



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรควงช้าง

โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ด.ร. กัญญา ศุภปีติพร และคณะ

เดือน พฤศจิกายน ปี 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรควงช้าง

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. พญ. ด.ร. กัญญา ศุภปีติพร

2. ศาสตราจารย์นายแพทย์วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

สังกัด

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อภาษาไทย

โรควงช้าง หรือ frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) เป็นความพิการแต่กำเนิดบนใบหน้าและกะโหลกศีรษะที่พบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่งในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบได้น้อยมากในประเทศทางยุโรปตะวันตก เกิดจากการยื่นของบางส่วนของเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมองผ่านทางรูรั่วของกะโหลกศีรษะส่วนหน้า ซึ่งอยู่ตรงรอยต่อระหว่างกระดูก frontal และกระดูก ethmoid สาเหตุเชื่อว่าทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีส่วนเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามปัจจัยเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โครงการนี้มีจุดมุ่งหมายจะศึกษาถึงปัจจัยเสี่ยงทางด้านพันธุกรรมที่อาจทำให้บุคคลหนึ่งมีโอกาสเป็นโรคนี้สูงขึ้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญให้กับบิดามารดา ผู้ที่มีความผิดปกติและแพทย์ ในการตัดสินใจด้านการเจริญพันธุ์ รวมทั้งอาจนำไปสู่การป้องกันโรคได้ในที่สุด นอกจากนี้ การวิจัยสำหรับโครงการนี้จะครอบคลุมถึงการค้นหายีนหรือกลุ่มของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้าง การศึกษาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้าง กลุ่มผู้วิจัยได้รวบรวมผู้ป่วยโรควงช้างจำนวน 160 ราย เก็บรวบรวมข้อมูล ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้าง พบว่า พี่น้องของผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้างเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงการมีปัจจัยทางครอบครัว (familial aggregation) อาจจะเป็นไปได้ว่ามีการร่วมกันของปัจจัยบางอย่าง ไม่ว่าจะเป็นยีนและ/หรือสิ่งแวดล้อม ผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมดในการศึกษานี้มีเชื้อชาติไทย การศึกษาโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากสำมะโนประชากรและข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ พบว่า อายุมารดาที่มาก (advanced maternal age) และระยะห่างของการมีบุตรที่ยาวนาน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้าง จากผลการศึกษา นี้ บ่งบอกว่าโรควงช้าง เกิดจากทั้งปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม ได้แก่ บุคคลที่มีเชื้อชาติไทย ประวัติการมีบุตรที่เป็นโรควงช้างในครอบครัว เป็นต้น

ผลการศึกษานำร่องเพื่อค้นหายีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้างโดยวิธี array-based comparative genomic hybridization (array CGH) พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของ DNA (DNA copy number) ในลักษณะ deletions ในยีนที่สำคัญ 2 ยีน ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Abstract

Frontoethmoidal meningoencephalocele (FEEM) has a unique geographical distribution. It is much more common in Southeast Asia, with an approximate prevalence of 1 in 6000, than in western countries. It is characterized by a congenital bone defect of the anterior cranium between the frontal and ethmoidal bones with herniation of meninges and brain tissues through the defect. It has been considered a type of neural tube defect (NTD) with the main pathological changes found internally at the foramen cecum and externally at the frontonasal-orbital region. It has been hypothesized that both genetic and environmental factors may play a role. However, there is no strong evidence supporting this hypothesis. Our aim of this study is to identify the genetic components predisposing individuals to FEEM. The result of this study will eventually lead to an understanding of the pathogenesis of the disease. In addition, it will provide important information for genetic counseling as well as disease prevention. Data obtained from 160 cases of FEEM were analyzed and compared with data from 149 non-syndromic cleft lip (CL) and general population (GP). We found familial aggregation reflected by an increased risk to siblings. All of the FEEM cases were of Thai nationality and came from low socioeconomic status. Seven FEEM cases had amniotic rupture sequences. Compared with oral clefts, advanced maternal age was found to be associated with FEEM. In addition, the interpregnancy interval between the FEEM cases and their previous siblings was significantly longer than that of the oral cleft patients and unaffected sibs.

A pilot study in order to identify the candidate genes for FEEM by an array-based comparative genomic hybridization (array CGH) was also performed. There were two possible candidate genes. Further analysis of their significance in causing FEEM is required.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การค้นหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรควงช้าง
(ภาษาอังกฤษ) Identification of the genetic susceptibility to
frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM)
2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
แพทย์หญิงกัญญา ศุภปิติพร
ภาควิชา กุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4989 โทรสาร 02-256-4911
e-mail: kanya.su@chula.ac.th
3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย ชีวโมเลกุลเกี่ยวกับการแพทย์
4. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี
5. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ความพิการแต่กำเนิดเป็นความผิดปกติที่ส่งผลกระทบต่อทั้งทางร่างกายและจิตใจอย่างมากมายทั้งต่อผู้ป่วย ครอบครัว สังคม และประเทศชาติ การที่เราสามารถค้นหาสาเหตุของความพิการแต่กำเนิดชนิดนั้นๆ อาจนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเกิดโรค ซึ่งช่วยในการพัฒนาแนวทางการรักษาที่ถูกต้อง และที่สำคัญช่วยในการหาหนทางป้องกันโรคนั้นๆได้ ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา ด้วยความรู้และทักษะทางด้านพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุลที่ได้รับการพัฒนาไปอย่างมากมายและต่อเนื่อง สาเหตุที่ทำให้เกิดความพิการแต่กำเนิดบางอย่างที่มีหลักฐานสนับสนุนว่าปัจจัยทางพันธุกรรมน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องได้รับการถูกค้นพบ แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีความพิการแต่กำเนิดบางชนิดที่สาเหตุยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีววิทยาโมเลกุลในปัจจุบันพร้อมทั้งเทคนิคใหม่ๆทางพันธุศาสตร์ที่เริ่มมีการนำมาใช้อาจจะนำไปสู่การค้นพบยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้ในที่สุด

โรควงช้าง หรือ frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) เป็นความพิการบนใบหน้าและกะโหลกศีรษะที่เป็นแต่กำเนิด เกิดจากการยื่นของบางส่วนของเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมองผ่านทางรูเปิดที่ผิดปกติแต่กำเนิดของกะโหลกศีรษะส่วนหน้า ซึ่งอยู่รอยต่อระหว่างกระดูก frontal และกระดูก ethmoid กลายเป็นก้อนที่ใบหน้า ความผิดปกตินี้อาจอยู่ในกลุ่มของ neural tube defect โรควงช้างพบบ่อยที่สุดในกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไทย พม่า กัมพูชา อินโดนีเซีย และมาเลเซีย นอกจากนี้ยังมี รัสเซีย บางพื้นที่ของอินเดีย แอฟริกากลาง ฟิจิ ในขณะที่ประเทศแถบ

ยุโรปตะวันตก สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฮองกง อินเดียทางตอนใต้และออสเตรเลียพบอุบัติการณ์ของโรคนี้น้อยกว่ามาก ในแถบบ้านเรา ความชุกของโรคพบประมาณ ๑ ต่อ ๓, ๕๐๐ ถึง ๖,๐๐๐ เด็กเกิดมีชีวิตต่อไป

ในผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้าง อาจพบก้อนเนื้อได้หนึ่งหรือหลายก้อน ในหลายๆ ตำแหน่งบนใบหน้า ตั้งแต่ส่วนกลางของหน้าผากจนถึงบริเวณโคนจมูก ภาวะแทรกซ้อนสำคัญในผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างที่พบได้บ่อย และเป็นสาเหตุของความทุกข์ทรมานและการสูญเสียชีวิต ได้แก่

1. ความผิดปกติของเนื้อสมอง (brain malformation) อาทิเช่น
 - ศีรษะเล็ก (microcephaly)
 - สติปัญญาช้า (mental retardation)
2. ภาวะที่มีน้ำคั่งในสมอง (hydrocephalus)
3. ชัก (epilepsy)
4. ความผิดปกติของตา (associated anomaly of the eyes) อาทิเช่น ตาเล็ก (microphthalmia)
5. ภาวะที่สมองยื่นออกมาข้างนอก (exposure of the brain and hemorrhage)
6. Rupture of encephalomeningocoele and leakage of CSF and meningitis
7. Facial deformity

จากการศึกษาลักษณะทางคลินิก การตรวจทางรังสีวิทยา และทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดรักษาผู้ป่วย ได้มีผู้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรคไว้อย่างน่าสนใจ โรควงช้างอาจเกิดจากการที่ neural ectoderm และ surface ectoderm ไม่สามารถแยกออกจากกันที่ตำแหน่งจุดปิดสุดท้ายของหลอดประสาทส่วนหน้า (rostral neuropore) จากการที่เนื้อเยื่อทั้งสองส่วนนี้ยังเชื่อมติดกันอยู่ ส่งผลให้เนื้อเยื่อส่วน mesoderm ไม่สามารถเจริญเข้าไปแทรกตรงจุดนั้นได้ ทำให้เกิดรูรั่วของกะโหลกศีรษะส่วนหน้า ส่วนกลไกที่ทำให้เกิดการแยกระหว่าง neural ectoderm และ surface ectoderm เกิดจากขบวนการ apoptosis ดังนั้นเป็นไปได้ว่า การเกิด apoptosis ที่ไม่สมบูรณ์ อาจจะเป็นกลไกอันหนึ่งของการเกิดโรควงช้าง

เนื่องจากโรควงช้างเป็นความพิการบนใบหน้าและกะโหลกศีรษะที่เป็นแต่กำเนิด ที่ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจอย่างมาก นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อครอบครัวและสังคมอีกด้วย มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สาเหตุของโรคที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ทำให้ไม่สามารถหาวิธีป้องกันโรคนี้ได้ จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมอาจเป็นสาเหตุหลักประการหนึ่งของการเกิดโรควงช้าง เป็นไปได้ว่าผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างอาจเกิดจากยีนซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงขึ้น (genetic susceptibility) ถึงแม้ว่าการศึกษาทางโครโมโซมแบบดั้งเดิมไม่พบความผิดปกติ การศึกษาพงศาวลีผู้ป่วยอย่างละเอียด การนำเทคนิคใหม่ทาง

ชีวโมเลกุลซึ่งได้ถูกนำมาใช้ในปัจจุบันมากขึ้นเรื่อยๆ เช่น array-based comparative genomic hybridization (array CGH) อาจจะช่วยในการค้นพบปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรควงช้าง

6. วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมของโรควงช้าง

7. ระเบียบวิธีวิจัย

8.1. กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

ผู้ป่วยโรควงช้างที่มารับการดูแลรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์อย่างน้อย 100 คน และบุคคลในครอบครัวที่ไม่เป็นโรควงช้าง

8.2. Consent

ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย (an informed consent) จะต้องได้รับจากผู้ป่วยหรือผู้ปกครองก่อนที่จะเริ่มทำการวิจัย และโครงการจะได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.3. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรควงช้างและสมาชิกอื่นในครอบครัว 100 ครอบครัว ในช่วงที่ประเมินผู้ป่วยก่อนทำการผ่าตัดรักษา

8.4. การสกัด DNA

สารพันธุกรรม (genomic DNA) จะถูกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

8.5. การวิเคราะห์พงศาวลี

วิเคราะห์พงศาวลีของผู้ป่วยเพื่อหาปัจจัยเสี่ยงและแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม

8.6. Array-based comparative genomic hybridization (array CGH) analysis

High-resolution genome-wide screening by array CGH เป็นเทคนิคใหม่ทางพันธุศาสตร์ ที่มีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้หาตำแหน่งของยีนหรือกลุ่มของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ซึ่งนำไปสู่การค้นพบยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้ในที่สุด เทคนิคใหม่นี้ได้รับการพัฒนาเพิ่มขึ้นมาจาก comparative genomic hybridization แบบดั้งเดิม ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถบอกการเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซมโดยการเปรียบเทียบ hybridization intensity ระหว่าง DNA ของผู้ป่วย และของผู้ที่ปกติซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (control) DNA ของผู้ป่วย และ ของผู้ที่ปกติ จะถูก label ด้วยสารเรืองแสงที่ต่างสีกัน หลังจากนั้นจะถูกนำมาผสมกันและ hybridize กับ metaphase chromosomes บนสไลด์ วิธีนี้ให้ความละเอียด (resolution) ไม่สูงมาก การพัฒนา array CGH โดยใช้ genomic หรือ cDNA clones หรือ oligonucleotides พิมพ์ลงบน slides เพื่อเพิ่มความละเอียดในการค้นหา สามารถที่จะหาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยของส่วนของโครโมโซมได้ (submicroscopic copy number

changes) วิธีนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการค้นหาหรือกลุ่มของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ความผิดปกติทางพันธุกรรม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของ DNA (DNA copy number) ไม่ว่าจะเป็น microdeletions หรือ microduplications

คณะผู้วิจัยจะทำการวิจัยนำร่อง สำหรับการตรวจวิเคราะห์ DNA จากผู้ป่วยโรควงช้างด้วยวิธี array CGH จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการค้นหา ยีน ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้น สามารถนำไปสู่การศึกษาขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยจำนวน ตัวอย่างที่มากขึ้นต่อไป

8.7. การหาลำดับเบสของยีนที่ทำให้เกิดโรควงช้าง

ถ้าผลจากการศึกษาโดยใช้ array-based CGH ชี้บ่งถึงยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ผู้ป่วยโรควงช้างอื่นๆ จะถูกนำมาศึกษาว่ามีการกลายพันธุ์ของยีนนั้นหรือไม่

เนื้อหางานวิจัย

การดำเนินงานของโครงการที่ผ่านมา กลุ่มผู้วิจัยได้รวบรวมผู้ป่วยโรควงช้างจำนวน 160 คน เก็บรวบรวมข้อมูล ศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลรวมทั้งพงศาวลี เพื่อหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้าง พบว่า พี่น้องของผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้างเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงการมีปัจจัยทางครอบครัว (familial aggregation) อาจจะเป็นไปได้ว่ามีการร่วมกันของปัจจัยบางอย่าง ไม่ว่าจะเป็นยีนและ/หรือสิ่งแวดล้อม ผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมดในการศึกษานี้มีเชื้อชาติไทย การศึกษาโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากสำมะโนประชากรและข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ พบว่า อายุมารดาที่มาก (advanced maternal age) (OR: 1.08, 95% CI: 1.02-1.15) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) ลำดับบุตรที่อยู่หลังๆ (high birth rank) (ภาพที่ 2) และระยะห่างของการมีบุตรที่ยาวนาน (OR: 1.17, 95% CI: 1.06-1.28) (ภาพที่ 3) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้าง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรควงช้างที่มีจำนวนมากที่สุดเท่าที่มีการรายงานมาก่อน พบว่า ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นอายุมารดาที่มาก ระยะห่างของการมีบุตรที่ยาวนาน ซึ่งอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะที่ไม่เหมาะสมของมดลูกต่อการเจริญเติบโตตัวอ่อน โดยที่ถ้ามีปัจจัยทางด้านพันธุกรรมบางอย่าง เช่น การที่มีเชื้อชาติไทย ประวัติการมีบุคคลที่เป็นโรควงช้างในครอบครัว เป็นต้น ส่งผลให้กำเนิดบุตรที่เป็นโรควงช้างได้ ข้อมูลเหล่านี้ สามารถนำไปใช้ในการให้คำปรึกษาคู่สมรสที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรควงช้าง เพื่อป้องกันการเกิดซ้ำในครอบครัว ช่วยลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรควงช้างในอนาคตได้ รายละเอียดอยู่ในผลงานวิจัยซึ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร European Journal of Pediatric Neurology โปรดดูในภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลของผู้ป่วยโรควงช้างที่ทำการศึกษา ผู้ป่วยโรคปากแหว่งเพดานโหว่ และข้อมูลทางด้านประชากรศาสตร์ในประเทศไทย

	FEEM (N=160)	Oral clefts# (N=349)	GP† (N=803,157)
Sex			
Male (%)	80 (50.0)	207 (59.3)	412,840 (51.4)
Female (%)	80 (50.0)	142 (40.7)	390,317 (48.6)
P Value	0.50	<0.003	Ref
Maternal age (years)§			
<35 (%)	88 (61.1)	306 (87.7)	708778 (87.8)
≥35 (%)	56 (38.9)	43 (12.3)	98413 (12.2)
Unadjusted OR (95% CI)	4.53 (2.78-7.39)	1.01 (0.73-1.41)	Ref
Adjusted OR (95% CI)	1.09 (1.04-1.15)	Ref	N/A
Birth order			
1 st -3 rd (%)	115 (71.8)	306 (87.9)	767206 (94.5)
≥4 th (%)	45 (28.2)	43 (12.1)	44669 (5.5)
Unadjusted OR (95% CI)	2.78 (1.70-4.58)	2.41 (1.73-3.36)	Ref
Adjusted OR (95% CI)	1.07 (0.84-1.37)	Ref	N/A
Interpregnancy interval (years)¶			
Between the index case and the preceding unaffected sibling	7, 4-11 (a) (n = 80)	4, 2-7 (b) (n = 178)	N/A
Between 2 unaffected siblings	3, 2-4 (c) (n = 109)	3, 2-4 (d) (n = 296)	N/A
P Value	<0.001*, <0.001**	N/A	N/A
Adjusted OR (95% CI)	1.15 (1.05-1.26)	Ref	N/A
Amnion rupture sequence (%)	7 (4.1)	1 (0.3)	N/A

#The patients with oral clefts include individuals with either cleft lip or cleft palate or both. We also compared the data from FEEM cases with those from patients affected with cleft lip with or without cleft palate and patients with cleft palate alone. The results were similar to the study of cases with FEEM and oral clefts. Hence only the data from patients with oral clefts are presented.

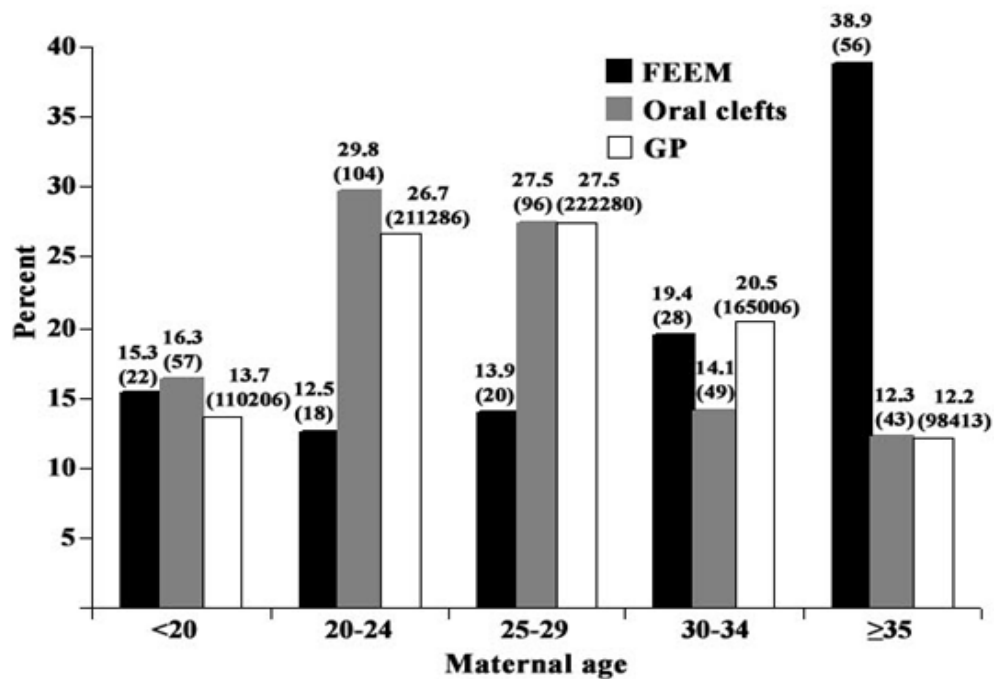
†Data from year 2003, Thai Census Bureau, National Statistical Office, Thailand (<http://web.nso.go.th>). The total number of GP is not similar in each category due to non-included unknown data.

§There were 144 FEEM cases with maternal age data available.

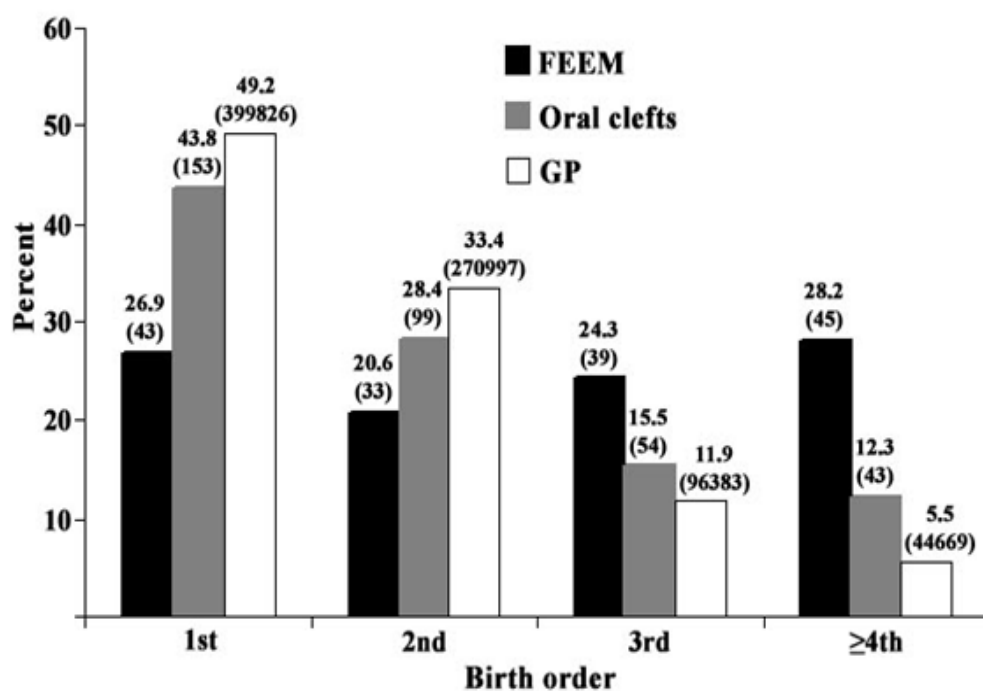
¶The interpregnancy interval is defined as the period between two consecutive deliveries. It was calculated in months and converted into years. It was described with median and interquartile range.

*Comparison between cells (a) and (c) using the Mann-Whitney U test.

**Comparison between cells (a) and (b) using the Mann-Whitney U test



ภาพที่ 1 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของผู้ป่วยโรควงช้าง โรคปากแหว่งเพดานโหว่ และประชากรไทยที่เกิดจากการดาในช่วงอายุต่างๆ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม



ภาพที่ 2 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของผู้ป่วยโรควงช้าง โรคปากแหว่งเพดานโหว่ และประชากรไทยกับลำดับบุตร ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มผู้วิจัยได้เตรียมและเก็บ DNA จากผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย และเริ่มการวิจัยนำร่องโดยใช้เทคนิค array-based comparative genomic hybridization (array CGH) จาก DNA ของผู้ป่วยโรควงช้างจำนวน 5 ตัวอย่าง ผลการศึกษาเบื้องต้น พบบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA copy number ซึ่งประกอบด้วย ตำแหน่งที่มี deletion 3 ตำแหน่ง และ duplication 1 ตำแหน่ง หลังจากที่ได้มีการวิเคราะห์และยืนยันด้วยวิธี real-time PCR ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว จึงได้ปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลอีกครั้งกับนักวิจัยของทาง Yale University ซึ่งเป็นกลุ่มนักวิจัยที่ช่วยเหลือในเรื่องของการทำ array CGH และการวิเคราะห์ข้อมูล ทางกลุ่มวิจัยดังกล่าวซึ่งได้ทำการทดลองโดยวิธี array CGH หลาย platforms และพัฒนา software สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น จึงได้ทำการทดลองโดย array CGH อีกครั้งโดยใช้ software ที่ได้รับการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลได้ถูกต้องและเชื่อถือได้มากขึ้น และเพิ่มขนาดตัวอย่าง DNA จากผู้ป่วยโรควงช้าง

ผลการศึกษาที่ได้จากการวิเคราะห์ DNA ของผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมด 21 รายโดยวิธี array CGH สรุปได้ดังต่อไปนี้

บริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA copy number ซึ่งมีความสำคัญและจำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันต่อไปโดยวิธีอื่น ดังแสดงในตาราง

	ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ DNA	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ขนาดของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลง	ยีน
1	Heterozygous deletion	15	Max: 194,116 bp Min: 117,912 bp	<i>LRRC49</i>
2	Heterozygous deletion	1	Max: 332,746 bp Min: 138,357 bp	<i>KCNT2</i>

- ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป (heterozygous deletion) บนโครโมโซมที่ 15 ตำแหน่งดังกล่าวประกอบด้วยยีน 1 ยีน คือ *leucine rich repeat containing 49 (LRRC49)* จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้ algorithm ทั้ง 3 แบบ พบตำแหน่งที่มีการขาดหายไวดังกล่าวนี้ในผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมด 2 ราย ซึ่งขนาดที่ใหญ่ที่สุดที่ขาดหายไป คือ ประมาณ 194,116 bp (ตำแหน่ง 68,999,891-69,194,007) และตำแหน่งที่เล็กที่สุดที่ขาดหายไป คือ ประมาณ 117,912 bp (ตำแหน่ง 68,999,891- 69,117,803) ยีนนี้พบมีการแสดงออกที่สูงในเนื้อเยื่อระบบประสาท

ทางกลุ่มผู้วิจัยได้ตรวจหา deletion ของ *LRRC49* ในบิดาและมารดาของผู้ป่วยโรควงช้าง พบว่ามารดาของผู้ป่วยโรควงช้าง 1 ราย มี deletion ในบริเวณนี้เช่นกัน

- ตำแหน่งที่มีการขาดหายไป (heterozygous deletion) บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่งดังกล่าวประกอบด้วยยีน 1 ยีน คือ *potassium channel, subfamily T, member 2 (KCNT2)* จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้ algorithm ทั้ง 3 แบบ พบตำแหน่งที่มีการขาดหายไวดังกล่าวนี้ในผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมด 6 ราย ซึ่งขนาดที่ใหญ่ที่สุดที่ขาดหายไป คือ ประมาณ 332,746 bp

(ตำแหน่ง 194,429,443- 194,762,189) และตำแหน่งที่เล็กที่สุดที่ขาดหายไป คือ ประมาณ 138,357 bp (ตำแหน่ง 194,531,039-194,669,396) ยีนนี้พบมีการแสดงออกที่สูงในเนื้อเยื่อระบบประสาทโดยเฉพาะในระยะตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัด

สำหรับ phenotype-genotype correlation จากข้อมูลในขณะนี้ ไม่สามารถสรุปได้ว่าการมี deletion และขนาดของ deletion มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่พบในผู้ป่วย หรือ ไม่สามารถนำมาใช้คาดคะเนความรุนแรงของโรคและความผิดปกติที่พบร่วมด้วยได้

ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาเพื่อที่จะสืบค้นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้างโดยวิธี array CGH ได้ candidate genes ที่มีความสำคัญและเป็นไปได้ ควรที่จะได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกต่อไป เพื่อจะได้องค์ความรู้ใหม่ที่น่าไปสู่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดโรควงช้างมากขึ้นซึ่งเป็นโรคที่มีผลกระทบอย่างสำคัญต่อประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษาโรควงช้างซึ่งเป็นความผิดปกติที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาของสมอง อาจจะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับขบวนการการทำงานของเซลล์และระบบประสาทต่อไปในอนาคต ซึ่งในขณะนี้ ผลงานส่วนหนึ่งที่ได้จากโครงการศึกษาวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว 1 เรื่อง

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์

ผลงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ได้จากโครงการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว 1 เรื่อง โปรดดูในภาคผนวก

Suphapeetiporn K, Mahatumarat C, Rojvachiranonda N, Taecholarn C, Siriwan P, Srivuthana S, Shotelersuk V. Risk factors associated with the occurrence of frontoethmoidal encephalomeningocele. Eur J Paediatr Neurol. 2008; 12(2): 102-107. Epub 2007 Sep 14.

ความรู้ทางการแพทย์และสาธารณสุข

ข้อมูลทางด้านปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้าง สามารถนำไปใช้ในการให้คำปรึกษาแนะนำครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรควงช้างได้ เพื่อป้องกันการเกิดโรควงช้างในครอบครัว ช่วยลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรควงช้างที่เป็นความพิการแต่กำเนิดที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไทย พม่า กัมพูชา อินโดนีเซีย และมาเลเซียในอนาคตได้

การแลกเปลี่ยนเรียนรู้ร่วมกับนักวิจัยต่างประเทศ

โครงการวิจัยนี้ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโดยวิธี array-CGH ได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากกลุ่มนักวิจัยของมหาวิทยาลัยเยล สหรัฐอเมริกา และได้มีแผนการศึกษาร่วมกันเพื่อต่อยอดความรู้ที่ได้ต่อไป

ภาคผนวก

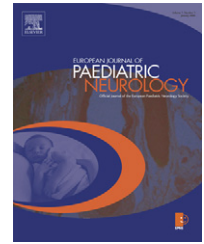
บทความสำหรับการเผยแพร่
ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้าง
(frontoethmoidal encephalomeningocele)

โรควงช้าง หรือ frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) เป็นความผิดปกติของใบหน้าและกะโหลกศีรษะที่เป็นมาแต่กำเนิด เกิดจากการยื่นของบางส่วนของเยื่อหุ้มสมองและเนื้อสมองผ่านทางรูเปิดที่ผิดปกติของกะโหลกศีรษะส่วนหน้า ซึ่งอยู่รอยต่อระหว่างกระดูก frontal และกระดูก ethmoid ผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างอาจจะมีก้อนยื่นออกมาได้หนึ่งหรือหลายก้อน ในหลายๆ ตำแหน่งบนใบหน้า ตั้งแต่ส่วนกลางของหน้าผากจนถึงบริเวณโคนจมูกภาวะแทรกซ้อนทางสมองพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้าง โรควงช้างเป็นความผิดปกติแต่กำเนิดที่เกิดขึ้นบริเวณใบหน้าและสมองที่พบได้บ่อยในกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งรวมทั้งประเทศไทย

ข้อมูลต่างๆ รวมทั้งพงศาวลีของผู้ป่วยโรควงช้างจำนวน 160 คน ได้รับการวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลของผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่จำนวน 349 คน ซึ่งได้เก็บรวบรวมในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน และข้อมูลจากสำมะโนประชากรในปี 2003 พบว่า พี่น้องของผู้ป่วยที่เป็นโรควงช้างจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรควงช้างเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงการมีปัจจัยทางครอบครัว (familial aggregation) ผู้ป่วยโรควงช้างทั้งหมดในการศึกษานี้มีเชื้อชาติไทยและมีฐานะยากจน การศึกษาโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากสำมะโนประชากรและข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยปากแหว่งเพดานโหว่ พบว่า อายุมารดาที่มาก (advanced maternal age) และระยะห่างของการมีบุตรที่ยาวนาน มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรควงช้าง จากผลการศึกษานี้ บ่งบอกว่าโรควงช้าง เกิดจากทั้งปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรม ได้แก่ บุคคลที่มีเชื้อชาติไทย ประวัติการมีบุตรที่เป็นโรควงช้างในครอบครัว เป็นต้น ดังนั้นการให้คำปรึกษาแนะนำแก่บุคคลหรือครอบครัวที่มีความเสี่ยงต่อการกำเนิดบุตรที่เป็นโรควงช้าง โดยหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงทางด้านสิ่งแวดล้อม อาจจะเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดความเสี่ยงหรือป้องกันการมีบุตรเป็นโรควงช้างได้



Official Journal of the European Paediatric Neurology Society



Original article

Risk factors associated with the occurrence of frontoethmoidal encephalomeningocele

Kanya Suphapeetiporn^a, Charan Mahatumarat^b, Nond Rojvachiranonda^b,
Chopiew Taecholarn^c, Pichit Siriwan^b, Sumarlee Srivuthana^a, Vorasuk Shotelersuk^{a,*}

^aDivision of Medical Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th Floor, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand

^bDivision of Plastic Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^cDivision of Neurosurgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2007

Received in revised form

4 July 2007

Accepted 10 July 2007

Keywords:

Frontoethmoidal
encephalomeningocele
Neural tube defect
Thai
Risk factors

ABSTRACT

Objectives: To determine factors associated with the occurrence of frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM), a congenital defect with unique geographical distribution. **Methods:** The subjects of this study were 160 unrelated cases of FEEM. Subjects were recruited between 1999 and 2006 from 15 medical centers throughout Thailand. Data obtained from FEEM cases were analyzed and compared with data from 349 cases of oral clefts studied in the same centers and during the same time and those from the general population (GP) taken in 2003.

Results: About 52% of FEEM cases had brain anomalies which were not different among types of FEEM. We found familial aggregation reflected by an increased risk to siblings. All of the FEEM cases were of Thai nationality and came from low socioeconomic status. Seven FEEM cases had amniotic rupture sequences. Compared with oral clefts, advanced maternal age (OR: 1.08, 95% CI: 1.02–1.15) was found to be associated with FEEM. In addition, the interpregnancy interval between the FEEM cases and their previous siblings was significantly longer than that of the oral cleft patients and unaffected sibs (OR: 1.17, 95% CI: 1.06–1.28).

Conclusions: Low socioeconomic status, advanced maternal age, and a long interpregnancy interval may lead to an unfavorable intrauterine environment which, with a certain genetic background such as Thai ethnicity, could contribute to the occurrence of FEEM.

© 2007 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Frontoethmoidal encephalomeningocele (FEEM) is characterized by a congenital bone defect of the anterior cranium between the frontal and ethmoidal bones with herniation of

meninges and brain tissues through the defect.¹ It has been considered a type of neural tube defect (NTD) with the main pathological changes found internally at the foramen cecum and externally at the frontonasal-orbital region.² FEEM has been generally categorized based upon clinical and

*Corresponding author. Tel: +66 2256 4989; fax: +66 2256 4911.

E-mail address: vorasuk.s@chula.ac.th (V. Shotelersuk).

Abbreviations: FEEM, frontoethmoidal encephalomeningocele; NTD, neural tube defect; GP, general population; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase

1090-3798/\$ - see front matter © 2007 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejpn.2007.07.005

radiological findings into nasofrontal, nasoethmoidal, nasoorbital, and combined type.^{3,4} This classification is dependent on the external bone defects. Previous studies did not demonstrate any clinical or etiological significance among different types of FEEM. Associated anomalies are also found with the most common being central nervous system abnormalities.⁴ Brain malformations found in FEEM determine the disease outcome. Many infants with FEEM survive with severe disabilities.

FEEM has a unique geographical distribution. It is much more common in Southeast Asia, with an approximate prevalence of 1 in 6000, than in western countries.^{5–7} The reason for this is unknown. Recent data from animal and human studies have suggested that neural tube closure is initiated simultaneously in five separate sites which then fuse together.^{8,9} It has been shown that NTD in different locations have different incidences, environmental risk factors, genetic susceptibility, and recurrence risks.^{7,10–12} Although the factors regulating normal closure and fusion at each site are still

unclear, they may include multiple genes or gene–environment interactions. Recent evidences support the role of 677C→T mutation of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in NTD formation at some but not all five closure sites.¹¹ Defects involving the cervical-lumbar spine, lumbosacral spine, and occipital encephalocele were significantly associated with 677C→T MTHFR allele whereas FEEM, anencephaly, exencephaly, and defects confined to the sacrum were not.

Besides being considered as a type of NTD, FEEM has also been hypothesized as having other different pathogenesis. Various theories on the pathogenesis of FEEM have been proposed, one of which is the nonseparation theory.¹³ It was initially proposed by Sternberg and further supported by an embryological study in mouse and rat embryos as well as clinical studies in 30 Indonesian patients with FEEM.¹³ The pathogenesis of FEEM appears to be related primarily to a disturbance in the separation of neural and surface ectoderm at the site of final closure of the rostral neuropore during the



Fig. 1 – Panel A shows a pair of discordant monozygotic twins for FEEM. An arrow indicates a nasal mass representing an encephalomeningocele. Panels B–G show patients with FEEM and amniotic rupture sequences. In panel B, an arrow indicates a constriction ring representing amniotic rupture sequence.

final phase of neurulation. It was postulated that insufficient apoptosis might be responsible for the failure in separation resulting in a midline mesodermal defect. Since the etiology has not been clearly identified, additional analyses of Thai patients with FEEM for associated factors will further elucidate the disease mechanism. We therefore conducted a case control study to determine factors associated with the occurrence risk of delivering an offspring with FEEM.

2. Methods

The subjects of this study were 160 unrelated cases of FEEM with the diagnosis confirmed by computerized tomography of

Table 1 – Types of FEEM and associated brain anomalies among cases with FEEM

External bone defect	No. of cases (%)	No. of cases with associated brain anomalies (%)
NF type	23 (14.4)	12 (52.2)
NE type	55 (34.4)	27 (49.1)
NO type	15 (9.4)	9 (60)
Combined type (NE+NO)	67 (41.8)	35 (52.2)
Total	160	83 (51.9)
Brain anomalies ^a	No. of cases (%)	
Dysplastic ventriculomegaly	54 (33.8)	
Dysgenesis of corpus callosum	37 (23.1)	
Absent septum pellucidum	14 (8.8)	
Arachnoid cyst	22 (13.8)	
Porencephaly	3 (1.9)	
Schizencephaly	7 (4.4)	
Holoprosencephaly	2 (1.3)	

^a Several forms of brain anomalies can be found in one FEEM patient.

the skull and brain. Subjects were recruited between 1999 and 2006 from 15 medical centers throughout Thailand. All FEEM cases were examined and all the data were reviewed by clinical geneticists (K.S. or V.S.). The study was approved by local Ethics Committees, and written informed consent was obtained from all patients or their parents included in the study. We obtained data regarding demographics, pregnancy, maternal use of medications, tobacco and alcohol use during pregnancy, maternal nutrition, family history and pedigree. The individual's ethnicity was based on the origin of parents. Chromosomal analysis was performed at 400-band resolution. Data from 349 cases of oral clefts studied in the same centers and at the same time and those of the Thai general population (GP) in the year 2003, obtained from Thai Census Bureau, National Statistical Office, Thailand, were used for comparison. Even though oral clefts are multifactorial and have etiological heterogeneity, FEEM and oral clefts are two distinct entities without any causal relationship having been demonstrated. We also used data from GP as a control for this study assuming that FEEM has a low incidence and occurrence of FEEM cases would have a negligible effect on the GP structure.

Statistical analyses included examination of distribution of characteristics of FEEM patients and their mothers, and estimation of unadjusted and multivariate-adjusted odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI). All data were analyzed using SPSS (version 11.5, SPSS Inc.) We made univariate comparisons of dichotomous data by using the χ^2 test. p value <0.05 is considered statistically significant. Multivariate-adjusted ORs were derived using a logistic regression model, adjusted for the following factors: gender, maternal age, birth order and interpregnancy interval. Each independent variable was added individually to calculate adjusted ORs for the disease outcome. Significance was judged at $p < 0.05$. The interpregnancy interval was described with median and interquartile range due to non-parametric distribution. Significance of difference in interpregnancy interval between two different groups was determined using the Mann–Whitney's U -test.

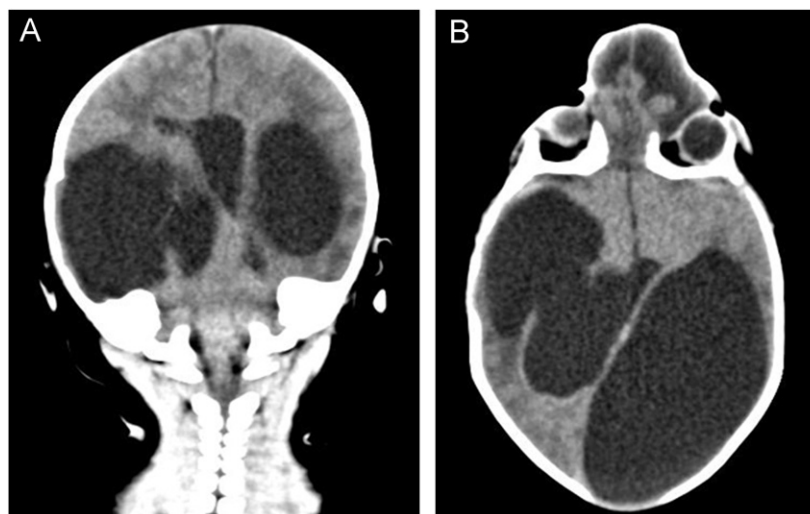


Fig. 2 – The brain CT scan of a patient with FEEM showing dysplastic ventriculomegaly: (A) the coronal plane and (B) the axial plane.

3. Results

Of 160 FEEM patients, 158 cases were sporadic and 2 reported affected siblings. There were a total of 310 siblings from 160 FEEM families. With the prevalence of FEEM in the GP being 1 in 6000,^{5–7} the risk to siblings (λ_{sib}) was therefore equal to 38.7. Two of our FEEM patients had unaffected monozygotic twins (zygosity of a pair was determined by molecular studies using 13 microsatellites) (Fig. 1A). The age of patients at the time of referring to our centers ranged from 1 day to 42 years old. Considering external bone defects, the combined type had the highest occurrence (41.8%, Table 1). Congenital brain anomalies were detected in 83 patients (51.9%) and the differences in frequency found among different types of FEEM were not statistically significant (Table 1). There were various forms of brain anomalies found in FEEM with the most frequent being dysplastic ventriculomegaly (Table 1, Fig. 2). Amniotic rupture sequences were found in 7 out of the 160 FEEM patients (Fig. 1B–G, the photograph of the 7th patient not shown).

While at least 10% of Thai population are Chinese,¹⁴ all our FEEM cases identified themselves as ethnic Thai. All of our FEEM cases were from low-income families with parents who were blue-collar workers. All mothers of FEEM affected patients lacked periconceptional supplementation of folic acid, similar to the mothers of patients with oral clefts. All the mothers did not smoke nor take significant amount of alcohol.

Compared to GP and oral cleft patients, advanced maternal age was associated with FEEM. In addition, interpregnancy interval was significantly longer in FEEM cases when compared to that of oral cleft patients (Table 2 and Figs. 3 and 4). A high percentage of FEEM cases were born at the high birth rank. However, it was not statistically significant after adjusted for other variables. Of the 80 FEEM patients whose samples were available for chromosomal analysis, all had normal karyotypes.

4. Discussion

We found familial aggregation reflected by an increased risk to siblings. This agrees with previous studies.^{6,7} The reason for this could be sharing of genes and/or environments. While at least 10% of the populations of Thailand are Chinese,¹⁴ all our FEEM cases identified themselves as ethnic Thai. This finding agrees with a previous observation that all FEEM patients in Malaysia were Malay although there were three major ethnic groups (Malay, Chinese and Indian) in Malaysia.¹² The high prevalence of FEEM in these particular ethnicities also suggests that genetic factors may be associated with the development of FEEM. The findings that most of them were sporadic and two of the FEEM patients had unaffected monozygotic twins suggest that FEEM is unlikely to be inherited in a Mendelian fashion. In addition, all of our patients sent for chromosomal analysis had normal karyotypes, indicating that FEEM is not a chromosomal disorder caused by gross rearrangements. However, submicroscopic genomic rearrangement leading to susceptibility to FEEM in

some population cannot be excluded as many submicroscopic genomic rearrangements have been found to be associated with a wide spectrum of disease traits. High-resolution genome analysis may identify the susceptibility genes previously intractable to conventional genetic analyses.

Table 2 – Characteristics of patients with FEEM, oral clefts and the general Thai population (GP)

	FEEM (N = 160)	Oral clefts ^a (N = 349)	GP ^b (N = 803,157)
Sex			
Male (%)	80 (50.0)	207 (59.3)	412,840 (51.4)
Female (%)	80 (50.0)	142 (40.7)	390,317 (48.6)
p Value	0.50	<0.003	Ref
Maternal age (years) ^c			
< 35 (%)	88 (61.1)	306 (87.7)	708,778 (87.8)
≥ 35 (%)	56 (38.9)	43 (12.3)	98,413 (12.2)
Unadjusted OR	4.53	1.01	Ref
(95% CI)	(2.78–7.39)	(0.73–1.41)	
Adjusted OR	1.09	Ref	N/A
(95% CI)	(1.04–1.15)		
Birth order			
1st–3rd (%)	115 (71.8)	306 (87.9)	767,206 (94.5)
≥ 4th (%)	45 (28.2)	43 (12.1)	44,669 (5.5)
Unadjusted OR	2.78	2.41	Ref
(95% CI)	(1.70–4.58)	(1.73–3.36)	
Adjusted OR	1.07	Ref	N/A
(95% CI)	(0.84–1.37)		
Interpregnancy interval (years) ^d			
Between the index case and the preceding unaffected sibling	7, 4–11 (a) (n = 80)	4, 2–7 (b) (n = 178)	N/A
Between two unaffected siblings	3, 2–4 (c) (n = 109)	3, 2–4 (d) (n = 296)	N/A
p Value	<0.001 ^e , <0.001 ^f	N/A	N/A
Adjusted OR	1.15	Ref	N/A
(95% CI)	(1.05–1.26)		
Amnion rupture sequence (%)	7 (4.1)	1 (0.3)	N/A

^a The patients with oral clefts include individuals with either cleft lip or cleft palate or both. We also compared the data from FEEM cases with those from patients affected with cleft lip with or without cleft palate and patients with cleft palate alone. The results were similar to the study of cases with FEEM and oral clefts. Hence only the data from patients with oral clefts are presented.

^b Data from year 2003, Thai Census Bureau, National Statistical Office, Thailand (<http://web.nso.go.th>). The total number of GP is not similar in each category due to non-included unknown data.

^c There were 144 FEEM cases with maternal age data available.

^d The interpregnancy interval is defined as the period between two consecutive deliveries. It was calculated in months and converted into years. It was described with median and inter-quartile range.

^e Comparison between cells (a) and (c) using the Mann–Whitney's U-test.

^f Comparison between cells (a) and (b) using the Mann–Whitney's U-test.

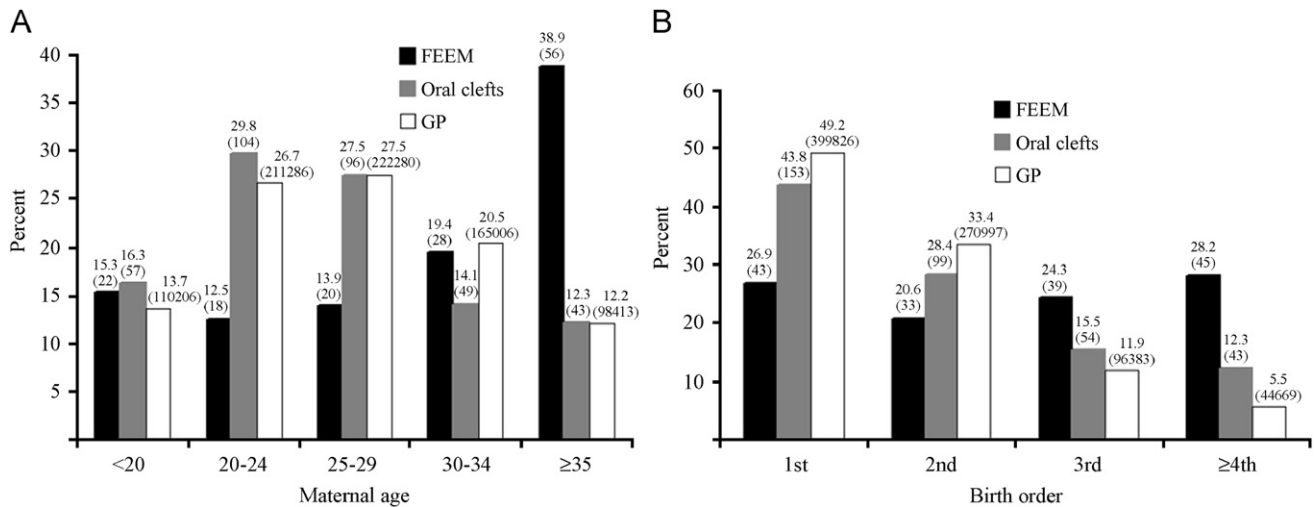


Fig. 3 – Risk factors associated with FEEM occurrence. Graphs A and B represent percentages of individuals from each category (FEEM, oral clefts, general population) in relation to maternal age and birth order, respectively. The number in parenthesis represents total numbers of individuals in each group.

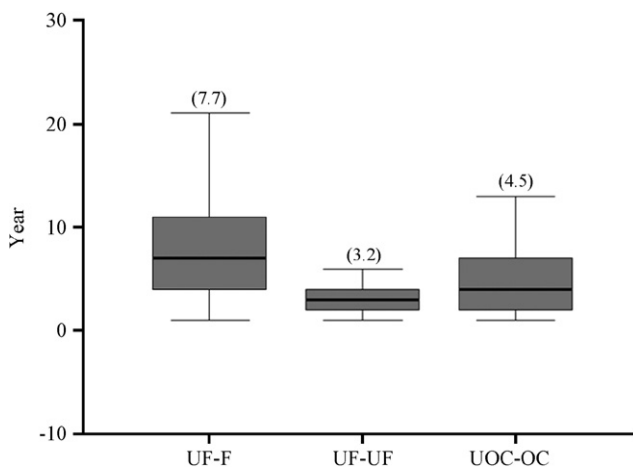


Fig. 4 – Comparison of interpregnancy interval among the preceding unaffected sibling and the proband with FEEM (UF-F), the 2 preceding unaffected siblings of FEEM (UF-UF) and the preceding unaffected sibling and the proband with oral clefts (UOC-OC). The number in parentheses represents a median with interquartile range.

It is most likely that interaction of genes and environment involves in development of FEEM.

All of our FEEM cases were from low-income families with parents identifying themselves as blue-collar workers. This finding is unlikely due to an ascertainment bias because our Craniofacial Center has been one of a few centers in Thailand capable of operational correction of the defect and has served many patients with other anomalies of various ethnicities and all socioeconomic classes. In addition, our patients with oral clefts were from families of different ethnicities and all socioeconomic classes. Association with low socioeconomic status, similar to a previous observation,⁷ suggests a significant role for environmental factors in FEEM. In fact, we have observed the lower incidence of FEEM (3 out of 107,889

births or 1 in 35,963) in our center, King Chulalongkorn Memorial Hospital, collected during the 9-year period of 1994–2002 (data unpublished), compared to 1 in 6,045 (7 out of 42,315) studied in the same hospital during 1962 and 1966.⁵ Studies of incidences of FEEM in rural communities of Thailand during 1960s to early 1970s showed similar incidences of 1 in 3500 to 1 in 7428.^{5,6} Higher socioeconomic status of the 1990s compared to that in 1960s may be a part in decreasing the incidence of FEEM.

The percentage of Thai expectant mothers taking folic acid periconceptionally has been exceptionally low as demonstrated by our recent study.¹⁵ Only 0.3% (1/383) reported taking folic acid before pregnancy. None of the mothers with FEEM affected children took any folic acid before conception, similar to the mothers of patients with oral clefts in our studies. While association between polymorphisms in *MTHFR* and some locations of NTD have been established, a previous study failed to show an association between polymorphisms in the *MTHFR* gene and FEEM.⁵ This suggests that FEEM and NTD in other locations may have different pathogenesis. Alternatively, FEEM may not be a type of NTD as proposed by some recent studies showing that FEEM appears to be related to a disturbance in the separation of neural and surface ectoderm just after closure of the neural folds, which might be caused by an insufficient occurrence of apoptosis.¹³

The interpregnancy interval was found to be longer in FEEM cases in a previous study.⁷ However, it has been inconclusive since other confounders were not included in the analysis. Adjusting for other demographic variables, this study showed that advanced maternal age, and long interpregnancy interval were associated with FEEM when compared to oral cleft patients. This suggests an unfavorable intrauterine environment for fetal growth including the development of the anterior part of the cranium in individuals with genetic predisposition to FEEM. It has been hypothesized that the growth-supporting capacities of the uterus, such as increased uterine blood flow and other physiologic and anatomical

adaptations, gradually decline if no fetus is conceived for a long time.¹⁶ The unfavorable intrauterine environment has been suggested to contribute to amniotic rupture sequences,¹⁷ which were found in seven out of our 160 FEEM patients.

Our study supports that genetic and environmental factors have a role in the development of FEEM. Even though the susceptibility genes have not been identified, studies about its pathogenesis might give some clues to the candidate genes. According to the nonseparation theory, insufficient apoptosis might be one of the underlying pathogenic mechanisms. The genetic factors contributing to FEEM in Thai patients might include the genes involved in the apoptosis pathway. Further analyses of Thai patients affected with FEEM will undoubtedly contribute to the understanding of this intriguing congenital anomaly.

In conclusion, our study comprises the largest group of imaging-confirmed FEEM patients reported. Low socioeconomic status, advanced maternal age, and a long interpregnancy interval may lead to an unfavorable intrauterine environment which, under a certain genetic background including Thai ethnicity, could contribute to the occurrence of FEEM. Primary care providers or providers of reproductive health care could counsel women of reproductive ages especially those in high-risk ethnic groups about the association between the potential risk factors such as long interpregnancy interval, extreme maternal age and the occurrence of FEEM. Our findings suggest a further study to explore these potential factors in various high-risk ethnic groups and a possible strategy to reduce the incidence of FEEM.

Conflict of interest

We have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We wish to thank the medical staff of the Thai Red Cross and the Provincial Hospitals of Nakornratchaseema, Srakaew, Uthaitanee, Nan, Maehongsorn, Trang, Prachinburi, Kalasin, Nongkhai, Maharakam, Chaiyapoom, Leoy, Yasothorn and Mukdaharn, for the excellent care of their patients. We are grateful to Professor Henry Wilde of the Division of Research Affairs, for reviewing the manuscript. This study was supported by the Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, the Research Unit Grant from Chulalongkorn University, the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, and the Thailand Research Fund.

REFERENCES

1. Mahatumarat C, Rojvachiranonda N, Taecholarn C. Frontoethmoidal encephalomeningocele: surgical correction by the Chula technique. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:556–65.
2. David DJ. Cephaloceles: classification, pathology, and management—a review. *J Craniofac Surg* 1993;4:192–202.
3. Mahatumarat C, Taecholarn C, Charoonsmith T. One-stage extracranial repair and reconstruction for frontoethmoidal encephalomeningocele: a new simple technique. *J Craniofac Surg* 1991;2:127–33.
4. Rojvachiranonda N, David DJ, Moore MH, Cole J. Frontoethmoidal encephalomeningocele: new morphological findings and a new classification. *J Craniofac Surg* 2003;14:847–58.
5. Suwanwela C. Geographical distribution of fronto-ethmoidal encephalomeningocele. *Br J Prev Soc Med* 1972;26:193–8.
6. Flatz G. Fronto-ethmoidal encephalomeningoceles in the population of northern Thailand. *Humangenetik* 1970;11:1–8.
7. Aung T, Hta K. Epidemiology of frontoethmoidal encephalomeningocele in Burma. *J Epidemiol Community Health* 1984;38:89–98.
8. Golden JA, Chernoff GF. Multiple sites of anterior neural tube closure in humans: evidence from anterior neural tube defects (anencephaly). *Pediatrics* 1995;95:506–10.
9. Van Allen MI, Kalousek DK, Chernoff GF, et al. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1993;47:723–43.
10. Martinez-Frias ML, Urioste M, Bermejo E, Sanchis A, Rodriguez-Pinilla E. Epidemiological analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. *Am J Med Genet* 1996;66:64–8.
11. Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, et al. Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites. *Am J Med Genet* 2000;90:6–11.
12. Sadewa AH, Sutomo R, Istiadid M, et al. C677T mutation in the MTHFR gene was not found in patients with frontoethmoidal encephalocele in East Java, Indonesia. *Pediatr Int* 2004;46:409–14.
13. Hoving EW, Vermeij-Keers C. Frontoethmoidal encephaloceles, a study of their pathogenesis. *Pediatr Neurosurg* 1997;27:246–56.
14. Barbie J. Chinese culture and demographic trends in Thailand and Malaysia. *Chin J Popul Sci* 1992;4:139–48.
15. Vilaiphan P, Suphateetiporn K, Phupong V, Shotelersu V. An exceptionally low percentage of Thai expectant mothers and medical personnel with folic acid knowledge and preconceptional consumption urges an urgent education program and/or food fortification. *Int J Food Sci Nutr* 2007;58:297–303.
16. Zhu BP, Rolfs RT, Nangle BE, Horan JM. Effect of the interval between pregnancies on perinatal outcomes. *N Engl J Med* 1999;340:589–94.
17. Werler MM, Louik C, Mitchell AA. Epidemiologic analysis of maternal factors and amniotic band defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003;67:68–72.