

Læbe-gane-spalte i Danmark i det 20. århundrede

Epidemiologiske og genetisk-epidemiologiske studier

Kaare Christensen

Lige siden *Poul Fogh-Andersens* legendariske doktorafhandling fra 1942 har den danske læbe-gane-spaltepopulation været en af de bedst beskrevne, såvel epidemiologisk som genetisk-epidemiologisk. Læbe- og/eller ganespalternes ætiologi er i høj grad stadig en gåde, og i forskellige lande og områder er der opnået forskellige resultater hvad angår miljømæssige og genetiske risikofaktorer. Dette kan skyldes ætiologisk heterogenitet i disse populationer, og derfor er detaljerede studier af områder med god registrering af særlig værdi for den ætiologiske forskning i læbe-gane-spalte. Denne artikel giver en oversigt over de epidemiologiske og genetisk-epidemiologiske undersøgelser af den danske læbe-gane-spaltepopulation, som er udført i det 20. århundrede. Desuden præsenteres analyser af kønsforskelle, tidstrends og årstidsvariationer for mere end 7.000 læbe-gane-spalte-tilfælde, som er født i Danmark i perioden 1936-1987. Artiklen peger også fremad mod de glimrende muligheder der er for fortsat ætiologisk læbe-gane-spalte-forskning i Danmark i det 21. århundrede vha. allerede etablerede ressourcer og et fortløbende prospektivt kohortestudium af 100.000 gravide kvinder.

Artiklen er baseret på et arbejde som primært er publiceret i *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 1999; 36: 96-104.

Læbe- og/eller ganespalte (LGS) hører til blandt de mest almindelige medfødte misdannelser, og sammenlignet med mange andre misdannelser er LGS nem at diagnosticere og beskrive. Af denne årsag har LGS været en af de mest intensivt studerede medfødte misdannelser i verden. Epidemiologiske studier og studier af familier tyder på at såvel miljømæssige som genetiske faktorer spiller en rolle i LGS-ætiologien. Men hvilke genetiske og miljømæssige faktorer der har betydning for LGS er stadig i høj grad en gåde. Dette er blevet understreget i nyere oversigter over både miljømæssige (1) og genetiske LGS-risikofaktorer (2-4).

Mange miljømæssige påvirkninger og nogle genetiske varianter har vist sig at være risikofaktorer for LGS i nogle studier, mens andre studier ikke har kunnet bekræfte disse fund. De modstridende resultater kan skyldes tilfældige fund eller ætiologisk heterogenitet, dvs. at mange kombinationer af genetiske og/eller miljømæssige faktorer kan føre til LGS. Det som i ét område er en almindelig og vigtig kausal mekanisme, er måske i et andet område sjælden (5). En måde hvorpå man kan reducere indflydelsen af ætiologisk heterogenitet og blandede befolkninger, er at udføre omfattende studier i en etnisk homogen population (6).

Danmark er på mange måder en glimrende ramme for genetisk-epidemiologiske studier af LGS. Gennem størstedelen af det 20. århundrede har Danmark været et i etnisk henseende meget homogent område, og LGS-populationen er blevet omhyggeligt registreret siden begyndelsen af 1930'erne. Centraliseret, gratis behandling af alle borgere har muliggjort at man har registreret de fleste LGS-tilfælde, ligesom eksistensen af befolknings- og helbredsregistre på landsplan muliggør studier af familier og opfølgende studier. Endelig har der været tradition for en positiv holdning til forskning i Danmark, hvilket har resulteret i høje svarprocenter.

Denne artikel giver en oversigt over de genetisk-epidemiologiske studier som er udført i Danmark i det 20. århundrede, startende med *Poul Fogh-Andersens* legendariske doktorafhandling, som blev udgivet i 1942 (7).

Den første del af artiklen beskriver LGS-epidemiologien i Danmark fra 1936 til 1987, inklusive kønsforskelle og årstidsvariation. Anden del af artiklen opsummerer de danske genetisk-epidemiologiske studier, inklusive segregationsanalyser og gentagelsesstudier blandt tvillinger, søskende, halvsøskende og fjernere slægtninge, samt studier af specifikke miljømæssige og genetiske risikofaktorer og deres vekselvirkning. Endelig belyser det sidste afsnit nogle grundlæggende problemer i den epidemiologiske og genetisk-epidemiologiske forskning i LGS (manglen på incidensdata, små stikprøver og afgrænsningen af non-syndromiske LGS-tilfælde), men der bliver også peget på nogle mulige frugtbare

områder for LGS-forskning i det 21. århundrede. Endelig beskrives i sidste afsnit det potentiale for LGS-forskning som rummes i et fortløbende prospektivt studium i Danmark af 100.000 gravide kvinder og deres børn.

Hjørnestenen i epidemiologisk og genetisk-epidemiologisk læbe-gane-spalte-forskning i Danmark

Poul Fogh-Andersens doktorafhandling fra 1942 med titlen »Inheritance of Harelip and Cleft Palate« (7) er stadig et af de mest citerede værker i LGS-litteraturen.

Afhandlingen indeholder information om 703 danske LGS-patienter som blev født i begyndelsen af det 20. århundrede, deres afstamning samt en tvillingundersøgelse. På grundlag af tvillingundersøgelsen samt gentagelsesmønstret i familierne konkluderede *Fogh-Andersen* at genetiske faktorer spiller den største rolle i LGS-ætiologien. Han var den første som erkendte at læbespalte med eller uden ganespalte (LS(G)) og isoleret ganespalte (GS) er genetisk forskellige misdannelser. *Fogh-Andersen* rapporterede også at LS(G) optræder hyppigere hos mænd og GS hyppigere hos kvinder, samt at associerede misdannelser forekommer hos 10% eller mere af børn med LGS. Denne afhandling og de meget omhyggelige og systematiske optegnelser, som *Fogh-Andersen* personligt førte over alle kirurgisk behandlede tilfælde af LGS i Danmark i perioden 1936-1984 har været grundlaget for en meget stor del af den epidemiologiske og genetisk-epidemiologiske læbe-gane-spalte-forskning i Danmark i det 20. århundrede.

Epidemiologi

LS(G)- og GS-epidemiologien i Danmark er tidligere blevet beskrevet for perioderne 1938-1962 (8,9) og 1976-1981 (10). Desuden har *Melnick et al.* (11) rapporteret om LS(G)-tilfældene i perioden 1941-1968, og *Shields* (12) undersøgte GS-tilfælde i perioden 1940-1971. I løbet af 1980'erne og begyndelsen af 1990'erne blev det danske Læbe-ganespalteregister, som rummer fødselskohorter fra 1936-1987, oprettet. Denne database indeholder CPR-numre, hvilket muliggør samkøring med andre danske registre. Læbe-ganespalteregistret er hovedsagelig blevet anvendt til genetisk-epidemiologiske studier (13-19). Antallet af LGS-tilfælde i Læbe-ganespalteregistret er for nogle perioder højere end meddelt af *Fogh-Andersen* (8,9), *Shields* (12), *Melnick et al.* (11) og *Jensen et al.* (10), hvilket skyldes supplerende kilder og længere opfølgningstid (hvilket især er vigtigt for identifikationen af submukøs GS). I det følgende vil de basale epidemiologiske karakteristika for de danske LGS-kohorter i perioden 1936-1987 blive beskrevet mere detaljeret.

Læbe-ganespalteregistret er tidligere blevet beskrevet (13-

15,20). Kort fortalt er identifikationen af læbe-gane-spalte-tilfælde baseret på brugen af følgende kilder:

- 1) Diakonissehospitalet og Rigshospitalet: Siden midten af 1930'erne har den kirurgiske behandling af LGS i Danmark været centraliseret. Gennem hele perioden 1936-1987 er der blevet foretaget læbeoperationer omkring tomånersalderen og ganeoperationer omkring toårsalderen. De kirurgiske optegnelser indeholder information om associerede misdannelser eller syndromer, som man havde kendskab til på operationstidspunktet.
- 2) Taleinstitutterne: Siden 1954 har jordemødrene i Danmark været forpligtede til at indrapportere alle nyfødte med LGS til taleinstitutterne, hvorfra behandlingen så er blevet koordineret. LGS, som er blevet opdaget på et senere tidspunkt i barnets liv (fx submukøse GS-defekter, som er blevet diagnosticeret i forbindelse med talevanskeligheder), er også blevet indrapporteret til instituttet. Læbe-gane-spalte-tilfælde er systematisk registreret tilbage til 1939, og heri er inkluderet oplysninger om større associerede misdannelser.

Såvel 1) som 2) rummer information om navn og fødselsdato for LGS-tilfældene samt i næsten alle tilfælde fødested. Andre kilder er blevet anvendt ved oprettelse af Læbe-ganespalteregistret (bl.a. Misdannelsesregisteret, Dødsårsagsregisteret samt EUROCAT-Fyn), og anvendelse af *capture-recapture*-metoder tyder på at næsten alle (99%) levendefødte LGS-børn uden associerede anomalier er blevet identificeret – dog på nær submukøse GS-defekter, som ofte vil forblive asymptomatiske eller næsten asymptomatiske (15,20).

I Læbe-ganespalteregistret bliver et tilfælde registreret som havende associerede misdannelser (inkl. syndromer) når en sådan defekt er anført i mindst én af databasens kilder. Større misdannelser omfatter anomalier som neuralrørsdefekter, monogene sygdomme (Van der Woude), syndromer (trisomi) og sekvenser (Pierre Robin), mens anomalier som polydaktyli og klumpfod regnes for mindre misdannelser. Minimale misdannelser som naevi og retinerede testikler regnes ikke for associerede misdannelser. LGS-tilfælde som er registreret uden anførelse af større eller mindre associerede misdannelser regnes for non-syndromiske. Isoleret bifid uvula regnes ikke som GS.

Læbe-ganespalteregistret 1936-1987 omfatter 7.290 levendefødte LGS-børn, hvor 89% er identificeret vha. et CPR-nummer, 6% er døde før indførelsen af CPR-numre i 1968, og 5% ikke kunne identificeres nærmere end ved navn og fødselsdato. For perioden 1952-1967 er 92% af tilfældene identificerede vha. CPR-nummer, hvilket muliggør at familiemedlemmer kan identificeres vha. kørsler i Det Centrale Personregister.

Fig. 1. Prævalens af forskellige typer og grupperinger af læbe-gane-spalte per 1.000 fødsler i Danmark i perioden 1936-87. A og B repræsenterer hhv. alle registrerede LS(G)- og GS-tilfælde. C og D samt E og F viser de samme data efter en kurveud-glatningsprocedure (fem års »moving average«).

Fig. 1. Prevalence of various facial cleft types and groupings per 1000 births in Denmark in the period 1936-87. A and B represent all registered CL(P) and CP cases, respectively. C and D plus E and F show similar data after subdivisions and a curve smoothing procedure (five years moving average). Black = all, red = girls, blue = boys.

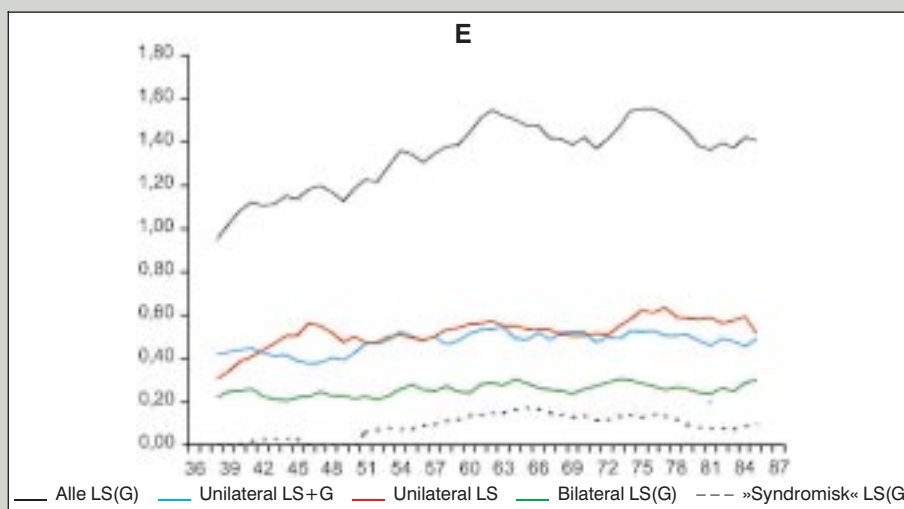
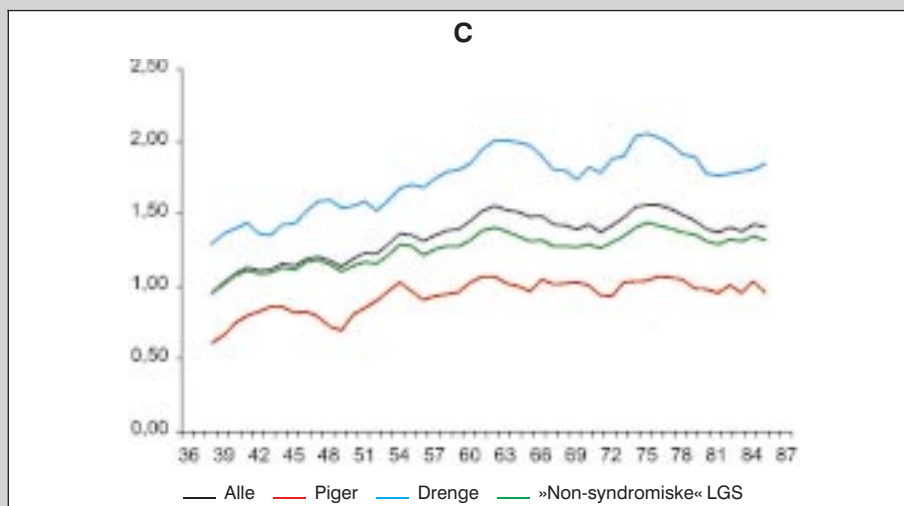
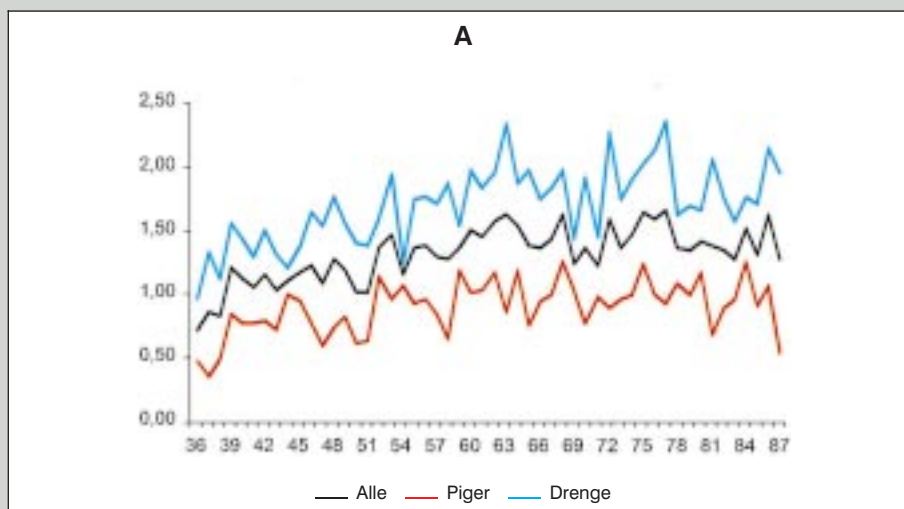
Noter:

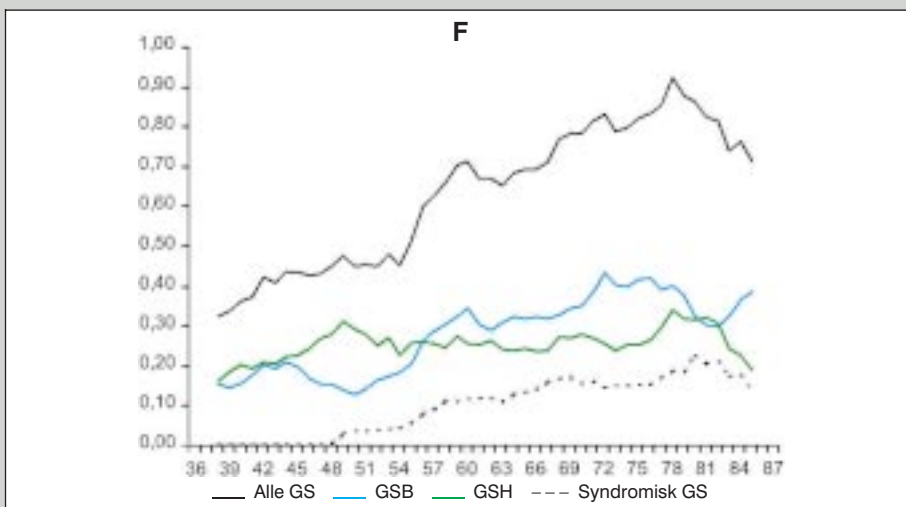
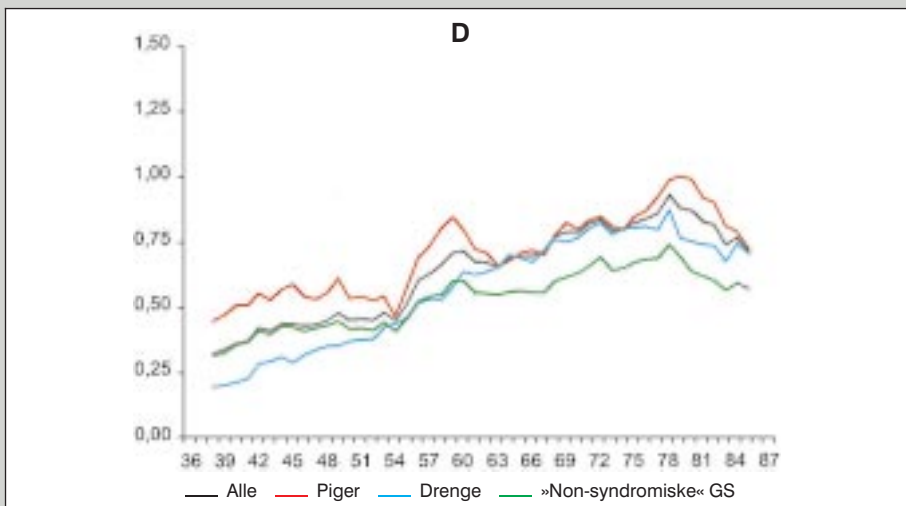
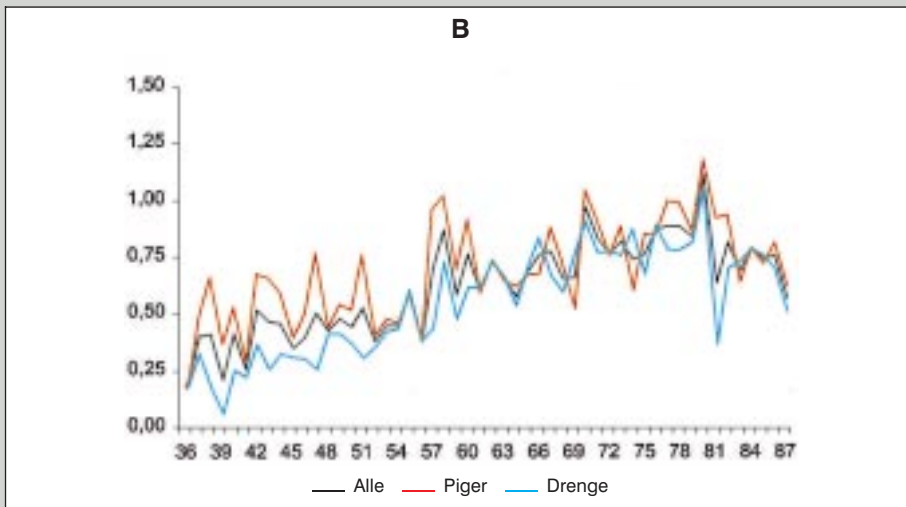
E: LS: non-syndromisk læbespalte uden ganespalte; LS+G: non-syndromisk læbespalte med ganespalte. F: GSB: non-syndromisk ganespalte som kun omfatter den bløde gane (submukøs ganespalte er inkluderet her).

GSH: non-syndromisk ganespalte omfattende den hårde gane.

Notes:

E: LS: non-syndromic cleft lip without cleft palate; LS+G: non-syndromic cleft lip with cleft palate. F: GSB: non-syndromic CP only including the soft palate (submucous CP included here). GSH: non-syndromic CP including the hard palate.





Prævalens ved fødslen

Fig. 1A og B, som bygger på tal fra Læbe-ganespalterregistret, viser den estimerede årlige prævalens ved fødslen af LS(G) og GS i perioden 1936-1987. I alt 4.989 børn med LS(G) blev født i denne periode, hvoraf 323 (6,4%) er registreret, som havde associerede anomalier eller syndromer. De tilsvarende tal for GS er 2.301 tilfælde, hvoraf 349 (15,1%) var registreret med associerede anomalier eller syndromer. Figuren viser også de udtalte kønsforskelle i prævalensen af LS(G) og kønsforskellen i prævalensen af GS, der svinder over tid, hvilket er blevet beskrevet i detaljer tidligere (15,20).

Fig. 1C og D viser de samme data efter en kurveudglattings-procedure (fem års »moving average«). Det ses klart at i anden halvdel af perioden (1962-1987) har prævalensen ved fødslen været temmelig konstant for både LS(G) (ca. 1,4-1,5 per 1.000) og GS (ca. 0,7-0,9 per 1.000). Som kontrast hertil var der en støt stigning i prævalensen af både LS(G) og GS i første halvdel af perioden (1936-1961). Den mest sandsynlige forklaring på denne stigning i midten af århundredet er forbedringen i overlevelsen af nyfødte LS(G)-børn (især dem med associerede misdannelser), samt at man er blevet bedre til at identificere tilfældene (især mildere former af GS og LGS-tilfælde med associerede misdannelser).

Fig. 1E og F viser nemlig at en væsentlig del af stigningen i prævalensen i denne periode skyldtes en øget andel af tilfælde med associerede anomalier og mildere former af LGS. Den næsten konstante prævalens gennem hele perioden af de mest alvorlige LGS-former (non-syndromisk bilateral LS(G) og GS omfattende den hårde gane) tyder på at der ikke er sket større ændringer i prævalensen af LGS i den 52-årige periode.

Den danske prævalens af LGS, som er rapporteret her, er højere end i de fleste andre lande, hvilket til dels kan skyldes at man i Danmark er bedre til at registrere tilfældene. Hvis man imidlertid bruger andre kilder til registrering af tilfældene, er den danske prævalens af LGS ved fødslen stadig blandt de højeste i verden sammen med prævalensen i de andre skandinaviske lande (21,22). Et interessant forskningsområde, som endnu mangler at blive undersøgt, er prævalensen af LGS ved fødslen blandt sydeuropæiske immigranter i de skandinaviske lande. Hvis prævalensen af LGS blandt disse immigranter svarer til prævalensen i deres hjemlande, kunne det tyde på at genetiske faktorer er ansvarlige for nord-syd-forskellene i prævalensen i Europa, mens en forøget prævalens af LGS blandt immigranterne ville tyde på miljømæssige faktorer indflydelse.

Årstidsvariation

Fraser & Gwyn (23) rapporterede for nylig om årstidsvariationer i fødselstidspunktet hos ca. 600 børn med non-syndro-

misk LS(G), som blev født i Montreal mellem 1950 og 1996. De fandt en signifikant tendens til at børn med LS(G) oftere fødtes om sommeren end om vinteren. I en anden artikel brugte Fraser (24) LS(G)-datasættet fra Fogh-Andersens afhandling fra 1942 og fandt her ingen variation i fødselsmåned for pigerne, men en top i april-maj for drengene. Analyserne var baseret på fordelingen af fødselsmåned for LS(G)-tilfælde. Hvis man anvender denne metode på alle kohorterne fra 1936 til 1987, viser det en lille årstidsvariation, som svarer til den man kunne observere i de canadiske data for såvel non-syndromisk LS(G) som non-syndromisk GS (Fig. 2A).

En vigtig ting man dog bør tage i betragtning når man studerer årstidsvariationer for LGS, er at det foretrukne fødetidspunkt kan variere fra sted til sted og fra tid til anden. Fx er fødselsforekomsten i de skandinaviske lande 10-20% højere i forårs- og sommermånederne end i vintermånederne (25). Således kan mønsteret i de observerede danske årstidsvariationer for LS(G) og GS nemt forklares med variationen i det overordnede mønster for årstidsvariation ved fødsler (Fig. 2B). Når der således tages højde for dette, ses der ingen årstidsvariation i LS(G)- eller GS-forekomsten.

Prognose

LGS regnes sædvanligvis for at have en god prognose. Defekten kan korrigeres kirurgisk, ofte med et godt kosmetisk resultat og uden taleproblemer til følge. Imidlertid indebærer behandlingen ofte adskillige hospitalsophold og opfølgende behandlinger af forskellig art, der typisk strækker sig fra fødslen til voksenalderen (26). Desuden tyder foreløbige fund på en øget morbiditet og mortalitet blandt LGS-patienter i voksenalderen, som er uafhængig af erkendte, associerede anomalier/syndromer. Disse foreløbige data er ved at blive studeret nærmere.

Genetisk epidemiologi

LS(G) og GS har en tendens til at ophobes i familier, men de to typer optræder sjældent i samme familie (bortset fra Van der Woudes syndrom). Dette var i virkeligheden en af de observationer som fik Fogh-Andersen (7) til at konkludere at LS(G) og GS er genetisk forskellige.

I Tabel 1 opregnes gentagelsesmønsteret for slægtninge til danske LGS-patienter som er født i perioden 1952-1987 (17,18). Ophobning af en sygdom inden for en familie kan skyldes genetiske og/eller miljømæssige faktorer. Adskillige fremgangsmåder er blevet benyttet med udgangspunkt i det 20. århundredes danske LGS-population i et forsøg på at kaste lys over genetiske og miljømæssige faktoreres samlede indflydelse på LGS-ætiologien. Disse fremgangsmåder inkluderer segregations- og gentagelsesanalyser, tvillingstudier og

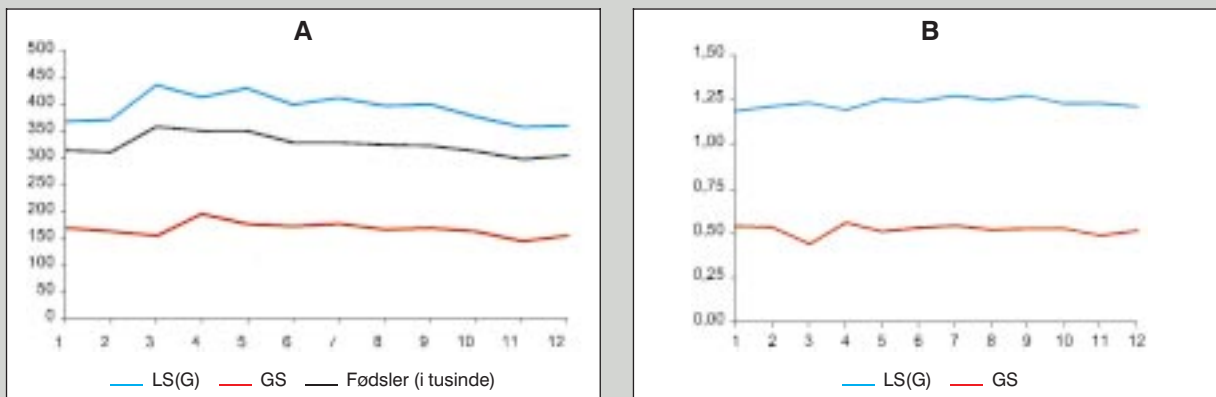


Fig. 2. Fødselsmåned for børn med non-syndromisk LS(G) og GS født i Danmark 1936-87. A: Det absolutte antal tilfælde født hver måned sammenholdt med det totale antal fødsler (i tusinder). B: Prævalensen af LG(S) og GS ved fødslen for hver måned.

Fig. 2. Month of birth for children with non-syndromic CL(P) and CP born in Denmark 1936-87. A: The absolute number of cases born in each month together with the total number of births (in thousands). B: The CL(P) and CP prevalence at birth in each month.

computerized square dance-studier. Andre danske undersøgelser har vurderet specifikke miljømæssige og genetiske faktoreres indflydelse på forekomsten af LGS vha. associations- og koblingsstudier.

Segregations- og gentagelsesanalyser

Fogh-Andersen konkluderede på grundlag af de første familie-

studier i Danmark (7, p. 251) at den måde LS(G) nedarves på er ved »betinget dominans« som er begrænset til det mandlige køn«. Melnick *et al.* (11) studerede 1.895 danske LS(G)-probander født i perioden 1941-1968, for hvem der fandtes fuldstændige data for førstegradsslægtninge, og konkluderede på baggrund heraf at hverken en multifaktorial tærskelmodel eller en »single major locus« med miljømæssig variation var i

Tabel 1. Gentagelsesrisiko for samme spaltetype (LS(G) eller GS) for første-, anden- og tredjegrads slægtninge til non-syndromiske LS(G) og GS-probander født i Danmark, 1952-1987.

Gruppe	LS(G)		GS	
	Risiko	(95% C.I.)	Risiko	(95% C.I.)
		%		%
Baggrundsbefolkningen	0,13		0,06	
Monozygote tvillinger	60	(38-82)	67	(36-98)
Førstegradsslægtninge:				
Forældre	2,44	(1,62-3,42)	1,53	(0,65-2,77)
Børn	3,30	(2,67-3,99)	2,55	(1,71-3,56)
Søskende	3,14	(2,58-3,77)	2,89	(2,09-3,81)
Andegradsslægtninge:				
Halvsøskende	0,57	(0,05-1,65)	0	
Niece/nevøer	0,52	(0,19-1,03)	0,26	(0,00-1,00)
Tanter/onkler	0,55	(0,17-1,13)	0,25	(0,00-0,97)
Bedsteforældre	0,60	(0,06-1,70)	0,73	(0,00-2,86)
Tredjegrads slægtninge:				
Fætre/kusiner	0,83	(0,30-1,63)	0	

Efter Christensen & Mitchell (17) og Mitchell & Christensen (18).

overensstemmelse med data. I stedet foreslog disse forfattere en alternativ model med monogenafhængig modtagelighed over for en række teratogener. *Marazita et al.* (27,28) udvidede *Melnick et al.*'s datasæt (11), så det omfattede 2.532 familier, som var tilvejebragt gennem non-syndromiske LS(G)-probander født i perioden 1941-1971, som var blevet kirurgisk behandlede. Vha. klassisk og kompleks segregationsanalyse fandt også denne gruppe forskere at data ikke var i overensstemmelse med en multifaktorial tærskelmodel, men at data tydede på genetisk heterogenitet med en større genetisk indflydelse hos en del af slægtningene. *Chung et al.* (29) brugte næsten det samme datasæt og konkluderede på grundlag af en kompleks segregationsanalyse at de danske data bedst kunne forklares vha. en kombination af et »major gene« og multifaktoriel arv.

Mitchell & Christensen (17) kobledede det danske Læbe-gane-spalteregister med CPR-registret for at kunne estimere risikoen for første-, anden- og tredjegrads slægtninge til 3.073 non-syndromiske LS(G)-probander, som var født i perioden 1952-1987. Denne metode påvirkes ikke af *recall bias* eller bortfald. Data blev analyseret vha. den metode, som er udviklet af *Risch* (30), og analyserne viste at *single-locus*- og additiv *multi-locus*-arv af LS(G) kunne udelukkes, og at LS(G) sandsynligvis bestemmes af flere interagerende loci. Vha. en multiplikativ model blev det estimeret at intet enkelt locus er ansvarligt for mere end en tredobbelt forøget risiko for førstegrads slægtninge til LS(G) probander.

Fogh-Andersen foreslog (7, p. 252) at måden GS nedarves på, er »simpel dominant med manglende manifestering og begrænset til det kvindelige køn«. *Bixler et al.* (31) fandt på grundlag af gentagelsesrisikoanalyser kun ringe belæg for større genetiske effekter i såvel LS(G) som GS, men stikprøvestørrelsen var beskedent. *Shields et al.* (32) undersøgte slægtshistorierne for 561 danske GS-probander, som var født fra 1941 til 1971, og fandt at hverken en multifaktorial tærskelmodel eller en »single major locus«-model var i overensstemmelse med data, og disse forfattere foreslog ligeledes en ætiologisk heterogenitet i GS-ætiologien.

Christensen & Mitchell (18) foretog de samme registersammenkoblinger som de havde anvendt for LS(G) for at finde gentagelsesrisikoen for første-, anden- og tredjegrads slægtningene til 1.364 non-syndromiske GS-probander født i Danmark fra 1952 til 1987. Analyser af gentagelsesmønstret, hvor man igen benyttede den metode som er fremlagt af *Risch* (30), indicerede at *major locus*- eller additiv *multi-locus*-arv af GS er usandsynlig. Data kunne bedst forklares ved at GS bestemtes af flere interagerende loci. Ud fra modellen kunne det estimeres at det er usandsynligt at et *single locus* kan være ansvarligt for en mere end en seksdobbel stigning i risikoen for

førstegrads slægtninge til GS-probander, hvorimod et *single locus*, som var ansvarligt for en tredobbelt stigning, stemte godt overens med data.

Estimaterne for gentagelsesrisiko er samlet i Tabel 1 og kan bruges til genetisk rådgivning i forbindelse med non-syndromiske ansigtsspaltninger. Når LGS optræder som del af et syndrom, fx Van der Woude eller velokardiofacialsyndromet, er gentagelsesrisikoen for LGS betragteligt højere. *Brøndum-Nielsen & Christensen* (33) anvendte det danske Læbe-ganespalteregister til at identificere mulige tilfælde med velokardiofacialsyndromet, som er associeret med haploinsufficiens på kromosom 22q11. Blandt 2.301 GS-patienter blev der identificeret 30 med associerede medfødte hjerteanomier og/eller mentale handicap/sindslidelser, blandt hvilke 15 blev testet for 22q11-deletion. Fire tilfælde af 22q11-deletion blev fundet blandt de 15 patienter. Sådanne patienter og deres familier kan drage fordel af en genetisk rådgivning.

Tvillingstudier

Christensen & Fogh-Andersen (13,14) opsummerede analyserne af danske LS(G)- og GS-tvillingtilfælde født i det 20. århundrede (130 tvillingpar). For såvel LS(G) som GS er den probandvise konkordansrate ca. 60% for monozygote tvillinger, mens det tilsvarende tal for dizygot tvillinger er 10% eller mindre (afhængigt af tidsperioden). Heritabilitetsestimater for disse data på omkring 70% eller mere opnås både ved brug af *liability threshold*-modellen (34) og ved anvendelse af nyere, biometriske modeller (35). Disse fund tyder på, at genetiske faktorer spiller den største rolle for LS(G)- og GS-ætiologien, men at miljømæssige og/eller stokastiske faktorer også er involverede.

Nogle medfødte misdannelser (acardia) forekommer kun hos tvillinger. Dette kunne tyde på at der hos tvillinger optræder ætiologiske faktorer som påvirker den embryonale udvikling som ikke ses hos enkeltfødte. Dette kunne i så fald gøre tvillingdesignet dårligt egnet til at studere medfødte misdannelser. Der er dog meget lidt som tyder på en forøget prævalens af LGS hos tvillinger (13), og gentagelsesmønstret hos slægtninge til tvillinger med LS(G) afviger ikke fra mønstret hos enkeltindivider (36). Skønt danske LGS-studier har tvillinger fra næsten hele det 20. århundrede som datagrundlag, er antallet af tvillinger relativt lille. Der foregår for tiden et internationalt samarbejde mellem en række lande om at finde tvillingpar. Herved vil man skaffe værdifulde data ikke blot til klassiske tvillingstudier, men også til de analyser af gentagelsesrisiko, som er nævnt ovenfor (30,37).

Computerized square dance-studier

I lande som de skandinaviske, hvor man har omfattende

befolkningsregistre, er det muligt på nationalt niveau at identificere individer som skiftede partner eller bopæl (eller andre miljømæssige faktorer). *Lie et al.* (38) brugte denne ressource i Norge og fandt at kvinder der allerede havde født ét barn med en misdannelse, reducerede deres risiko for at næste barn også blev misdannet betydeligt ved at flytte til en anden kommune, mens risikoen ikke reduceredes ved at skifte partner. *Olsen et al.* (19) arbejdede videre på dette undersøgelsesdesign og kaldte metoden *computerized square dance study design* (ligesom i folkedans indebærer den moderne tilværelse ofte skift af partner og opholdssted).

Christensen et al. (16) prøvede at konfirmere de norske fund ved at studere 1.902 danske mødre, som fik flere børn efter at have fået et barn med LGS. Flytning til en anden kommune nedsatte ikke risikoen for LGS hos søskende der blev født senere. Derimod reducerede et partnerskifte gentagelsesrisikoen signifikant. Forskellene i de danske og norske resultater kunne skyldes at det norske studium undersøgte 24 forskellige grupper af fødselsdefekter, som man havde fundet gennem en rutinemæssig misdannelsesregistrering, hvilket gør studiet sårbart over for bias ved sporing af tilfælde, fx ved flytning fra landdistrikter til byområder med tilstedeværelsen af diagnostisk ekspertise og bedre faciliteter (16).

Associationsstudier

Mange miljøfaktorer har været mistænkt for at være risikofaktorer for LGS i forskellige undersøgelser, men kun få fund har været konsistente. De mest veldokumenterede risikofaktorer er epilepsimedicin, maternel rygning og folinsyreantagonister i det første trimester af graviditeten (1,39).

Friis (40) undersøgte associationen mellem epilepsi hos moderen og LGS hos børnene vha. to danske epilepsiregistre. Han konkluderede at associationen mest sandsynligt skyldes epilepsimedicin, mens epileptiske anfalds rolle som en kausativ faktor for LGS er mere uklar. Data viste også at det ikke er sandsynligt at forbindelsen skyldes fælles underliggende genetiske faktorer, da børn af fædre med epilepsi og søskende til personer med epilepsi ikke havde LGS oftere end forventet.

Christensen et al. (41) undersøgte på baggrund af et landsdækkende, dansk case-control-studie, som løb fra 1991 til 1994, effekterne af rygning og *transforming-growth-factor-alpha* (TGFA-) alleller for LGS-forekomst. Tidligere, amerikanske undersøgelser har tydet på at moderens rygning i det første trimester af graviditeten og TGFA-locus-mutationer hos barnet er forbundet med non-syndromisk LGS, og at der forekommer en synergistisk effekt af disse to risikofaktorer (42,43). Den danske undersøgelse fandt at rygning var associeret med en moderat forøget risiko for LS(G), men der blev ikke observeret nogen forbindelse mellem rygning og GS.

TGFA var ikke associeret med hverken LS(G) eller GS, og der blev ikke fundet nogen synergistisk effekt med rygning. Den sjældne TGFA-allel optrådte i 25% af såvel cases som kontroller sammenlignet med et gennemsnit på 14% i andre hvide kontrolgrupper. Det er således muligt at den tidligere rapporterede forbindelse mellem TGFA og LGS i nogen grad kan skyldes *confounding* pga. etnicitet.

Det danske case-control-studie opnåede interviews med 302 mødre til LGS-patienter (96% af de mulige) og med 567 mødre til ikke-misdannede børn (94% af de mulige). For 84% af de deltagende børn blev der givet tilladelse til at inkludere dna i undersøgelsen. Dette case-control-studie vil blive grundlaget for yderligere gen-miljø-studier.

En særlig interessant undersøgelse som er undervejs, er et studie af interaktionen mellem A-vitamin og *retinoic acid receptor*- (RARA-) gen-varianter. Både A-vitamin (44) og RARA (45) er blevet associerede med LGS, og eksponeringen for A-vitamin ligger på et højt niveau i Danmark pga. et stort forbrug af leverpostej.

Vi er for tiden i gang med at indsamle dna fra 1.000 LGS-patienter og 4.000 kontrolpersoner vha. de blodprøver fra alle danske nyfødte som siden 1981 er blevet taget og opbevaret på Statens Serum Institut (46). Disse 5.000 prøver vil være et stærkt værktøj til at udføre genetiske associationsstudier.

Koblingsstudier

Eiberg et al. (47) studerede 58 danske familier med non-syndromisk LGS vha. 42 ikke-dna-polymorfiske markersistemer, og disse forfattere var de første som fandt evidens for en kobling på 6p vha. faktor 13A-genet. Senere studier af *Davies et al.* (48) og *Carinci et al.* (49) tydede også på at 6p var involveret i LGS-ætiologien. Skønt der også er publiceret negative undersøgelser, anses et primært LGS-gen på 6p dog for sandsynligt (2). Dna-prøver fra søskendepar, hvor begge har LGS, og andre familiemedlemmer født i Danmark i det 20. århundrede er for tiden ved at blive indsamlet mhp. at foretage koblingsanalyser.

Forskning i det 21. århundrede

Hvis man tager udgangspunkt i den nuværende udvikling inden for den epidemiologiske og genetisk-epidemiologiske forskning i LGS, er der nogle områder der ser meget lovende ud for det 21. århundrede (inddragelse af genetisk information i stor målestok), mens andre problemer (afgrænsning af non-syndromiske tilfælde og mangel på incidensdata) formentlig vil være problemer, LGS-forskere vil have i mange år fremover.

Ved siden af disse mere fundamentale problemer har LGS-forskere indset nødvendigheden af en koordineret, inter-

national forskning for at opnå mange cases såvel som dybtgående studier af mere homogene populationer. Dette afsnit vil behandle disse emner samt pege på områder, hvor danske studier kan være af særlig værdi.

Genetisk information i LGS-studier

Medicinsk forskning i det kommende århundrede vil uden tvivl drage fordel af den hastige udvikling inden for genetikken. Det humane genomprojekt vil give information om en enorm mængde af genetiske varianter, og den teknologiske udvikling vil give forskerne mulighed for til en overkommelig pris at inkludere genetisk information i deres studier vha. genotypebestemmende chips (50). Det er allerede nu muligt at opnå en dna-mængde som er tilstrækkelig til at bestemme adskillige hundrede genotyper, vha. en lille kindbørste (dna fås ved at skrabe på kindslimhinden med en lille børste) (51). En så harmløs procedure vil have betydning for den fremtidige deltagelsesprocent i genetisk-epidemiologiske LGS-studier, især fordi LGS-patienter ofte inddrages allerede som børn.

Mange fremtidige LGS-studier vil af flere grunde sigte på at inddrage genetisk information fra både LGS-børnene selv samt deres forældre. For det første kan dette trio-design bruges til at identificere genetiske faktorer vha. *transmission-disequilibrium*-testen, som er robust over for de vanskeligheder der er forbundet med studier i etnisk sammensatte populationer (52). For det andet har dyremodeller vist at LGS-forekomst kunne være afhængig af såvel moderens som fosterets genotype, dvs. at moderens genotype i nogle tilfælde kan »redde« en LGS-genotype hos fosteret ved overførsel af et genprodukt gennem placenta (53).

Dyremodeller, inklusive *knock-out*- og *overexpression*-eksperimenter (dvs. at man funktionelt enten ødelægger eller multiplicerer et gen), vil højst sandsynligt give et antal kandidatgener til LGS-modtagelighed. For nærværende ser det dog ikke ud til at nogle af disse isoleret set er af større betydning for LGS-risikoen hos mennesker. Hvis man tager udgangspunkt i familiestudier, ser det ud til at de ætiologisk vigtigste faktorer er gen-gen- og gen-miljø-interaktioner.

Afgrænsning af non-syndromiske LGS-tilfælde

Når man studerer den genetiske epidemiologi ved non-syndromisk LGS, er der ingen tvivl om at monogene sygdomme som Van der Woudes syndrom eller kromosomsygdomme som trisomi-18 bør udelades fra analyserne. Der er også generel enighed om at udelade LGS-tilfælde med andre store anomalier, som optræder sammen med LGS hyppigere end man skulle forvente (fx neuralrørsdefekter). Det er dog betydeligt vanskeligere at foretage ensartede konstateringer og

klassifikationer af mere eller mindre diskrete associerede anomalier.

Et konsistent fund er at frekvensen af associerede anomalier er højere hos GS-tilfælde (sædvanligvis i størrelsesordenen 13%-50%) end hos LS(G)-tilfælde (typisk i størrelsesordenen 2%-13%) (39). Det store spænd i de rapporterede frekvenser af associerede anomalier skyldes til dels forskelle i definitionen på associerede anomalier, hvor længe efter fødslen og hvor omhyggeligt cases er blevet undersøgt samt udvalget af patienter. Associerede anomalier er særligt problematiske i studier som dækker lange tidsperioder, idet diagnosticering af syndromer og associerede misdannelser, samt overlevelsen hos multimisdannede børn har ændret sig betragteligt med tiden.

Det velokardiofaciale syndrom (VCFS) kan illustrere dette problem. Patienter med VCFS udviser ofte kun GS og en mindre hjertedefekt, og/eller indlæringsvanskeligheder, og mange tilfælde af denne art er helt bestemt udiagnosticerede (33,54). VCFS er associeret med en deletion i 22q11, og en inkludering af VCFS-tilfælde i et studie af non-syndromisk GS vil formentlig reducere studiets styrke; rationalet ved at have en meget snæver definition af non-syndromisk LGS (ingen andre mindre eller større anomalier) er at reducere ætiologisk heterogenitet.

Der er dog imidlertid også ulemper ved at have en meget snæver definition af non-syndromisk LGS. Hvis definitionen af mindre anomalier inkluderer tilstande som optræder med en relativt høj frekvens i befolkningen (fx indlæringsvanskeligheder), så kunne LGS-tilfældene uden disse tilstande repræsentere en på anden vis meget rask gruppe. Desuden vil brugen af en meget snæver definition af non-syndromisk LGS forøge problemet med stikprøvestørrelse, som vil blive diskuteret nedenfor. Det er også sandsynligt at en række miljømæssige og genetiske faktorer kan indvirke på både syndromiske og non-syndromiske LGS-tilfælde, dvs. at syndromiske og non-syndromiske tilfælde kan have nogle fælles ætiologiske faktorer. Så længe afgrænsningen af udelukkende non-syndromiske LGS-tilfælde i høj grad afhænger af længden og intensiteten af opfølgningen, vil den mest fornuftige tilgang derfor være at opnå så meget information som muligt om associerede anomalier og bagefter udføre analyserne med eller uden LGS-tilfældene med mindre, associerede anomalier.

Manglen på incidensdata

Hyppigheden af LGS angives normalt som 1-2 tilfælde per 1.000 fødsler. Der har været en lang semantisk og konceptuel diskussion af denne frekvensmåling: Er det et mål for incidens, prævalens eller risiko? Der er efterhånden almindelig

enighed om at det er et prævalensmål, hvilket ses ud fra definitionerne af sygdomsmålene. Den mest accepterede definition af *incidens* er nye sygdomstilfælde per risikotid, mens *prævalens* er den del af befolkningen, der har sygdommen på et givet tidspunkt, og *risiko* er den kumulative incidenspopulation, dvs. den andel af en given population som bliver cases inden for en given tidsperiode (5).

LGS optræder i det første trimester, eller rettere, det forsvinder i løbet af det første trimester, når ganeanlæggene smelter sammen. Således er alle fostre i risikogruppen indtil det tidspunkt hvor sammensmeltningen normalt sker. Det som vi er i stand til at måle, er andelen af LGS blandt nyfødte, dødfødte og aborter, som finder sted efter det første trimester (skønt det sidste logistisk set er ekstremt vanskeligt i enhver større population). Vi kan derfor kun måle prævalensen af LGS blandt nyfødte, dødfødte og sene aborter. Det givne tidspunkt der er tale om, er det øjeblik hvor det intrauterine liv ender (55). Prævalensen kan også ses som et betinget risikoestimat, dvs. at for et levendefødt barns vedkommende er gennemsnitsrisikoen for LGS lig med prævalensen af LGS hos levendefødte.

Langt vigtigere end den semantiske diskussion er det at prævalensdata har alvorlige begrænsninger, når de skal bruges til ætiologisk forskning, fordi prævalensen afhænger både af incidensen af nye tilfælde og af overlevelsen blandt de eksisterende tilfælde. Hvis en moderat eksponering for en miljøfaktor i det første trimester øger risikoen for LGS, men massiv udsættelse for den samme miljøfaktor fører til abort (en to tærskel-model), så kan man få paradoksale resultater (55,56). Fx kan man under betingelser med en massiv eksponering for en sådan risikofaktor for LGS/spontan abort opleve at en nedsættelse af denne eksponering vil føre til en øgning i prævalensen af LGS (og en reduktion i antallet af spontane aborter).

Incidensdata giver ikke disse problemer, men desværre lader det sig ikke gøre at få incidensdata for LGS eller andre medfødte misdannelser. Derfor vil dette fundamentale problem fortsætte ind i det 21. århundredes LGS-forskning.

Stikprøvestørrelse

Skønt LGS hører til blandt de hyppigst forekommende medfødte misdannelser, og LGS er relativt nem at diagnosticere, er den statistiske styrke i de fleste ætiologiske LGS-studier ringe, især fordi de fleste studier normalt tager højde for den ætiologiske forskel mellem LS(G) og GS (7) og mellem syndromiske og non-syndromiske LGS-tilfælde. Det kan desuden være af nogen interesse at studere LGS stratificeret på forekomst i familier og på sværhedsgrad (bilateral versus unilateral LS(G), LS+G versus LS÷G) (4). Endelig har den

seneste forskning peget på at den non-syndromiske GS-gruppe muligvis består af to ætiologisk forskellige undertyper, GS som kun omfatter den bløde gane og GS som omfatter både den hårde og den bløde gane (15,57).

Problemerne med stikprøvestørrelsen taler for et internationalt samarbejde, som nu er undervejs. Et internationalt samarbejde øger potentialet for ætiologisk heterogenitet, men på den anden side øger det også styrken til at opdage ætiologiske faktorer som er fælles under de fleste forhold.

Fremtidige danske studier

Et væld af danske LGS-data som rummer såvel grundlæggende epidemiologiske karakteristika som dybtgående studier af genetiske og miljømæssige risikofaktorer, er blevet indsamlet i løbet af det 20. århundrede. Der er blevet peget på en række potentielt frugtbare forskningsretninger i forbindelse med de forskellige undersøgelser der er blevet beskrevet ovenfor.

I tilgift til disse potentialer er en større mulighed for LGS-forskning ved at blive etableret i Danmark. I disse år bliver 100.000 gravide kvinder og deres børn inddraget i et longitudinelt studie i et stort anlagt samarbejdsprojekt. Kvinder bliver typisk indrulleret i undersøgelsen ved deres første besøg hos den praktiserende læge (sædvanligvis i det første trimester). På dette tidspunkt vil kvinder som ønsker at deltage i undersøgelsen, give en blodprøve, og de vil blive interviewet om en lang række helbredsrelaterede forhold, heriblandt potentielle risikofaktorer for fosteret og information om livsstil. Omkring begyndelsen af det tredje trimester vil de kvinder som ønsker at deltage, igen give en blodprøve, og de vil blive interviewet. Ved fødslen vil der blive taget en blodprøve fra navlestrengen. Endelig vil moderen seks og 18 mdr. efter fødslen deltage i et interview, og man vil indsamle information om indlæggelser og kirurgiske indgreb gennem Landspatientregisteret.

Dette studie af 100.000 gravide kvinder giver hidtil usete muligheder for LGS-forskning vha. *nested case-control*-studier. Gennem dette studie opnås der information om risikofaktorer før kvinderne kender udfaldet af deres graviditet, hvorved man undgår *recall bias* (58), og det er også muligt at inkludere både moderens og barnets genotyper i analyserne og måle ændringer i moderens plasmaantistoffer i løbet af graviditeten. Sidstnævnte vil muliggøre studier af den eventuelle betydning af forskellige infektioner hos moderen i LGS-ætiologien. Kombinationen af sådanne data og udviklingen inden for genetikken kan give et håb om at der tidligt i det 21. århundrede vil finde betydelige fremskridt sted i forståelsen af læbe-gane-spalte-ætiologien.

Dette arbejde har fået økonomisk støtte fra Egmont Fonden, Civilingeniør Frode V. Nyegaard og Hustrus Fond, Lily Benthine Lunds Fond, cand.jur. Torkil Steenbeck's Legat, Ville Heises Legat, Sygekassernes Helsefond (11/076-91, 11/027-92, 11/062-93), Lægeforeningens Forskningsfond (J.086.51) og Direktør Madsens og hustru Olga Madsens Fond samt fra National Institute of Dental Research (R01 DE 11948-01A1). Jeg skylder *David Gaist* og *Birgit Wich* tak for hjælp med at lave figurerne. Jeg har haft stor glæde af inspirerende diskussioner med *Olga Basso*, *Karen Brøndum-Nielsen*, *Poul Fogh-Andersen*, *Niels V. Holm*, *Bernard Jeune*, *Laura Mitchell*, *Jeff Murray*, *Jørn Olsen* og *James W. Vaupel*. Jeg skylder en stor tak til *Kirsten Pagh* for sproglig bearbejdelse af manuskriptet.

English summary

The 20th Century Danish facial cleft population. Epidemiological and genetic-epidemiological studies

Since *Poul Fogh-Andersen's* legendary doctorate thesis from 1942, the Danish facial cleft population has been one of the most extensively studied in terms of epidemiology and genetic-epidemiology. The etiology of cleft lip and/or palate (CLP) is still largely an enigma, and different results concerning environmental and genetic risk factors are being obtained in different countries and regions. This may be due to etiological heterogeneity between settings. Therefore, an in-depth studied area with an ethnically homogeneous population – such as Denmark – provides one of the best opportunities for progress in CLP etiological research. The present review summarizes epidemiological and genetic-epidemiological studies conducted in the 20th Century Danish facial cleft population. Furthermore, analyses of gender differences, time trends and seasonality for more than 7000 CLP cases born in Denmark in the period 1936-87 are presented. The review also points towards the excellent opportunities for continued etiological CLP research in Denmark in the 21st Century using already established resources and an on-going prospective cohort study of 100,000 pregnant women.

Litteratur

1. Wyszinsky D, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniofac J* 1996; 33: 406-17.
2. Murray J. Face facts: genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 227-32.
3. Wyszinsky D, Beaty TH, Review of the role of potential teratogenes in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology* 1996; 53: 309-17.
4. Mitchell LE. Genetic epidemiology of birth defects: nonsyndromic cleft lip and neural tube defects. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 61-8.
5. Rothman KJ. *Modern epidemiology*. Boston: Little, Brown; 1986.
6. Altshuler D, Kruglyak L, Lander E. Genetic polymorphisms and disease. *New Engl J Med* 1998; 338: 1626.
7. Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen: Arnold Busck; 1942.
8. Fogh-Andersen P. Incidence of cleft lip and palate: Constant or increasing? *Acta Chir Scand* 1961; 22: 106-11.
9. Fogh-Andersen P. Genetic and non-genetic factors in the etiology of facial clefts. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1967; 1: 22-9.
10. Jensen BL, Kreiborg S, Dahl E, Fogh-Andersen P. Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: Epidemiology, variability, and early somatic development. *Cleft Palate J* 1988; 25: 258-69.
11. Melnick M, Bixler D, Fogh-Andersen P, Conneally PM. Cleft lip +/- cleft palate: An overview of the literature and an analysis of Danish cases born between 1941 and 1968. *Am J Med Genet* 1980; 6: 83-97.
12. Shields ED. Cleft palate: A genetic and epidemiologic investigation. (Thesis). Indiana University; 1978.
13. Christensen K, Fogh-Andersen P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet* 1993; 47: 910-6.
14. Christensen K, Fogh-Andersen P. Isolated cleft palate in Danish multiple births, 1970-1990. *Cleft Palate J* 1993; 30: 469-74.
15. Christensen K, Fogh-Andersen P. Etiological subgroups in non-syndromic isolated cleft palate? A genetic-epidemiological study of 52 Danish birth cohorts. *Clin Genet* 1994; 46: 329-35.
16. Christensen K, Schmidt MM, Væth M, Olesen J. Absence of an environmental effect on the recurrence of facial-cleft defects. *New Engl J Med* 1995; 333: 161-4.
17. Mitchell LE, Christensen K. Analysis of the recurrence patterns for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the families of 3,073 Danish probands. *Am J Med Genet* 1996; 61: 371-6.
18. Christensen K, Mitchell LE. Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate – a Danish registry study. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 182-90.
19. Olsen J, Schmidt MM, Christensen K. Evaluation of nature-nurture impact on reproductive health using half-siblings. *Epidemiology* 1997; 8: 6-11.
20. Christensen K, Holm NV, Olsen J, Kock K, Fogh-Andersen P. Selection bias in genetic-epidemiological studies of cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 654-9.
21. The International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. *Congenital malformations worldwide*. Amsterdam: Elsevier; 1991.
22. Stoll C. Distribution of single organ malformations in European populations. *Ann Genet* 1995; 38: 32-43.
23. Fraser FC, Gwyn A. Seasonal variation in birth date of children with cleft lip. *Teratology* 1998; 57: 93-5.
24. Fraser FC. Some underlooked properties of the multifactorial/threshold model. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1262-5.
25. NOMESKO (Nordic Medico-Statistical Committee). *Birth and infant mortality in the Nordic countries*. Copenhagen: NOMESKO 39: 1993.
26. Enemark H, Bolund S, Jørgensen I, Path S. Evaluation of unilateral cleft lip and palate treatment: Long term results. *Cleft Palate J* 1990; 27: 354-61.
27. Marazita ML, Spence MA, Melnick M. Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Danish kindreds. *Am J Med Genet* 1984; 19: 9-18.
28. Marazita ML, Spence MA, Melnick M. Major gene determination of liability to cleft lip with or without cleft palate: A multiracial

- view. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1986; 2: 89-97.
29. Chung CS, Bixler D, Watanabe T, Koguchi H, Fogh-Andersen P. Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: A comparison of Danish and Japanese data. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 603-11.
 30. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multi-locus models. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 222-8.
 31. Bixler D, Fogh-Andersen P, Conneally PM. Incidence of cleft lip and palate in the offspring of cleft parents. *Clin Genet* 1971; 2: 155-9.
 32. Shields ED, Bixler D, Fogh-Andersen P. Cleft palate: A genetic and epidemiological investigation. *Clin Genet* 1981; 20: 13-24.
 33. Brøndum-Nielsen K, Christensen K. Chromosome 22q11 deletion and other chromosome aberrations in cases with cleft palate, congenital heart defects and/or mental disabilities. A survey based on the Danish facial cleft register. *Clin Genet* 1996; 50: 116-20.
 34. Smith C. Concordance in twins: methods and interpretation. *Am J Hum Genet* 1974; 26: 454-66.
 35. Neale MC, Cardon LR. *Methodology for genetic studies of twins and families*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1992.
 36. Mitchell LE, Christensen K. Evaluation of family history data for Danish twins with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet* 1997; 72: 120-1.
 37. Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip and palate with or without cleft palate: A reanalysis. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 323-32.
 38. Lie RT, Wilcox AJ, Skjærven R. Risk of recurrence of birth defects. *New Engl J Med* 1994; 331: 1309-10.
 39. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS, editors. *Syndromes of the head and neck*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1990.
 40. Friis ML. Facial clefts and congenital heart defects in children of parents with epilepsy: genetic and environmental etiological factors. *Acta Neurol Scand* 1989; 79: 433-59.
 41. Christensen K, Olsen J, Nørgaard-Pedersen B, Basso O, Støvring H, Milhollin-Johnson L, et al. Oral clefts, transforming-growth-factor-alpha gene variants, and maternal smoking. A population based case-control study in Denmark 1991-1994. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 248-55.
 42. Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, et al. Association study of transforming growth factor alpha (TGFA) TaqI polymorphism and oral clefts: indication and gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol* 1995; 141: 629-36.
 43. Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 551-61.
 44. Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S, Milunsky A. Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 1995; 333: 1369-73.
 45. Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with or without cleft palate: Associations with the transforming growth factor-alpha and retinoic acid receptor. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1377-85.
 46. Nørgaard-Pedersen B, Høgdall E, Iitiae A, Arends J, Dahlen P, Vuust J. Immunoreactive trypsin and a comparison of two AF508 mutation analyses in newborn screening for cystic fibrosis: an anonymous pilot study in Denmark. *Screening* 1993; 2: 1-11.
 47. Eiberg H, Bixler D, Nielsen LS, Conneally PM, Mohr J. Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet* 1987; 32: 129-32.
 48. Davies AF, Stephens RJ, Olavesen MG, Heather L, Dixon MJ, Magee A, et al. Evidence of a locus for orofacial clefting on human chromosome 6p24 and STS content map of the region. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 121-8.
 49. Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, et al. Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 337-9.
 50. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berne A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in human genome. *Science* 1998; 280: 1077-81.
 51. Freeman B, Powell J, Ball D, Hill L, Craig I, Plomin R. DNA by mail: An inexpensive and noninvasive method for collecting DNA samples from widely dispersed populations. *Bet Genet* 1997; 27: 251-7.
 52. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993; 52: 506-16.
 53. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science* 1994; 264: 1936-8.
 54. Goldberg R, Motzkin B, Marion R, Scambler PJ, Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: A review of 120 patients. *Am J Med Genet* 1993; 45: 313-9.
 55. Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.
 56. Dronamraju KR, Bixler D, Majumder PP. Fetal mortality associated with cleft lip and cleft palate. *Johns Hopkins Med J* 1982; 151: 287-9.
 57. Clementi M, Tenconi R, Forabosco P, Calzolari E, Milan M. Inheritance of cleft palate in Italy. Evidence for a major autosomal recessive locus. *Hum Genet* 1997; 100: 204-7.
 58. Werler MM, Pober BR, Nelson K, Holmes LB. Reporting accuracy among mothers of malformed and non-malformed infants. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 415-21.

Forfatter

Kaare Christensen, forskningsprofessor, dr.med.

Epidemiologi, Institut for Sundhedstjenesteforskning, Syddansk Universitet, Odense Universitet