen NM, Bihmann K, et al. Sibship characteristics and risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study in Denmark. *Am J Epidemiol* 2006;163(12):1112–7.
124. Ponsonby AL, Dwyer T, van der Mei I, et al. Asthma onset prior to multiple sclerosis and the contribution of sibling exposure in early life. *Clin Exp Immunol* 2006;146(3):463–70.
125. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, et al. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 2004;291(15):1875–9.
126. Moore FG, Wolfson C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002;106(2):63–83.
127. Orton SM, Herrera BM, Yee LM, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 2006;5(11):932–6.
128. Celius EG, Smedstad C. Change in sex ratio, disease course and age at diagnosis in Oslo MS patients through seven decades. *Acta Neurol Scand Suppl* 2009;189:27–9.
129. Fritschi L, Green A, Solomon PJ. Sun exposure in Australian adolescents. *J Am Acad Dermatol* 1992;27(1):25–8.
130. Jones ME, Shugg D, Dwyer T, et al. Interstate differences in incidence and mortality from melanoma. A re-examination of the latitudinal gradient. *Med J Aust* 1992;157(6):373–8.
131. McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med* 2009;9(9):1058–79.
132. Song Y, Fleet JC. 1,25 Dihydroxycholecalciferol-mediated calcium absorption and gene expression are higher in female than in male mice. *J Nutr* 2004; 134(8):1857–61.
133. Celius EG, Harbo HF, Egeland T, et al. Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000;178(2):132–5.
134. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 2007;61(6):504–13.
135. Marshall E. A shadow falls on hepatitis B vaccination effort. *Science* 1998; 281(5377):630–1.

136. Hernan MA, Jick SS, Olek MJ, et al. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;63(5): 838–42.
137. Touze E, Fourrier A, Rue-Fenouche C, et al. Hepatitis B vaccination and first central nervous system demyelinating event: a case-control study. *Neuroepidemiology* 2002;21(4):180–6. Environmental Factors and Risk of MS 253–138. Zipp F, Weil JG, Einhaupl KM. No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination. *Nat Med* 1999;5(9):964–5.
139. DeStefano F, Verstraeten T, Jackson LA, et al. Vaccinations and risk of central nervous system demyelinating diseases in adults. *Arch Neurol* 2003;60(4):504–9.
140. Sadovnick AD, Scheifele DW. School-based hepatitis B vaccination programme and adolescent multiple sclerosis. *Lancet* 2000;355(9203):549–50.
141. Hosmer DW, Lemeshow S. Confidence interval estimation of interaction. *Epidemiology* 1992;3(5):452–6.
142. Zou GY. On the estimation of additive interaction by use of the four-by-two table and beyond. *Am J Epidemiol* 2008;168(2):212–24.
143. Richardson DB, Kaufman JS. Estimation of the relative excess risk due to interaction and associated confidence bounds. *Am J Epidemiol* 2009;169(6):756–60.
144. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(10): 702–9.
145. Lunemann JD, Kamradt T, Martin R, et al. Epstein-Barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J Virol* 2007;81(13):6777–84.
146. Kruger S, Schroers R, Rooney CM, et al. Identification of a naturally processed HLA-DR-restricted T-helper epitope in Epstein-Barr virus nuclear antigen type 1. *J Immunother* 2003;26(3):212–21.
147. Haan KM, Longnecker R. Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(16):9252–7.
148. Archbold JK, Macdonald WA, Gras S, et al. Natural micropolymorphism in human leukocyte antigens provides a basis for genetic control of antigen recognition. *J Exp Med* 2009;206(1):209–19.
149. Nielsen TR, Pedersen M, Rostgaard K, et al. Correlations between Epstein-Barr virus antibody levels and risk factors for multiple sclerosis in healthy individuals. *Mult Scler* 2007;13(3):420–3.
150. De Jager PL, Simon KC, Munger KL, et al. Integrating risk factors: HLA-DRB1*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;70(13 Pt 2):1113–8.
151. Sundstrom P, Nystrom L, Jidell E, et al. EBNA-1 reactivity and HLA DRB1*1501 as statistically independent risk factors for multiple sclerosis: a case-control study. *Mult Scler* 2008;14(8):1120–2.
152. Sundstrom P, Nystrom M, Ruuth K, et al. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;215(1/2):102–7.
153. Nielsen T, Rostgaard K, Askling J, et al. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15(4):431–6.
154. Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC, et al. Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16(1):127–8.
155. Eliopoulos AG, Young LS. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 1998;16(13):1731–42.
156. Hoshino S, Yoshida M, Inoue K, et al. Cigarette smoke extract induces endothelial cell injury via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(1):58–63.
157. Heusch WL, Maneckjee R. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* 1998;19(4):551–6.
158. Satoh T, Hoshikawa Y, Satoh Y, et al. The interaction of mitogen-activated protein kinases to Epstein-Barr virus activation in Akata cells. *Virus Genes* 1999;18(1): 57–64.
159. Baumann M, Mischak H, Dammeier S, et al. Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* 1998;72(10):8105–14.
160. Shen Y, Rattan V, Sultana C, et al. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 2):H1624–33.
161. Zhang S, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001;154(2):277–83.
162. Adamson AL, Kenney S. The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J Virol* 1999;73(8):6551–8.
163. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al, editors. *Fields virology*, vol. 2. 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2655–700.
164. Arcavi L, Benowitz NL. Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med* 2004;164(20):2206–16.
165. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, et al. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005;435(7042): 590–7.
166. Hayes CE, Donald Acheson E. A unifying multiple sclerosis etiology linking virus infection, sunlight, and vitamin D, through viral interleukin-10. *Med Hypotheses* 2008;71(1):85–90.
167. Holmøy T. Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 2008;70(1):66–9.
168. Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, et al. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009;5(2):e1000369.
169. Ramagopalan SV, Link J, Byrnes JK, et al. HLA-DRB1 and month of birth in multiple sclerosis. *Neurology* 2009;73(24):2107–11.
170. Dickinson JL, Perera DI, van der Mei AF, et al. Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 Vitamin D receptor variant in this interaction. *Mult Scler* 2009;15(5):563–70.
171. Dwyer T, van der Mei I, Ponsonby AL, et al. Melanocortin 1 receptor genotype, past environmental sun exposure, and risk of multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71(8):583–9.