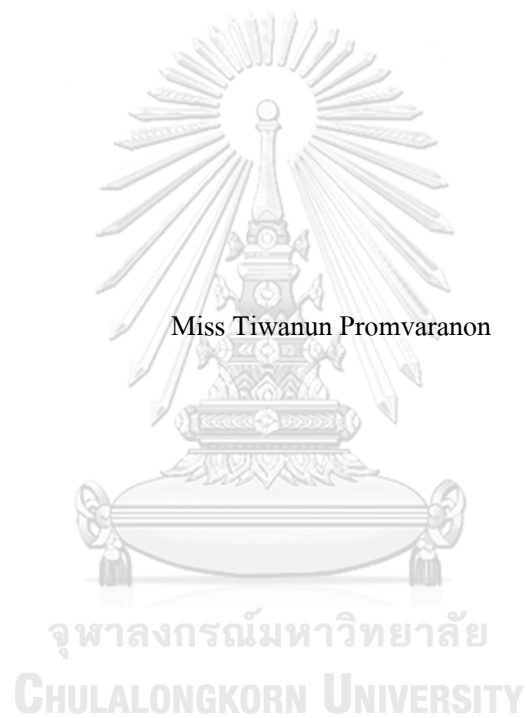


การศึกษาอุบัติการณ์การเกิดภาวะแทรกซ้อนทางผิวหนัง จุลชีพและเพปโตไคด์ต้านจุลชีพของผิวหนัง
ผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยาขับยั้งการทำงาน
ของอิพิเดอร์มอลโกรทแฟคเตอร์รีเซพเตอร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Study of Incidence of Cutaneous Complications, Skin Microbiota and Antimicrobial Peptides
in Advanced Solid Cancer Patient Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาอุบัติการณ์การเกิดภาวะแทรกซ้อนทางผิวหนัง
จุดชีพและเพปไทด์ต้านจุดชีพของผิวหนังผู้ป่วยมะเร็งก้อน
ระยะกระจายที่ได้รับยาขับยั้งการทำงานของอิพิเคอร์มอล
โกรทแฟคเตอร์รีเซพเตอร์

โดย

น.ส.ทิวานันท์ พรหมวรานนท์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ นายแพทย์ชนันท์ กำธรรัตน์

อาจารย์ ดร. นายแพทย์ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสุทธ์ กตเวทิน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิตร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์ชนันท์ กำธรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. นายแพทย์ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชล)

กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ไอศวรรย์ เพชรล่อเหลียน)

กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์พัลลภ จักรวิทย์ธำรง)

ทิวานันท์ พรหมวรานนท์ : การศึกษาอุบัติการณ์การเกิดภาวะแทรกซ้อนทางผิวหนัง จุลชีพและเพปไทด์ต้านจุลชีพของผิวหนังผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยาขับยั้งการทำงานของอีพีเคอร์มอลโกรทแฟคเตอร์รีเซพเตอร์. (The Study of Incidence of Cutaneous Complications, Skin Microbiota and Antimicrobial Peptides in Advanced Solid Cancer Patient Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. พญ.ภาวิณี ฤกษ์นิมิตร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. นพ.ชนันท์ กำธรรัตน์, อ. ดร. นพ.ดิเรกฤทธิ์ เชื้อวงษ์

ที่มา: ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดจากยาขับยั้งการทำงานของอีพีเคอร์มอลโกรทแฟคเตอร์รีเซพเตอร์ (EGFR inhibitors) มักพบการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นส่วนมาก อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุได้แน่ชัด และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับ skin microbiota ในผู้ป่วยกลุ่มนี้มาก่อน

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota และ antimicrobial peptides ที่ผิวหนังของผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับ EGFR inhibitors เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับยาเป็นระยะเวลา 1 เดือน และ 6 เดือน

วิธีการศึกษา: รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับ EGFR inhibitors จำนวน 19 คน เก็บตัวอย่างจากแก้มซอกเล็บนิ้วโป้งและซอกเล็บนิ้วกลางเท่า ส่งวิเคราะห์ skin microbiota ด้วย 16S rRNA gene sequencing และเก็บตัวอย่างจากแก้มโดยเทคนิค tape stripping ส่งวิเคราะห์ total protein และ hBD-3, RNase7 ด้วยวิธี micro bicinchoninic (BCA) protein assay kit และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และวัด biophysical properties ของผิวหนัง ที่ก่อนได้รับยา และหลังได้รับยาเป็นระยะเวลา 1 และ 6 เดือน

ผลการศึกษา: เมื่อเปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับยาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ผล 16S rRNA gene sequencing จากผู้ป่วยจำนวน 8 คน พบว่าความชุกชุมสัมพัทธ์ของไฟลัม Actinobacteria มีค่าเพิ่มมากขึ้น ส่วนไฟลัม Bacteroidetes มีค่าลดลง และผล ELISA จากผู้ป่วยจำนวน 15 คน พบว่า RNase7 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = .0267$) ในขณะที่ hBD-3 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผล: EGFR inhibitors มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota และ RNase7 ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดผลข้างเคียงทางผิวหนังและการติดเชื้อที่พบได้ในผู้ป่วยที่ได้รับยานี้

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6174050330 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: EGFR inhibitors, skin microbiota, antimicrobial peptides, tape stripping

Tiwanun Promvaranon : The Study of Incidence of Cutaneous Complications, Skin Microbiota and Antimicrobial Peptides in Advanced Solid Cancer Patient Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. Advisor: Assoc. Prof. Pawinee Rerknimitr, M.D., MSc. Co-advisor: CHANAT KUMTORNRUT, M.D., MSc., Direkrit Chiewchengchol, M.D., Ph.D.

Background: An increased risk of *Staphylococcus aureus* infection in cutaneous adverse events from epidermal growth factor receptor inhibitors (EGFR inhibitors) has not been clearly described. The information regarding the skin microbiota in these patients remain scarce.

Objective: To study and compare the skin microbiota and antimicrobial peptides changes in the skin of the patients with cancer treated with EGFR inhibitors before, and at one and six months after the treatment.

Materials and methods: This prospective study collected skin samples from 19 patients with advanced solid cancer who were treated with EGFR inhibitors. The skin swabs specimens were taken from the cheeks, first and third toes at baseline, month 1 and 6 after the treatment. The samples underwent rRNA gene sequencing. In addition, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit were employed to demonstrate the level of AMPs namely human β -defensin 3 (hBD3) and ribonuclease 7 (RNase 7) from tape stripping samples on cheek.

Results: rRNA sequencing results from 8 patients showed changes in the skin microbiota. Phylum Actinobacteria was increase from the baseline. On the contrary, phylum Bacteroidetes was decrease from the baseline. ELISA results from 15 patients showed significantly decreased in RNase 7 while hBD3 remained stable.

Conclusion: EGFR inhibitors induced changes in the skin microbiota and RNase 7. These might lead to the cutaneous side effects arising from these drugs.

Field of Study: Medicine

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถเกิดขึ้นและสำเร็จลุล่วงได้จากความเมตตา และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภาวิณี ฤกษ์นิมิตร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ให้แนวคิดริเริ่มงานวิจัย และเสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ ผู้ให้คำแนะนำในเรื่องการเก็บตัวอย่างและการส่งตรวจทางจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมทุกท่าน ได้แก่ อาจารย์ ดร.นายแพทย์ดิเรกฤทธิ์ เชี่ยวเชิงชด และอาจารย์ นายแพทย์ ชนัทธ์ กำธรรัตน์ ผู้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณแพทย์และพยาบาลแผนกมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ให้ความร่วมมือในการรวบรวมผู้ป่วยและติดต่อประสานงาน ขอบพระคุณผู้ป่วยและญาติทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมวิจัยครั้งนี้

ขอบพระคุณนิติปรัชญาเอก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, นิติปรัชญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเจ้าหน้าที่สาขาตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดเวลาที่ทำงานวิจัยฉบับนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ทิวานันท์ พรหมวรานนท์

สารบัญ

	หน้า
.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.4 สมมุติฐาน.....	2
1.5 กรอบแนวความคิด	3
1.6 คำสำคัญ.....	4
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.8 รูปแบบการวิจัย.....	10
1.9 ปัญหาทางจริยธรรม.....	10
1.10 ข้อจำกัดทางการวิจัย	10
1.11 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	11
1.12 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข	11
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	12
งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ skin microbiota	12

งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ antimicrobial peptides	17
งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลข้างเคียงทางผิวหนังจากการได้รับยา EGFR inhibitors	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย	21
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย.....	24
3.3 การรวบรวมข้อมูล	27
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	51
อภิปรายผล.....	51
จุดแข็งของการวิจัย	55
ข้อจำกัดในการวิจัย	56
สรุปผล.....	56
ข้อเสนอแนะ.....	57
บรรณานุกรม	58
ประวัติผู้เขียน	64

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย (Background and rationale)

ยาพุ่งเป้า (Targeted therapy) ซึ่งออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงในระดับโมเลกุลของเซลล์มะเร็ง เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นปัญหาหลักของผู้สูงอายุในประเทศไทย และหนึ่งใน targeted therapy ที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดในปัจจุบันคือยาในกลุ่ม EGFR Inhibitors ที่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งหลายชนิดในระยะลุกลาม (Advanced stage) เช่น มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung, มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colorectal cancer) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยาในกลุ่ม EGFR inhibitors มีผลข้างเคียงที่สำคัญคือทำให้เกิดความผิดปกติของผิวหนังได้หลายแบบ เช่น ผื่นผิวหนังที่หน้าและตัว (Acneiform eruption), ผิวแห้ง (Xerosis), เนื้อขอบเล็บนิ้วเท้าอักเสบ (Paronychia) เป็นต้น ซึ่งเป็นผลข้างเคียงที่คาดการณ์ได้ มีการศึกษาโดยการนำหนองจากผื่นระยะ late phase และซอกเล็บที่มีการอักเสบของผู้ป่วยที่ได้รับยาไปเพาะเชื้อพบเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งหมด ซึ่งในภาวะปกติแล้วผิวหนังซึ่งเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายนั้น ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่เป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่หลายชนิด รวมเรียกว่า skin microbiota ซึ่งหมายรวมทั้งแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา การได้รับยาที่มีผลในการยับยั้ง EGFR น่าจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota และ antimicrobial peptides (AMPs) จนทำให้เกิดความผิดปกติทางผิวหนังดังกล่าวได้ จึงเป็นที่มาของการทำวิจัยฉบับนี้ เพื่อศึกษาถึง skin microbiota ที่เปลี่ยนไป ในผู้ป่วยที่ได้รับยาในกลุ่ม EGFR Inhibitors นอกจากนี้ยังศึกษาเรื่อง antimicrobial peptides ที่เปลี่ยนแปลงไป และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับยา เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เพื่อต่อยอดในทางคลินิกต่อไป

1.2 คำถามของการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary research question)

ความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative abundance) ของ *Staphylococcus aureus* ที่ตรวจพบจากผิวหนังบริเวณใบหน้าของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีความแตกต่างจากก่อนได้รับยาหรือไม่ อย่างไร

คำถามรอง (Secondary research question)

1. ความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative abundance) ของ *Staphylococcus aureus* ที่ตรวจพบจากผิวหนังบริเวณซอกเล็บเท้าของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะ 6 เดือน มีความแตกต่างจากก่อนได้รับยาหรือไม่ อย่างไร
2. Skin microbiota ที่ตรวจพบจากผิวหนังของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 1 เดือน และ 6 เดือน มีความแตกต่างจากก่อนได้รับยาหรือไม่ อย่างไร
3. Antimicrobial peptides ได้แก่ human β -defensin-3 (hBD-3) และ ribonuclease 7 (RNase7) ของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีความแตกต่างจากก่อนได้รับยาหรือไม่ อย่างไร
4. EGFR inhibitors มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผิวหนัง (Biophysical properties of the skin) ได้แก่ ความยืดหยุ่นของผิวหนัง (Skin elasticity), ความชุ่มชื้นของผิวหนัง (Skin moisture), ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง (Transepidermal water loss; TEWL), ปริมาณไขมันบนผิวหนัง (Sebum), เฉดสีของผิวหนัง (Skin color) และความเป็นกรดต่างของผิวหนัง (Skin pH) อย่างไรบ้าง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1. เพื่อศึกษาถึงผลของยา EGFR inhibitors ต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota ที่ผิวหนังของผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยานี้
2. เพื่อศึกษาถึงผลของยา EGFR inhibitors ต่อการเปลี่ยนแปลงของ hBD-3 และ RNase7 ที่ผิวหนังของผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยานี้
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผิวหนัง (Biophysical properties of the skin) ได้แก่ ความยืดหยุ่นของผิวหนัง, ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง, ปริมาณไขมันบนผิวหนัง, เฉดสีของผิวหนัง และความเป็นกรดต่างของผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors

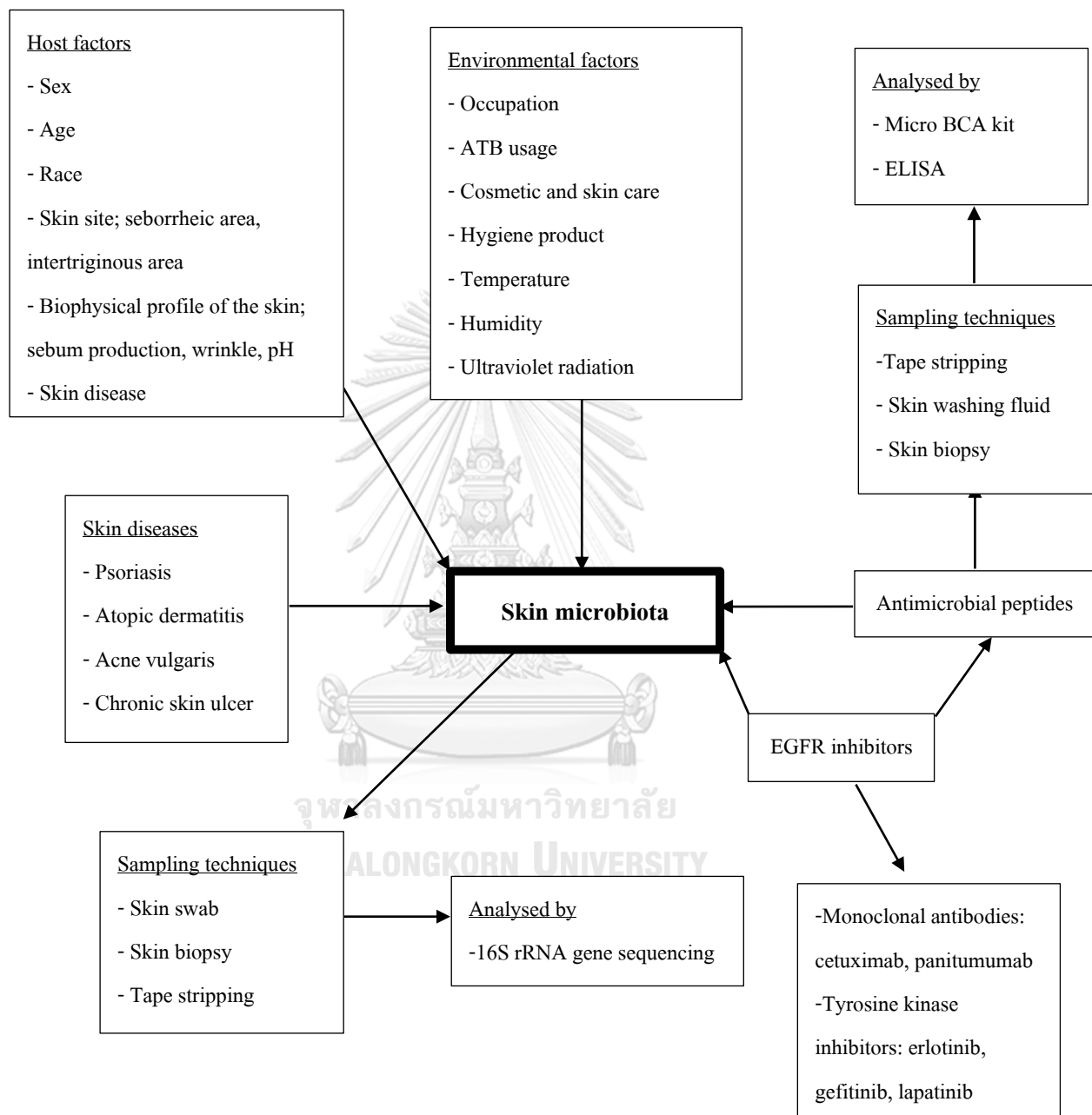
1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis)

H0: ผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน ตรวจพบความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative abundance) ของ *Staphylococcus aureus* ไม่แตกต่างจากก่อนได้รับยา

H1: ผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะกระจายที่ได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน ตรวจพบความชุกชุมสัมพัทธ์ (Relative abundance) ของ *Staphylococcus aureus* แตกต่างจากก่อนได้รับยา

1.5 กรอบแนวความคิด (Conceptual framework)

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย



1.6 คำสำคัญ (Key words)

EGFR inhibitors

Skin microbiota

Antimicrobial peptides

Tape stripping

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition)

1. ผู้ป่วย หมายถึง ผู้ป่วยชาวไทย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งก้อนระยะแพร่กระจาย (advanced solid tumor) และเข้ารับการรักษากับแผนกมะเร็งวิทยาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. Skin microbiota หมายถึง แบคทีเรียที่ตรวจพบจากการใช้ไม้พ่นสำลีชุบสารละลายป้ายบนผิวหนังบริเวณแก้ม และซอกเล็บเท้าของผู้ป่วย
3. จำแนกความรุนแรงของความผิดปกติทางผิวหนังชนิด acneiform eruption, paronychia, hypertrichosis, alopecia, dry skin โดยใช้เกณฑ์ Common Terminology Criteria for Adverse Event Version 4.0
4. จำแนกความรุนแรงของความผิดปกติทางเยื่อช่องปาก (oral mucositis) และ ความรุนแรงของความผิดปกติทางระบบทางเดินอาหาร ภาวะอุจจาระร่วง (diarrhea) โดยใช้เกณฑ์ Common Terminology Criteria for Adverse Event Version 4.0

ตารางที่ 1 แสดงการจัดลำดับความรุนแรงของ acneiform eruption ตามเกณฑ์ Common Terminology
Criteria for Adverse Event Version 4.0

Grading (CTCAE version 4.0)					
Skin lesion	1	2	3	4	5
Acneiform eruption	Papules and/or pustules covering <10% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness	Papules and/or pustules covering 10 - 30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness; associated with psychosocial impact; limiting instrumental ADL	Papules and/or pustules covering >30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness; limiting selfcare ADL; associated with local superinfection with oral antibiotics indicated	Papules and/or pustules covering any % BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness and are associated with extensive superinfection with IV antibiotics indicated; life-threatening consequences	Death

ตารางที่ 2 แสดงการจัดลำดับความรุนแรงของ paronychia ตามเกณฑ์ Common Terminology Criteria for Adverse Event Version 4.0

Grading (CTCAE version 4.0)					
Skin lesion	1	2	3	4	5
Paronychia	Nail fold edema or erythema; disruption of the cuticle	Localized intervention indicated; oral intervention indicated (e.g., antibiotic, antifungal, antiviral); nail fold edema or erythema with pain; associated with discharge or nail plate separation; limiting instrumental ADL	Surgical intervention or IV antibiotics indicated; limiting selfcare ADL	-	-

ตารางที่ 3 แสดงการจัดลำดับความรุนแรงของ hypertrichosis ตามเกณฑ์ Common Terminology Criteria for Adverse Event Version 4.0

Grading (CTCAE version 4.0)					
Skin lesion	1	2	3	4	5
Hypertrichosis	Increase in length, thickness or density of hair that the patient is either able to camouflage by periodic shaving or removal of hairs or is not concerned enough about the overgrowth to use any form of hair removal	Increase in length, thickness or density of hair at least on the usual exposed areas of the body [face (not limited to beard/moustache area) plus/minus arms] that requires frequent shaving or use of destructive means of hair removal to camouflage; associated with psychosocial impact	-	-	-

ตารางที่ 4 แสดงการจัดลำดับความรุนแรงของ alopecia และ dry skin ตามเกณฑ์ Common Terminology
Criteria for Adverse Event Version 4.0

Grading (CTCAE version 4.0)					
Skin lesion	1	2	3	4	5
Alopecia	Hair loss of <50% of normal for that individual that is not obvious from a distance but only on close inspection; a different hair style may be required to cover the hair loss but it does not require a wig or hair piece to camouflage	Hair loss of \geq 50% normal for that individual that is readily apparent to others; a wig or hair piece is necessary if the patient desires to completely camouflage the hair loss; associated with psychosocial impact	-	-	-
Dry skin	Covering <10% BSA and no associated erythema or pruritus	Covering 10 - 30% BSA and associated with erythema or pruritus; limiting instrumental ADL	Covering >30% BSA and associated with pruritus; limiting self-care ADL	-	-

ตารางที่ 5 แสดงการจัดลำดับความรุนแรงของ oral mucositis และ diarrhea ตามเกณฑ์ Common Terminology Criteria for Adverse Event Version 4.0

Grading (CTCAE version 4.0)					
Side effects	1	2	3	4	5
Oral mucositis	Asymptomatic or mild symptoms; intervention not indicated	Moderate pain; not interfering with oral intake; modified diet indicated	Severe pain; interfering with oral intake	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death
Diarrhea	Increase of <4 stools per day over baseline; mild increase in ostomy output compared to baseline	Increase of 4 - 6 stools per day over baseline; moderate increase in ostomy output compared to baseline	Increase of ≥ 7 stools per day over baseline; incontinence; hospitalization indicated; severe increase in ostomy output compared to baseline; limiting selfcare ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death

1.8 รูปแบบการวิจัย (Research design)

การศึกษาแบบการวิจัยเชิงวิเคราะห์แบบไปข้างหน้า (Prospective cohort study)

1.9 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

หลักความเคารพในบุคคล (respect for person)

มีการขอความยินยอมจากผู้ป่วยเพื่อเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครสำหรับการวิจัย ซึ่งการวิจัยนี้เป็นการศึกษาจากเวชระเบียนเป็นหลัก ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะถูกรักษาเป็นความลับ โดยจะนำเสนอข้อมูลในภาพรวม แต่ไม่มีการระบุข้อมูลส่วนบุคคลของผู้ป่วย

หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence)

การวิจัยนี้มีความเสี่ยงเพียงเล็กน้อยกับอาสาสมัคร ความลับของอาสาสมัครอาจถูกเปิดเผย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของอาสาสมัคร โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifiers ที่ระบุถึงตัวอาสาสมัคร การวิจัยนี้มีประโยชน์ต่ออาสาสมัครในแง่ที่จะได้รับการรักษาและตรวจติดตามกับแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางผิวหนังโดยตรง นอกจากนี้ยังมีประโยชน์แก่ผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors รายอื่นๆ เนื่องจากเป็นการศึกษา skin microbiota และ antimicrobial peptides ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อส่งเสริมหรือป้องกันการติดเชื้อ และความผิดปกติอื่นๆที่ผิวหนัง ซึ่งอาจนำไปสู่การนำ prophylaxis treatment เข้ามาใช้เพื่อลดความรุนแรงของผื่น ช่วยทำให้แพทย์สามารถใช้ยากลุ่มนี้ต่อไปได้ และเพิ่ม compliance ของผู้ป่วยต่อยา

หลักความยุติธรรม (justice)

การศึกษานี้มีเกณฑ์การคัดเลือกและออกชัดเจน อนึ่งตามพระราชบัญญัติสุขภาพแห่งชาติ พ.ศ.2550 ที่ผู้วิจัยต้องขอความยินยอมจากผู้ป่วย แต่เมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อใช้เวชระเบียนของผู้ป่วย

1.10 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation)

การวิจัยนี้มีข้อจำกัดในแง่ที่ว่าเป็นการวิจัยแบบ prospective cohort study โดยมีระยะเวลาประมาณ 18 เดือน จึงต้องอาศัยความร่วมมือของคนไข้ในการมาตรวจติดตามกับแผนกผิวหนังอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากคนไข้ไม่ได้มีอาการแสดงทางผิวหนังที่รุนแรงอาจไม่สามารถมาตรวจติดตามต่อเนื่องได้ จึงอาจทำให้ข้อมูลคนไข้ที่เก็บได้ไม่ตรงกับของประชากรเป้าหมายจริง

1.11 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected benefit and application)

ทำให้ทราบถึง skin microbiota และ antimicrobial peptides ที่เปลี่ยนแปลงไปในผิวหนังของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors ซึ่งเป็นข้อมูลที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน มีประโยชน์ในแง่การรักษาและการป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังได้ ทั้งนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปสู่การศึกษาวิจัยต่อยอดได้

1.12 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

อาจเกิดอุปสรรคจากข้อจำกัดเรื่องความร่วมมือของผู้ป่วยในการมาตรวจติดตามกับแผนกผิวหนังอย่างต่อเนื่อง ทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่ครบถ้วน ซึ่งอาจแก้ปัญหานี้โดย

1. ชี้แจงเรื่องประโยชน์ที่ตัวผู้ป่วยเองจะได้รับจากการมาตรวจติดตามกับแพทย์ผิวหนัง เพื่อเก็บข้อมูลวิจัย ให้ผู้ป่วยได้รับทราบตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษา
2. กำหนดวันนัดให้เป็นวันเดียวกัน หรือใกล้เคียงกับวันที่ผู้ป่วยต้องมาตรวจติดตามกับแผนกมะเร็งวิทยา เพื่อความสะดวกในการเดินทางของผู้ป่วย โดยให้มีระยะเวลาคลาดเคลื่อนจากวันครบกำหนดเก็บตัวอย่างได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์
3. มีระบบติดตามผู้ป่วยเป็นระยะเช่น การโทร หรือส่งข้อความแจ้งเตือนเมื่อใกล้ถึงวันนัด เป็นต้น

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ skin microbiota

Skin microbiota หมายถึง สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่บนผิวหนัง ประกอบไปด้วยแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และปรสิต ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 10^7 cells/cm² (1) สิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาศัยอยู่บนผิวหนังโดยไม่ก่อโรค นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสสมดุลของผิวหนังด้วย แบคทีเรียบางชนิดที่เป็น skin microbiota สามารถสร้างสารมาทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่จะมาก่อโรคได้ โรคผิวหนังบางชนิดมีความสัมพันธ์กับสมดุลของ skin microbiota ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น psoriasis ที่พบความหลากหลายของ skin microbiota น้อยกว่าคนปกติ ส่วน atopic dermatitis พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่มากขึ้น และพบเชื้อ *Cutibacterium acnes* ในผิวหนังคนที่เป็นสิวมากกว่าผิวหนังคนที่ไม่เป็นสิว เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota ได้แก่ เพศ, อายุ, เชื้อชาติ, ตำแหน่งของผิวหนัง, สภาพทั่วไปของผิวหนังเช่น ความมัน ความชื้น, การดูแลสภาพผิว เช่น การใช้ครีมชุ่มชื้น การแต่งหน้า, การใช้ยาปฏิชีวนะ(2) เป็นต้น

- Naraporn Somboonna และคณะ(2017)(3)ได้ศึกษา skin microbiome จากการทำ skin swab บริเวณแก้มทั้ง 2 ข้าง และหน้าผากของผู้หญิงไทย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ วัยรุ่นที่มีสภาพผิวปกติ(teenage healthy), วัยรุ่นที่เป็นสิวม(teenage acne) และ ผู้สูงอายุที่มีสภาพผิวปกติ(elderly healthy) พบว่าในกลุ่ม teenage healthy และ teenage acne มี skin microbiome ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม elderly healthy บ่งบอกถึงปัจจัยของอายุต่อการมี skin microbiome ที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังพบความคล้ายคลึงกันของ skin microbiome ระหว่างกลุ่ม teenage acne และกลุ่ม elderly healthy มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม teenage healthy และกลุ่ม elderly healthy ซึ่งจากการตรวจสภาพทั่วไปของผิวหนังพบว่าในกลุ่ม teenage acne และกลุ่ม elderly healthy มีความชุ่มชื้นของผิวหนังน้อย ร่วมกับความหยาบและริ้วรอยของผิวมากกว่ากลุ่ม teenage healthy จึงเชื่อว่าสภาพผิวที่แตกต่างกันอาจทำให้มี skin microbiome ที่แตกต่างกันได้

ผู้เขียนยังได้ศึกษาเปรียบเทียบ skin microbiome ที่เก็บจากผิวหนังของผู้หญิงชาวไทยกับผู้หญิงชาว USA ในอายุที่ใกล้เคียงกัน พบว่ามีความแตกต่างกันในสปีชีส์หลักที่ตรวจพบ

โดยสรุปแล้ว skin microbiome มีความแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ สภาพทั่วไปของผิวหนัง เช่น ความมัน ความชุ่มชื้นของผิวหนัง เป็นต้น

- Alisa Wilantho และคณะ(2017)(4) ได้ทำการศึกษา skin microbiome เก็บตัวอย่างจาก แก้ม และหน้าผากของชายไทย 40 คน โดยแบ่งออกตามกลุ่มอายุเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ วัยรุ่น(teenage healthy), วัยรุ่นที่เป็นสิว(teenage acne), วัยกลางคน(middle-aged healthy) และ วัยสูงอายุ(elderly healthy) เมื่อแบ่งตามไฟลัมพบว่า Proteobacterium พบมากที่สุด ในวัยกลางคนและสูงอายุ ส่วน วัยรุ่นจะพบ Actinobacteria และ Firmicutes เป็นส่วนใหญ่ ในระดับ genus พบ *Cutibacterium spp.* พบมากในวัยรุ่น *Staphylococcus spp.* และ *Corynebacterium spp.* พบมากในวัยกลางคนและสูงอายุ

นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบระหว่างชาวไทยและชาวอังกฤษที่อายุเทียบเท่ากัน พบว่ามี skin microbiome ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบไฟลัม Proteobacteria เด่นในชาวไทย และไฟลัม Actinobacteria เด่นในชาวอังกฤษ

จึงสรุปได้ว่า skin microbiome นั้นมีความแตกต่างกันโดยขึ้นกับหลายปัจจัย ทั้ง อายุ ชนิด และสภาพทั่วไปของผิวหนัง เชื้อชาติ และสภาพแวดล้อม

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง skin swab ใช้ผู้เก็บตัวอย่างคนเดิมตลอดการวิจัยเพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด ผู้เข้ารับการตรวจจะต้องไม่รับประทานยาฆ่าเชื้ออย่างน้อย 3 วัน และไม่ทายาฆ่าเชื้ออย่างน้อย 7 วัน งดเว้นจากการล้างหน้าอย่างน้อย 8 ชั่วโมง เก็บ skin swab โดยปาดเป็นพื้นที่ขนาด 1 ตารางนิ้ว บริเวณหน้าผาก และแก้มทั้ง 2 ข้าง จากนั้นนำ swab เก็บในสารละลาย sterile saline-Tween solution (0.15 M NaCl and 0.1% (v/v) Tween 20) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C และนำไปสกัดหา bacterial DNA ภายใน 14 วัน

- Wanfang ZHAI และคณะ(2018)(5) ได้ศึกษา skin microbiome ในประชากรจีนทั้งหมด 50 คน แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ เด็ก(children), วัยรุ่น(adolescents), ผู้ใหญ่ตอนต้น(young adults), วัยกลางคน(middle-aged adults) และผู้สูงอายุ(elderly) ในแต่ละกลุ่มเก็บ skin swab 3 ตำแหน่ง ได้แก่ แก้ม หลังส่วนบน และแขนบริเวณ forearm จากนั้นนำ swab ที่ไปสกัดเพื่อหา RNA ของเชื้อแบคทีเรีย

พบว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ผิวหนังหลักๆ 5 ไฟลัม ได้แก่ Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Cyanobacteria ปัจจัยที่มีผลต่อ skin microbiome ได้แก่ ตำแหน่งของผิวหนัง และสภาพทั่วไปของผิวหนังบริเวณนั้นๆ เช่น ในผิวมัน ซึ่งพบบริเวณหลังส่วนบน และที่แก้มในคนวัยรุ่นถึงวัยผู้ใหญ่ จะพบเชื้อ *Cutibacterium spp.* ได้มาก ส่วนในผิวแห้ง ได้แก่ แขนบริเวณ forearm และผิวหนังของผู้สูงอายุ จะพบความหลากหลายของเชื้อได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ปัจจัยเรื่องฮอร์โมน มีส่วนเกี่ยวข้องเช่นกัน ตามที่ได้กล่าวไปแล้ว ความมันของผิวหนังใบหน้าและบริเวณอื่นๆ เกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมน ซึ่งมักสูงในช่วงวัยรุ่น

ถึงวัยผู้ใหญ่ จึงพบเชื้อ *Cutibacterium spp.* ได้มากกว่าวัยอื่นเมื่อเปรียบเทียบจากตำแหน่งเดียวกัน นอกจากนี้เพคก็่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อ skin microbiome โดยเพศชายพบความหลากหลายของสปีชีส์มากกว่าเพศหญิง

- Hsin-Wen Chang และคณะ(2018)(6) ได้ศึกษา skin microbiome ในผู้ป่วย psoriasis เทียบกับ healthy control โดยทำ skin swab จาก lesional psoriatic skin, non-lesional psoriatic skin ของผู้ป่วย psoriasis และ normal skin ของ healthy control พบว่ามี *Staphylococcus aureus* เพิ่มขึ้นทั้งใน lesional psoriatic skin และ non-lesional psoriatic skin ในทางตรงกันข้าม *Staphylococcus epidermidis* และ *Cutibacterium acnes* ของ lesional psoriatic skin กลับลดลง เมื่อเทียบกับ healthy control

การศึกษานี้มีวิธีการเก็บ specimen โดยใช้ standard protocol ของ NIH Human Microbiome project และ 16S rRNA gene sequencing ที่บริเวณ V1-V3 variable regions ซึ่งสามารถระบุชนิดและสปีชีส์ของแบคทีเรียได้ถูกต้องแม่นยำกว่าวิธีเดิม (Traditional V4 approach)

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า microbial community ของ psoriatic skin มีความแตกต่างจาก normal healthy skin โดยมี increased diversity และ reduced community stability เป็นผลทำให้มี immunoregulatory bacteria เช่น *Staphylococcus epidermidis* และ *Cutibacterium acnes* ลดจำนวนลง ส่งผลให้มีเชื้อก่อโรคได้แก่ *Staphylococcus aureus* เพิ่มขึ้น

- Atopic dermatitis เป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับ skin microbiota ที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ป่วยกลุ่มนี้ โดยพบ *Staphylococcus aureus* colonization อยู่ที่ผิวหนังผู้ป่วย atopic dermatitis ประมาณ 80-100%(7) ในขณะที่คนปกติสามารถพบ *Staphylococcus aureus* colonization อยู่ที่ผิวหนังได้ประมาณ 10-20%(8) ปริมาณ *Staphylococcus aureus* ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงและการกำเริบของโรค atopic dermatitis ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ *Staphylococcus aureus* ที่ colonization ใน acute และ chronic lesion ของ atopic dermatitis โดยใช้ผู้ป่วย urticarial เป็นกลุ่ม control พบว่ามี *Staphylococcus aureus* colonization rate ที่ 74%, 38% และ 3% ตามลำดับ(9)

- S.Prast-Nielsen และคณะ(10)ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของ skin microbiome ที่ได้จากการ swab และ biopsy โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 16 คน เก็บ swab ที่ผิวหนังตามด้วย skin biopsy ในบริเวณเดียวกันกับที่ swab ไป ผลพบว่ามีความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างที่ได้จากการ swab มากกว่าตัวอย่างที่ได้จากการ biopsy ส่วนเชื้อในกลุ่ม anaerobe จะพบในตัวอย่างที่ได้จากการ biopsy มากกว่า

ผู้เขียนได้สรุปตอนท้ายว่า การเลือกวิธีในการเก็บตัวอย่างมีความสำคัญต่อการศึกษา skin microbiome ที่เกี่ยวข้องกับโรคผิวหนัง การจะเลือกใช้วิธีใดควรคำนึงถึง pathophysiology ของการเกิดโรคนั้นๆด้วย อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงความเหมาะสม สามารถตอบคำถามการศึกษาได้หรือไม่

-T. Staudinger และคณะ(2011)(11) ได้ทำการศึกษา skin microbiota บริเวณหน้าผาก เปรียบเทียบกับบริเวณแขน (Volar forearm) ในผู้เข้าร่วมวิจัย 11 คน เป็นผู้หญิง 6 คน และผู้ชาย 5 คน

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ผู้เข้าร่วมวิจัยจะต้องไม่ได้รับยาฆ่าเชื้อใดๆอย่างน้อยเป็นเวลา 1 เดือน งดเว้นจากการอาบน้ำและล้างหน้าเป็นเวลา 8 ชั่วโมงก่อนมาเก็บตัวอย่าง จากนั้นใช้ sterile cotton swab ที่จุ่มใน sterile 0.15 mol/l NaCl with 0.1% Tween 20 ป้ายบริเวณผิวหนังเป็นพื้นที่ 2x2 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tubes เพื่อนำไปสกัด bacterial DNA ในขั้นตอนต่อไป

พบว่า มี 3 ไฟลัมหลักที่พบในผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 11 คน ได้แก่ Actinobacteria, Firmicutes และ Proteobacteria ส่วน Bacteroidetes พบในผู้เข้าร่วมวิจัย 8 คน เมื่อแบ่งละเอียดลงไปในระดับ จินัส พบ 3 จินัส หลักในผู้เข้าร่วมวิจัยทั้ง 11 คน ได้แก่ *Cutibacterium*, *Staphylococcus* และ *Corynebacterium* โดยสปีชีส์ ที่พบมากที่สุดที่หน้าผากคือ *Cutibacterium acnes* รองลงมาคือ *Staphylococcus epidermidis* ส่วนสปีชีส์ที่พบมากที่สุดที่แขน ได้แก่ *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rhizobium tropici* และ *Micrococcus luteus*

เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของเชื้อที่ตรวจพบระหว่างบริเวณหน้าผากและแขน พบว่าที่แขนมีความหลากหลายของเชื้อที่ตรวจพบมากกว่า นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบระหว่างเพศ หญิงและเพศชาย พบว่าในเพศหญิงที่มีประวัติแต่งหน้าเป็นประจำมีความหลากหลายของเชื้อที่ ผิวหนังมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศหญิงที่ไม่แต่งหน้ากับ เพศชาย

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ microbiota เช่น

- การได้รับเคมีบำบัด มีการศึกษาในหนูทดลอง โดยการให้กิน 5-fluorouracil (5-FU) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ microbiota ที่ช่องปากและทางเดินอาหารของหนู โดยพบเชื้อ แบคทีเรีย gram negative anaerobe ในลำไส้เพิ่มมากขึ้น(12) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาโดยใช้ qRT-PCR ตรวจในอุจจาระของหนูที่ได้รับ 5-FU พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ *Clostridium species*, *Staphylococcus species* และ *E. coli species* และมีการลดลงของ *Lactobacillus species* และ *Bacteroides species*(13) มีการศึกษา gut microbiota ในผู้ป่วย non-Hodgkin's lymphoma ที่ได้รับ เคมีบำบัด (carmustine, etoposide, aracytine และ melphalan) เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีการลดลงของ

ไฟลัม Firmicutes และ Actinobacteria ในขณะที่ไฟลัม Proteobacteria เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับเคมีบำบัด(14)

- การฉายแสงเพื่อรักษามะเร็ง มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ microbiota ในช่องปากของผู้ป่วย Nasopharyngeal carcinoma ที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายแสงเปรียบเทียบกับคนปกติ โดยใช้ 16s rRNA gene sequencing พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ relative abundance ของเชื้อแบคทีเรีย gram negative และในผู้ป่วยที่ภายหลังเกิดผลข้างเคียงเป็นเชื้อช่องปากอักเสบ (oral mucositis) ในระดับรุนแรง สามารถพบเชื้อ *Actinobacillus* เพิ่มมากขึ้นกว่าคนปกติตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของฟื้นได้(15)

- การใช้ยาปฏิชีวนะ มีการศึกษา skin microbiota ในผู้ป่วยจำนวน 5 คน ที่รับประทาน minocycline วันละ 200 mg เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับก่อนรับประทานยาและหลังรับประทานยา 4 สัปดาห์ พบว่า *Cutibacterium acne* ลดลง 1.4 เท่า นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของเชื้ออื่น ๆ ได้แก่ *Pseudomonas species* เพิ่มขึ้น 5.6 เท่า, *Streptococcus species* เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า และ *Lactobacillus species* ลดลง 4.7 เท่า เมื่อเทียบกับก่อนรับประทานยา (16)

- การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพ (antiseptic) มีการศึกษา skin microbiota ในคนชาว Madagascar โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สบู่ที่มีส่วนผสมของ Triclocarban ซึ่งเป็น antibacterial agent เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้สบู่ทั่วไป พบว่า alpha diversity (ความหลากหลายของเชื้อที่ตรวจพบในตัวอย่างเดียวกัน) ไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม แต่ค่า beta diversity (ความหลากหลายของเชื้อที่ตรวจพบระหว่างตัวอย่าง) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งอธิบายได้จากฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในสบู่ที่มีส่วนผสมของ Triclocarban ทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำและดินที่พบในผิวหนังก่อนการใช้สบู่ชนิดนี้มีปริมาณลดลง ในขณะที่เชื้ออื่นที่เดิมไม่สามารถ colonization ที่ผิวหนังได้ กลับมีเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ความหลากหลายของเชื้อในตัวอย่างเดียวกันไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่ได้ใช้สบู่ชนิดนี้ จะพบว่ามีเชื้อที่หลากหลายชนิดเพิ่มมากขึ้น และการเปลี่ยนแปลง skin microbiota นี้มีผลได้นานถึง 2 สัปดาห์หลังหยุดใช้สบู่ที่มีส่วนผสมของยาฆ่าเชื้อ ดังนั้นการใช้สบู่ชนิดนี้ในระยะยาวย่อมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota ได้นานมากขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ใช้(17)

- การใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเครื่องสำอาง (skin care and cosmetics) มีการศึกษาผลของ skin care ต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota โดยใช้ facial lotion, moisturizer, foot powder และ deodorant และติดตามผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าการใช้ deodorant และ foot powder ทำให้มีความหลากหลายของ skin microbiota เพิ่มมากขึ้น ส่วน facial lotion และ

moisturizer ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota เพียงเล็กน้อย(18) อีกการศึกษาหนึ่งซึ่งใช้ cosmetic skin care ได้แก่ skin softener, lotion, essence และ cream โดยติดตามผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ *Propionibacterium*, *Staphylococcus* และ *Corynebacterium* ลดลง ในขณะที่เชื้อ *Ralstonia* เพิ่มขึ้นภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้(19)

งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับ antimicrobial peptides

Antimicrobial peptides (AMPs) คือ เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆที่ผิวหนัง มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง ควบคุมกระบวนการอักเสบ การสร้างหลอดเลือดใหม่ และการหายของแผล โดย AMPs นั้นสร้างมาจาก keratinocyte ในชั้นหนังกำพร้า, mast cell, neutrophil, sebocyte, eccrine epithelial cell นอกจากนี้ยังสามารถสร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ผิวหนังบริเวณนั้นๆ ได้อีกด้วย(20) การเปลี่ยนแปลงของ AMPs พบได้ในโรคผิวหนังบางชนิด เช่น psoriasis พบปริมาณ cathelicidin และ human beta-defensins (hBDs) ที่มากขึ้นกว่าผิวหนังคนปกติ ในทางตรงกันข้ามพบ AMPs ได้แก่ cathelicidin, hBD-2 และ hBD-3 ที่น้อยลงในผิวหนังคนที่ เป็น atopic dermatitis(21) ทำให้มี *Staphylococcus aureus* colonization เพิ่มมากขึ้น และมีอุบัติการณ์การติดเชื้อชนิดนี้ที่ผิวหนังมากขึ้นกว่าคนปกติ(22)

- Maja-Lisa Clausen และคณะ(2016)(23) ได้ทำการศึกษาเก็บโปรตีนที่ชั้น stratum corneum ของผู้ป่วย atopic dermatitis เปรียบเทียบกับคนปกติ โดยใช้ tape stripping และใช้วิธีวิเคราะห์โปรตีนที่แผ่นเทป 2 วิธีเปรียบเทียบกัน ได้แก่ Squame scan ซึ่งสามารถตรวจโปรตีนได้ทั้ง soluble และ insoluble protein อีกวิธี คือ Micro BCA determination kit ซึ่งสามารถตรวจได้เฉพาะ soluble protein เท่านั้น พบว่าในผู้ป่วย atopic dermatitis มีโปรตีนที่ชั้น stratum corneum น้อยกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังศึกษาปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ การใส่ protease inhibitor ลงใน PBS buffer, การเพิ่มระยะเวลาในการกด tape strip, การเพิ่มระยะเวลาในการ sonication ไม่ได้มีผลต่อปริมาณ soluble protein ที่ตรวจพบ

- Maja-Lisa Clausen และคณะ(2018)(24) ได้ศึกษา antimicrobial peptides (AMPs) ในผู้ป่วย atopic dermatitis 9 คน เปรียบเทียบกับคนปกติ 5 คน โดยใช้ tape stripping technique วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วย Micro BCA™ Protein Assay kit และใช้ ELISA kit ในการวิเคราะห์ชนิดของ AMP

ตรวจพบ AMPs 4 ชนิด ได้แก่ hBD-2, hBD-3, RNase7 และ psoriasin ทั้งในผู้ป่วย atopic dermatitis และในคนปกติ โดยพบ hBD-3, RNase7 ใน non-lesional skin ของผู้ป่วย atopic dermatitis มากกว่าผิวหนังคนปกติ ซึ่งอาจสามารถอธิบายได้จาก in vivo study ที่พบ hBD-3, RNase7 มีความสำคัญต่อการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งผิวหนังของผู้ป่วย atopic

dermatitis มี *Staphylococcus aureus* อยู่เป็นเชื้อประจำถิ่นมากกว่าผิวหนังคนปกติ นอกจากนี้ยังพบ hBD-2, psoriasin ใน lesional skin ของผู้ป่วย atopic dermatitis เป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง hBD-2 นั้นเป็น AMPs ที่สัมพันธ์กับ inflammation และ skin barrier ที่เสียไป ซึ่งเป็นสภาวะที่พบในผิวหนังของผู้ป่วย atopic dermatitis

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างของการศึกษานี้ ใช้ tape stripping technique โดยใช้ tape (D-squame sample disc 22 mm) และ CuDerm pressurizer 225 g/cm² เป็นเครื่องมือกำหนดแรงกดบนผิวให้มีค่าเท่ากันในแต่ละครั้งของการกด และใช้คนเก็บตัวอย่างเป็นคนเดียวกันตลอดการศึกษานี้ เก็บตัวอย่างที่บริเวณผื่นใน lesional skin, non-lesional skin (volar forearm) ของผู้ป่วย atopic dermatitis และ ผิวหนังปกติบริเวณ volar forearm ของคนปกติ โดยใช้ tape stripping ทั้งหมด 36 แผ่น แผ่นแรกไม่เอามารวมใน tube จากนั้นแบ่งใส่ tube ละ 5 แผ่น (1-5 depth 1, 6-10 depth 2, 11-15 depth 3, 16-20 depth 4, 21-25 depth 5, 26-30 depth 6, 31-35 depth 7) จากนั้นใส่ PBS 1 ml ลงในแต่ละ tube นำไปผ่าน sonication ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 0-4 °C นาน 15 นาที จากนั้นแบ่งเก็บใน Eppendorf tube แล้วแช่ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Micro BCA™ Protein Assay kit และ ELISA ต่อไป

งานวิจัยหรือวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลข้างเคียงทางผิวหนังจากการได้รับยา EGFR inhibitors

ในปัจจุบันมีการใช้ EGFR inhibitors ในการรักษาโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมากขึ้น ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นหลังได้รับยานี้เป็นสิ่งที่สามารถคาดการณ์ได้ เช่น ผื่นผิวหนังที่หน้าและตัว (acneiform eruption), ผิวแห้ง (xerosis), เนื้อขอบเล็บนิ้วเท้าอักเสบ (paronychia) เป็นต้น ซึ่งหากเป็นในระดับที่รุนแรง อาจมีผลให้ผู้ป่วยต้องลดขนาดยาลง หรืออาจจำเป็นต้องหยุดการรักษาด้วยยา EGFR inhibitors ได้

- Iris Amitay-Laish และคณะ(2010)(25) ได้ทำการศึกษาติดตามผู้ป่วยที่ได้รับ EGFR inhibitors จำนวน 29 คน (12 คนได้รับ Cetuximab, 17 คนได้รับ Erlotinib) พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน 24 คนที่มีผื่น papulopustular rash แบ่งเป็น early phase ซึ่งเป็นผื่นที่เกิดขึ้นหลังจากเริ่มยาไปแล้ว 4-14 วัน และ late phase ซึ่งเป็นผื่นที่เกิดขึ้นหลังจากเริ่มยาไปแล้ว 150-300 วัน และมีผู้ป่วย 4 คนที่มี paronychia

ผู้เขียนได้เก็บ pus และ discharge จากผื่นและซอกเล็บที่มีการอักเสบนำไปเพาะเชื้อแบคทีเรียพบเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใน early phase papulopustular rash 55%, late phase papulopustular rash 100% และ paronychia 100% ทำให้เกิดข้อสรุปจากการศึกษานี้ว่า early phase papulopustular rash นั้นเกิดจาก inflammatory process เป็นหลัก ร่วมกับอาจมี secondary bacterial

infection ตามมาได้ ส่วน late phase papulopustular rash และ paronychia เกิดจาก *Staphylococcus aureus* infection โดยตรง นำไปสู่คำแนะนำในการส่งตรวจเพาะเชื้อแบคทีเรียจากรอยโรคที่เกิดขึ้น หลังจากได้รับยา EGFR inhibitors ก่อนการรักษาเพื่อประเมินความเหมาะสมในการให้ antibacterial agents

- Yung-Tsu Cho และคณะ(2017)(26) ได้ทำการศึกษาดูตามผู้ป่วย non-small cell lung cancer ที่ได้รับยา EGFR inhibitor แล้วเกิด purpuric drug eruption ทั้งหมด 32 คน พบว่ามี *Staphylococcus aureus* จากผลเพาะเชื้อขึ้นเนื้อที่ตัดไปตรวจ 20 คน (63%) และเมื่อตรวจ immunohistochemical staining พบว่ามีกรดลดลงของ filaggrin และ hBD-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับคนปกติ จากการศึกษาครั้งนี้เชื่อว่าการลดลงของ antimicrobial peptides ที่ตรวจพบนี้เป็นผลทำให้มี pathogenic bacteria มากขึ้น

- Kio Park และคณะ(2014)(27) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของยา EGFR inhibitors ต่อ innate immune response ใน supernatant ที่มี *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็น in vitro study พบว่า EGFR inhibitors ทำให้ normal human epidermal keratinocyte ใน supernatant ของ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่คอยสร้าง antimicrobial peptides ป้องกันการเจริญเติบโตของ pathogenic bacteria สร้าง hBD-2 และ hBD-3 ลดลง จึงทำให้เกิด bacterial infection เกิดผลข้างเคียงทางผิวหนังจากการได้รับยา EGFR inhibitors เช่น acneiform eruption ขึ้นได้ อธิบายได้จาก secreted product ของ *Staphylococcus epidermidis* ใช้ toll-like receptor (TLR) 2 pathway และ EGFR signalling ในการกระตุ้นการสร้าง hBD-2 จาก keratinocyte ส่วน *Staphylococcus aureus* ไม่ต้องใช้ 2 ปัจจัยดังกล่าวในการกระตุ้นการสร้าง hBD-1 และ hBD-3 จาก keratinocyte ทำให้ใน supernatant ของ *Staphylococcus aureus* ไม่ถูกยับยั้งการสร้าง hBD-1 และ hBD-3 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า EGFR inhibitors สามารถยับยั้งการสร้าง hBDs ที่ถูกกระตุ้นด้วย *Staphylococcus epidermidis*

- Rachel L. Braden และ Milan J. Anadkat(2016)(28) ได้ทำการศึกษาแบบ retrospective review ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งที่ได้รับยา EGFR inhibitors โดยศึกษาความแตกต่างของผื่นที่เกิดขึ้น หลังได้รับยาแบ่งเป็น papulopustular eruption ที่เกิดจากยา EGFR inhibitors และ ผื่นที่เกิดจาก superimposed bacterial infection พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในระยะเวลาของการเกิดผื่น ตำแหน่งของผื่น ลักษณะการกระจายตัวของผื่น โดย papulopustular eruption มีระยะเวลาของการเกิดผื่นเฉลี่ย 1.5 สัปดาห์หลังเริ่มยา มักเกิดบริเวณ face, scalp, chest and back กระจายเท่าๆกันทั้ง 2 ข้าง ส่วนผื่นที่เกิดจาก superimposed bacterial infection มีระยะเวลาของการเกิดผื่นเฉลี่ย 28.6

สัปดาห์ มักเกิดบริเวณ abdomen, groin, upper and lower extremities กระจายไม่เท่ากันในแต่ละข้าง

ผื่นที่เกิดจาก superimposed bacterial infection เมื่อนำไปเพาะเชื้อพบเป็น *Staphylococcus aureus* มากที่สุด (82%) นอกนั้นเป็นเชื้ออื่นๆ เช่น *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

ผิวหนังของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors เสี่ยงต่อการติดเชื้อมากกว่าคนปกติเนื่องจากมีผิวหนังชั้น stratum corneum ซึ่งเป็นชั้นนอกสุดของผิวหนังบางลง มีการสร้างโปรตีนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ลดลง และยังมีการและตอบสนองของ T cell ลดลง จึงเป็นเหตุให้เกิดการติดเชื้อได้มากขึ้น

- R. E. Eilers Jr และคณะ ได้ทำ retrospective study รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors เก็บข้อมูลผลเพาะเชื้อแบคทีเรีย ผลชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา และผลย้อมทาง immunohistochemical เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส พบว่าผู้ป่วย 84 คนจากทั้งหมด 221 คน (38%) พบว่ามีการติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังที่เกิดผลข้างเคียงจากยา EGFR inhibitors โดยผลเพาะเชื้อแบคทีเรียเป็น *Staphylococcus aureus* จำนวน 50 คน (22.6%) เป็น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 12 คน (5.4%) ส่วนน้อยพบเป็นการติดเชื้ออื่นๆ ได้แก่ herpes simplex (3.2%), herpes zoster (1.8%) และ dermatophyte (10.4%) โดยพบอัตราการติดเชื้อมากที่สุดในบริเวณที่มีผิวหนังมัน (seborrheic area) และในผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) จะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

1. ประชากรเป้าหมาย (target population) ประชากรไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งก่อนระยะแพร่กระจาย (advanced solid tumor) คือ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) หรือมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ในระยะแพร่กระจาย และได้รับการรักษาด้วยยา EGFR Inhibitors เช่น erlotinib หรือ gefitinib หรือ afatinib หรือ cetuximab
2. ประชากรที่ใช้ศึกษา (study population) ประชากรไทยที่เข้ารับการรักษากับแผนกมะเร็งวิทยาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งก่อนระยะแพร่กระจาย (advanced solid tumor) ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) หรือมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer และได้รับการรักษาด้วยยา EGFR Inhibitors เช่น erlotinib หรือ gefitinib หรือ afatinib หรือ cetuximab

วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร

ติดต่อแพทย์เจ้าของผู้ป่วยในการแนะนำตัวผู้วิจัยในแก่อาสาสมัคร

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าทำการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) หรือมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ในระยะแพร่กระจาย (stage IV) และได้รับการรักษาด้วยยา EGFR inhibitors เช่น erlotinib หรือ gefitinib หรือ afatinib หรือ cetuximab
2. ผู้ป่วยมีอายุ 18 ปีขึ้นไป
3. ผู้ป่วยต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะรูปแบบฉีดหรือรับประทานอย่างน้อย 1 เดือนก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
4. ผู้ป่วยต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาสเตียรอยด์รูปแบบทากายนอกในบริเวณหน้าหรือนิ้วเท้าอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนเข้าร่วมงานวิจัย
5. ผู้ป่วยต้องงดแต่งหน้าหรือทาครีมอื่นๆ เช่น ครีมชุ่มชื้น ครีมกันแดดในวันที่จะทำการตรวจ
6. ผู้ป่วยต้องงดอาบน้ำและล้างหน้าอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ในวันที่จะทำการตรวจ

7. ผู้ป่วยต้องงดใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ (antiseptic) ตลอดการเข้าร่วมงานวิจัย
8. ผู้ป่วยรับการยินยอมเข้าร่วมวิจัย (informed consent)

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางผิวหนัง ได้แก่ acneiform eruption, paronychia, hair abnormalities, skin dryness, pruritus อยู่ตั้งแต่ก่อนเริ่มการวิจัย
2. ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยาสเตียรอยด์ต่อเนื่อง
3. ผู้ป่วยไม่สะดวกในการมาตรวจติดตามตามที่กำหนดไว้

เกณฑ์การถอนตัวระหว่างการศึกษา (Withdrawal criteria)

1. ผู้ป่วยไม่ได้มาตามนัดที่กำหนดไว้
2. ผู้ป่วยมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงที่ผิวหนังเป็นเหตุให้ต้องรับประทานยาปฏิชีวนะต่อเนื่อง ไม่สามารถหยุดยาก่อนมาเก็บตัวอย่างที่ผิวหนังได้
3. ผู้ป่วยที่ยุติการให้ยา EGFR inhibitors

กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent process)

1. แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับผู้เข้าร่วมวิจัย เกี่ยวกับวัตถุประสงค์, ขั้นตอนการวิจัย และประโยชน์จากการวิจัย
2. แพทย์ผู้ทำวิจัยแจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้ผู้เข้าร่วมวิจัยนำกลับไปพิจารณาจนตัดสินใจ และทำหน้าที่อธิบายข้อสงสัยของผู้เข้าร่วมวิจัย จนกระทั่งมีความเข้าใจเกี่ยวกับการวิจัยเป็นอย่างดี ทั้งนี้จะมีการแจ้งให้ผู้เข้าร่วมวิจัยรับทราบว่าไม่มีผลต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยในกรณีที่ปฏิเสธการเข้าร่วมงานวิจัย เมื่อผู้เข้าร่วมวิจัยเข้าใจและยินยอมเข้าร่วมการวิจัยแล้ว จึงจะให้ลงชื่อเข้าร่วมการวิจัยและเริ่มดำเนินการวิจัยตามลำดับ

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sampling technique)

Consecutive technique เลือกผู้ป่วยทุกรายที่เข้าเกณฑ์การศึกษา

ขนาดตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Sample size determination)

$$n = p(1 - p) \left(\frac{z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta}}{p - p_0} \right)^2$$

$$1 - \beta = \Phi(z - z_{1-\alpha/2}) + \Phi(-z - z_{1-\alpha/2}) \quad , \quad z = \frac{p - p_0}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}}$$

p_0 = ความชุกของ *Staphylococcus aureus* ที่ตรวจพบในผิวหนังของ healthy people

p = ความชุกของ *Staphylococcus aureus* ที่คาดว่าจะตรวจพบในผิวหนังของผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitor เป็นระยะเวลา 6 เดือน

Φ = standard Normal distribution function

Φ^{-1} = standard Normal quantile function

α = Type I error

β = Type II error (power = $1 - \beta$)

เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษา skin microbiota ในผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors มาก่อน แต่จากการทบทวนวรรณกรรมทำให้ทราบถึงอุบัติการณ์ของการตรวจพบ *Staphylococcus aureus* จาก skin lesion มากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยานี้ รวมทั้งตรวจพบปริมาณ AMPs ที่ลดลง มีความคล้ายคลึงกับที่ตรวจพบในผู้ป่วย atopic dermatitis จึงนำข้อมูลจากการตรวจพบในผู้ป่วย atopic dermatitis มาใช้อ้างอิงค่าที่แทนในสูตร

สามารถตรวจพบ *Staphylococcus aureus* ที่ตรวจพบใน non-lesional skin ของผู้ป่วย atopic dermatitis ประมาณ 30%(29),(30) และจากการศึกษาเดียวกันพบ *Staphylococcus aureus* ในผิวหนัง healthy subject ประมาณ 10%(29),(30)

$$p = 0.1$$

$$p_0 = 0.3$$

$$\text{power} = 0.8$$

$$\text{type I error} = 5\%$$

$$\text{สรุปค่า sample size} = 18 \text{ คน}$$

การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

ตัวแปรอิสระ คือ การได้รับยา EGFR inhibitors เช่น erlotinib หรือ gefitinib หรือ afatinib หรือ cetuximab หรือ dacomitinib

ตัวแปรตามหลัก คือ skin microbiota ที่ตรวจพบบริเวณแก้ม และซอกเล็บเท้าของผู้ป่วย

ตัวแปรตามรอง คือ antimicrobial peptides (hBD-3, RNase7) ที่ตรวจพบ, ความยืดหยุ่นของผิวหนัง, ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง, ปริมาณไขมันบนผิวหนัง, เกรดสีของผิวหนัง และความเป็นกรดต่างของผิวหนัง

ตัวแปรควบคุม คือ การใช้ยาปฏิชีวนะทั้งรูปแบบฉีด, รับประทาน หรือทาภายนอก, การใช้ยาทาสเตียรอยด์, การชะล้างผิว, การทาครีมชุ่มชื้นบริเวณผิวหนังที่จะทำการเก็บตัวอย่าง, การแต่งหน้า, การใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผิวที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ (antiseptic), การได้รับยาเคมีบำบัดหรือการฉายแสงทั้งก่อนและขณะเข้าร่วมงานวิจัย, ฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่าง

เก็บข้อมูลและวัดผลโดยใช้ แบบบันทึกข้อมูล และ ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ

Primary outcome

ใช้ 16S rRNA sequencing ได้ผลลัพธ์ออกมาเป็นความชุกชุมสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในระดับไฟลัม จีโนส และสปีชีส์หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ เป็น nominal data

Secondary outcome

1. ใช้ Micro BCA protein assay kit วัดปริมาณ total protein ที่ผิวหนัง หน่วยเป็น microgram/milliliter ($\mu\text{g/ml}$) เป็น continuous data
2. ใช้ enzyme-linked immune assay (ELISA) วิเคราะห์ antimicrobial peptides ได้แก่ hBD-3 และ RNase7 หน่วยเป็น nanogram หรือ picogram/microgram ($\text{pg}/\mu\text{g}$ หรือ $\text{pg}/\mu\text{g}$) เป็น continuous data
3. ใช้ multi probe system Cutometer® MPA580 วัด skin elasticity, skin moisture, TEWL, sebum, skin color และ skin pH เป็น continuous data

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

1. ผู้วิจัยทำการรวบรวมข้อมูลผ่านการประสานงานขอความร่วมมือจากแพทย์ท่านอื่น โดยรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) หรือมะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ในระยะแพร่กระจาย (stage IV) ที่เข้ารับการรักษาที่แผนกมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แล้วได้รับยา EGFR tyrosine kinase inhibitors คือ erlotinib หรือ gefitinib หรือ afatinib หรือ cetuximab
2. แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับผู้เข้าร่วมวิจัย และขอความยินยอมจากผู้เข้าร่วมงานวิจัย

3. เมื่อผู้เข้าร่วมงานวิจัยลงชื่อยินยอมเข้าร่วมการวิจัยแล้ว แพทย์ผู้วิจัยตรวจสอบ inclusion และ exclusion criteria ตามที่กำหนดอีกครั้ง
4. แจ้งผู้ป่วยเกี่ยวกับการเตรียมตัวก่อนเข้ารับการตรวจในแต่ละครั้ง โดยมีข้อควรปฏิบัติ ดังนี้(31),(4)

- 1) งดอาบน้ำ งดล้างหน้าอย่างน้อย 8 ชั่วโมง
- 2) งดรับประทานหรือฉีดยาฆ่าเชื้ออย่างน้อย 1 เดือน
- 3) งดทายาฆ่าเชื้อและยาสเตียรอยด์อย่างน้อย 1 สัปดาห์
- 4) งดทาครีมชุ่มชื้น ครีมกันแดด และงดแต่งหน้าในวันที่จะทำการตรวจ

5. แพทย์ผู้วิจัยทำการบันทึกแบบบันทึกข้อมูล 1 (case record form 1) ของผู้เข้าร่วมวิจัย โดยนับเป็นเดือนที่ 0 และทำนัดผู้เข้าร่วมวิจัยเพื่อเก็บตัวอย่างซ้ำในเดือนที่ 1 และ 6 หลังได้รับยา

แบบบันทึกข้อมูล 1 (Case record form 1) สำหรับการตรวจผู้ป่วยครั้งแรก

- 1) ประวัติข้อมูลส่วนตัว ได้แก่ อายุ, เพศ, น้ำหนัก, BMI, การสูบบุหรี่, การใช้ผลิตภัณฑ์กันแดด, ยาที่ใช้ประจำ, การใช้เครื่องสำอาง, สมุนไพร, antiseptic
- 2) ประวัติการรักษาโรคมะเร็ง ได้แก่ ชนิดของมะเร็ง, Performance status, ขนาด EGFR Inhibitors ที่ได้รับ, การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด, การฉายแสง
- 3) วัดค่า biophysical properties ด้วยเครื่องตรวจสภาพผิวระบบ multi probe system Cutometer® MPA580 (วัดความยืดหยุ่นของผิวหนัง, ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง, ปริมาณไขมันบนผิวหนัง, เจดสีของผิวหนัง และความเป็นกรดต่างของผิวหนัง)

แบบบันทึกข้อมูล 2 (case record form 2) สำหรับการตรวจติดตามผู้ป่วยในเดือนที่

1 และ 6 หลังได้รับยา

- 1) วัดค่า biophysical properties ด้วยเครื่องตรวจสภาพผิวระบบ multi probe system Cutometer® MPA580 (วัดความยืดหยุ่นของผิวหนัง, ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง, ปริมาณไขมันบนผิวหนัง, เจดสีของผิวหนัง และความเป็นกรดต่างของผิวหนัง)
- 2) ผลข้างเคียงจากยาทั้งอาการแสดงทางผิวหนัง (cutaneous manifestation) ที่เกิดขึ้นหลังได้รับยา รวมถึงบันทึกช่วงเวลาที่มีผลข้างเคียงนั้นๆ ได้แก่ acneiform eruption, xerosis, hypertrichosis, trichomegaly, alopecia, paronychia, oral

mucositis, diarrhea ซึ่งประเมิน severity จาก CTCAE version 4.0 และ pruritus ซึ่งประเมิน severity จาก visual analog scale

- 3) ปัจจัยที่อาจมีผลทำให้เกิดความผิดปกติทางผิวหนังที่รุนแรงขึ้น ได้แก่ การสูบบุหรี่, การใช้ผลิตภัณฑ์กันแดด, ยาที่ใช้ประจำ, การปรับขนาดยา EGFR inhibitor
 - 4) การรักษาความผิดปกติทางผิวหนังที่เกิดขึ้น
- ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง (sample collection)

1. ขั้นตอนการ swab skin เพื่อเก็บ skin microbiota

- 1) เตรียมและเช็ดอุปกรณ์ทุกชิ้นด้วย 70% แอลกอฮอล์ก่อนนำเข้าตู้ BSC class II
- 2) เปิด UV ทั้งไว้ 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคก่อนเริ่มเก็บตัวอย่าง
- 3) เปิดห่อไม้พ่นสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยจับเฉพาะส่วนปลายของไม้จุ่มปลายด้านสำลีลงใน tube 15 ml ที่มีสารละลาย 0.15M NaCl + 0.1%(v/v) Tween 20 ปริมาตร 1 ml จากนั้นบิดปลายไม้พ่นสำลีไปมา กับด้านข้าง tube ให้พอดพอดี
- 4) นำไม้พ่นสำลีมา swab ที่แก้มข้างซ้ายของผู้ป่วย ใช้พ่นสำลีปาดไปมาให้ได้พื้นที่ 2 x 2 ตารางนิ้ว นาน 1 นาที
- 5) นำไม้พ่นสำลีมาจุ่มกลับลงไปใน tube เดิม ปิดฝา tube แล้วนำไปวางบนเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที
- 6) นำไม้พ่นสำลีบิดไปมากับด้านข้าง tube เพื่อเอาน้ำที่ติดบริเวณด้านสำลีออกให้ได้มากที่สุด จากนั้นนำไม้พ่นสำลีทิ้งไป
- 7) ใช้ pipette ดูดสารละลายทั้งหมดจาก tube 15 ml ใส่งใน cryotube
- 8) นำ cryotube ไปแช่ในตู้เก็บความเย็นอุณหภูมิ -80°C
- 9) การเก็บตัวอย่างที่นิ้วเท้าเตรียมอุปกรณ์และสารละลายเช่นเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างที่แก้ม โดยเก็บที่นิ้วโป้ง และนิ้วกลางเท้าขวา
- 10) วิธีการ swab ที่นิ้วเท้า ทำโดยการใช้ไม้พ่นสำลีปาดไปมาบริเวณซอกเล็บทั้ง 2 ข้าง นาน 1 นาที
- 11) เก็บ Mock swab โดยใช้ไม้พ่นสำลีที่จุ่มลงในสารละลาย 0.15M NaCl + 0.1%(v/v) Tween 20 นำมาแกว่งในอากาศในห้องที่ทำการเก็บตัวอย่าง และทำตามขั้นตอนต่างๆตามที่ได้อ่านแล้วข้างต้น
- 12) นัดผู้ป่วยมาเก็บตัวอย่างอีกครั้งที่ 1 และ 6 เดือนหลังได้รับยา

2. ขั้นตอนการทำ tape stripping เพื่อเก็บ antimicrobial peptides

- 1) ใช้ tape strip (D-squame®, CuDerm, Dallas TX, USA) แปะลงบน แก้มด้านขวาของผู้ป่วย ใช้ standardized pressurizer (D500-D-squame® pressure instrument, CuDerm, Dallas TX, USA) กดลงบน tape strip เป็นเวลา 10 วินาที
- 2) ใช้ sterile forcep คีบ tape strip ดึงออกจากผิวหนัง ใต tape strip ลง ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml โดยหันด้านกาวเข้าด้านใน
- 3) ใส่สารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml ลงใน Eppendorf tube
- 4) ทำเช่นนี้ทั้งหมด 15 ครั้ง
- 5) ครั้งที่ 16 เป็น control ไม่ต้องแปะลงบนผิวหนัง
- 6) เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ในกล่องใส่น้ำแข็ง แล้วนำไปส่งที่ ห้องปฏิบัติการที่ ตึกอปร. ชั้น 16 เพื่อทำ sonication, วิเคราะห์ total protein ด้วย MicroBCA™ protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA) และ วิเคราะห์ hBD-3 ด้วย ELISA Kit for Defensin Beta 103A (SEE132Hu, Cloud Clone Corp, USCN, USA) และ RNase7 ด้วย ELISA RNASE7 (SED193Hu, Cloud Clone Corp, USCN, USA)
- 7) นัดผู้ป่วยมาเก็บตัวอย่างอีกครั้งที่ 1 และ 6 เดือนหลังได้รับยา

3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ข้อมูลทั่วไปจาก case record form 1, case record form 2 และ biophysical data เก็บรวบรวมในฐานข้อมูลใน Excel

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการจากการตรวจ skin microbiota ด้วยวิธี 16S rRNA gene sequencing ที่ baseline, เดือนที่ 1 และ 6 (จากภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการจากการตรวจ total protein และ antimicrobial peptides (hBD-3, RNase7) ด้วย Micro BCA และ ELISA ที่ baseline, เดือนที่ 1 และ 6 (จากภาควิชาจุลชีววิทยาทาง การแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลเชิงคุณภาพ(Qualitative data)

ข้อมูลเชิงกลุ่ม (categorical data) ได้แก่ ลักษณะโดยทั่วไปของผู้ป่วย เช่น เพศ, การวินิจฉัย, ยาที่ได้รับ, ประวัติการรักษาด้วยเคมีบำบัดและการฉายแสง, การใช้ antiseptic, herb, cosmetics, ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นหลังได้รับยา รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์

ข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative data)

ข้อมูลต่อเนื่อง (continuous data) ได้แก่

- 1) ค่า relative abundance ของ skin microbiota รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ คำนวณสถิติโดยใช้ Wilcoxon signed rank test
- 2) อายุ, ค่า total protein ที่ผิวหนัง, ค่า hBD-3, ค่า RNase7, ความยืดหยุ่นของผิวหนัง, ความชุ่มชื้นของผิวหนัง, ปริมาณน้ำที่ระเหยออกจากผิวหนัง, ปริมาณไขมันบนผิวหนัง, เกล็ดสีของผิวหนัง และความเป็นกรดต่างของผิวหนัง รายงานผลเป็นค่า mean หรือ median คำนวณสถิติโดยใช้ paired t-test

บทที่ 4 ผลการวิจัย

จากการรวบรวมผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะแพร่กระจายที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทั้งหมด 19 คน มีผู้ป่วยจำนวน 15 คนที่มาเก็บตัวอย่างได้ครบทั้ง 3 ครั้ง (ก่อนได้รับยา, หลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) ผู้ป่วยจำนวน 4 คนที่มาเก็บตัวอย่างไม่ครบ โดยเก็บตัวอย่างครบ 2 ครั้ง (ก่อน และหลังได้รับยาที่ 1 เดือน) จำนวน 3 คน และเก็บตัวอย่างได้ 1 ครั้ง (ก่อนได้รับยา) จำนวน 1 คน จากตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย เป็นเพศหญิงร้อยละ 78.9 โดยมีอายุเฉลี่ย 63.3 ปี ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ร้อยละ 73.7 มะเร็งปอดชนิด non-small cell ร้อยละ 26.3 ได้รับการรักษาด้วย gefitinib ร้อยละ 89.5 ได้รับการรักษาด้วย erlotinib ร้อยละ 5.3 ได้รับการรักษาด้วย dacomitinib ร้อยละ 5.3 มีประวัติได้รับเคมีบำบัดร้อยละ 15.8 มีประวัติได้รับการฉายแสงร้อยละ 36.8 มีประวัติใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของยาต้านจุลชีพ (antiseptic) ร้อยละ 10.5 มีประวัติใช้เครื่องสำอางร้อยละ 10.5 และมีประวัติใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรร้อยละ 10.5

ตารางที่ 6 ตารางแสดงจำนวนและร้อยละของผู้ป่วยมะเร็งก้อนระยะแพร่กระจายที่เข้าร่วมการวิจัย ข้อมูลการรักษา และข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน (คน)	ร้อยละ
	19	100.0
1. เพศ		
ชาย	4	21.1
หญิง	15	78.9
2. อายุ (ปี)		
41-50	3	10.5
51-60	4	31.6

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน (คน)	ร้อยละ
61-70	6	26.3
71-80	6	31.6
Mean = 63.32 SD = 10.719 Min = 44 Max = 80		
3. วินิจฉัย		
Adenocarcinoma of lung	14	73.7
Non-small cell lung cancer	5	26.3
4. ชนิดของ EGFR inhibitors		
Gefitinib	17	89.5
Erlotinib	1	5.3
Dacomitinib	1	5.3
5. ประวัติการรักษาด้วยเคมีบำบัด		
เคยได้รับเคมีบำบัด	3	15.8
ไม่เคยได้รับเคมีบำบัด	16	84.2
6. ประวัติการรักษาด้วยการฉายแสง		
ได้รับการฉายแสง	7	36.8
ไม่ได้รับการฉายแสง	12	63.2
7. Antiseptic use		
ใช่	2	10.5
ไม่ใช่	17	89.5
8. Herbal use		
ใช่	2	10.5
ไม่ใช่	17	89.5

ข้อมูลทั่วไป	จำนวน (คน)	ร้อยละ
9. Cosmetics		
ใช้	2	10.5
ไม่ใช้	17	89.5

พบว่าผลข้างเคียงทางผิวหนัง (ตารางที่ 7) ที่พบบมากที่สุดคือ acneiform eruption ร้อยละ 73.7 รองลงมาได้แก่ xerosis ร้อยละ 68.4 ซึ่งทั้งสองภาวะมักพบตั้งแต่ 2-4 สัปดาห์แรกหลังได้รับยา EGFR inhibitors ผลข้างเคียงทางผิวหนังอื่นๆที่สามารถพบได้ เช่น paronychia ร้อยละ 47.4, trichomegaly ร้อยละ 47.4, alopecia ร้อยละ 10.5, mucositis ร้อยละ 10.5, hypertrichosis ร้อยละ 15.8 และ melasma ร้อยละ 5.3 จากการวิจัยนี้พบว่า paronychia มักเกิดขึ้นที่ 4-8 สัปดาห์ trichomegaly มักเกิดขึ้นที่ 6 เดือน และ alopecia มักเกิดขึ้นที่ 3-6 เดือนหลังได้รับยา EGFR inhibitors

ตารางที่ 7 แสดงผลข้างเคียงทางผิวหนังต่างๆที่เกิดขึ้นหลังได้รับยา EGFR inhibitors

Onset	2 wk (N=18)	4 wk (N=18)	8 wk (N=16)	12 wk (N=17)	24 wk (N=15)	48 wk (N=7)	Total (%)
Cutaneous adverse events							
Acneiform eruption	7	5	1	-	1	-	14 (73.7)
Xerosis	3	7	-	-	2	1	13 (68.4)
Paronychia	-	3	5	1	-	-	9 (47.4)
Trichomegaly	-	-	1	1	6	1	9 (47.4)
Alopecia	-	-	-	1	1	-	2 (10.5)
Hypertrichosis	-	-	-	1	-	2	3 (15.8)
Mucositis	-	1	1	-	-	-	2 (10.5)
Melasma	-	-	1	-	-	-	1 (5.3)

ตารางที่ 8 แสดงผลเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก acneiform eruption และ paronychia จากผู้ป่วยจำนวน 10 คน พบขึ้นเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 คน (ร้อยละ 40) โดยเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* 2 คน (ร้อยละ 50) *Corynebacterium spp.* 1 คน (ร้อยละ 25) และ *Citrobacter koseri* 1 คน (ร้อยละ 25) ไม่ขึ้นเชื้อจำนวน 6 คน

ตารางที่ 8 แสดงผลเพาะเชื้อแบคทีเรียจากผลข้างเคียงทางผิวหนังชนิดต่างๆ

Patient	Cutaneous adverse events	Site	Bacterial culture results
ID01	Acneiform eruption at 24 wk	Upper back	<i>Corynebacterium spp.</i>
ID02	Acneiform eruption at 8 wk	Leg	<i>Staphylococcus aureus</i>
ID03	Acneiform eruption at 4 wk	Face	No growth
ID04	Acneiform eruption at 2 wk	Face	<i>Citrobacter koseri</i>
ID05	Acneiform eruption at 2 wk	Face	No growth
ID06	Acneiform eruption at 2 wk	Face	No growth
ID07	Acneiform eruption at 4 wk	Face	No growth
ID08	Paronychia at 4 wk	Finger	<i>Staphylococcus aureus</i>
ID16	Acneiform eruption at 2 wk	Face	No growth
ID17	Acneiform eruption at 2 wk	Face	No growth

ผล 16S rRNA gene sequencing ที่ตำแหน่ง hypervariable V3-V4 จากผู้ป่วยจำนวน 8 คน ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 98% และสามารถระบุเชื้อแบคทีเรียได้ถึงระดับจีโนส (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตาม ผล rRNA gene sequencing ที่ครบทั้งหมด 3 ตำแหน่ง (แก้ม, ซอกเล็บนิ้วโป้งเท้า และซอกเล็บนิ้วกลางเท้า) และครบ 3 ครั้ง (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) มีเพียง 8 ตัวอย่าง เนื่องจากสถานการณ์ COVID-19 ทำให้ห้องปฏิบัติการของคณะจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต้องปิดทำการเป็นเวลาหลายเดือน ทำให้ไม่สามารถทำ rRNA gene sequencing ได้นอกจากนี้การทำ rRNA gene sequencing นั้น ต้องทำหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน เพื่อให้เลี้ยง

อคติที่อาจเกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ที่ต่างช่วงเวลากัน การศึกษานี้เป็น prospective cohort study ซึ่งมีการรวบรวมคนไข้เข้ามาเรื่อยๆ ทำให้ต้องมีการรอตัวอย่างเพื่อทำ sequencing ในรอบเดียวกัน อีกทั้งตัวอย่างจากผิวหนังจัดอยู่ใน low bioburden คือสามารถพบเชื้อได้น้อย จึงทำให้ต้องมีการ sequence หลายรอบเพื่อให้ได้ปริมาณ DNA ที่มากพอที่จะนำมาวิเคราะห์ได้ ซึ่งแต่ละรอบการ sequence ต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน

ตารางที่ 9 แสดง operational taxonomic unit (OTUs), Chao, Shannon และ Coverage ในระดับ genus

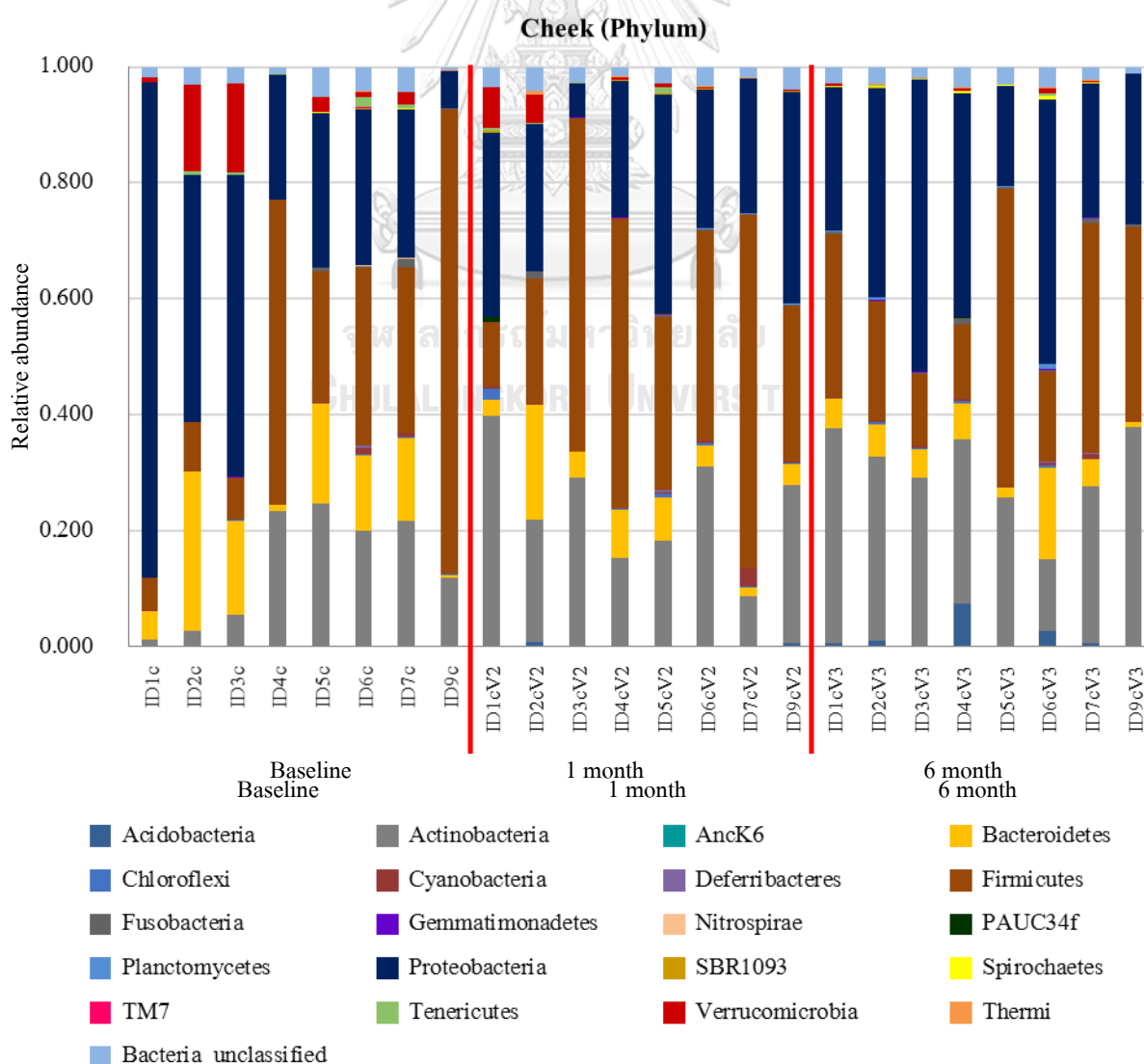
Group/Genus level	OTUs	Chao	Shannon	Coverage (%)
Cheek at baseline	293	352.7936	3.006959	99.91
Cheek at 1 month	357	420.7646	3.146728	99.89
Cheek at 6 month	486	559.5823	3.502396	99.87
Big toe at baseline	328	405.0288	2.728091	99.89
Big toe at 1 month	277	357.7889	2.435795	99.89
Big toe at 6 month	335	408.797	2.185573	99.87
Middle toe at baseline	345	409.6144	3.370676	99.9
Middle toe at 1 month	333	379.409	2.786061	99.9
Middle toe at 6 month	337	413.4391	2.142976	99.87

Skin swab ที่เก็บจาก 3 ตำแหน่ง (แก้ม, ซอกเล็บนิ้วโป้งเท้า และซอกเล็บนิ้วกลางเท้า) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) ของผู้ป่วยทั้งหมด 8 คน เก็บที่บริเวณผิวหนังปกติ แผนภูมิที่ 2 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัมจากตัวอย่างบริเวณแก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 ไฟลัมหลักที่พบในผิวหนัง ได้แก่ Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3 พบว่าไฟลัม Actinobacteria มีค่า relative abundance เพิ่มขึ้น และไฟลัม Bacteroidetes มีค่า relative abundance ลดลงหลังได้รับการ

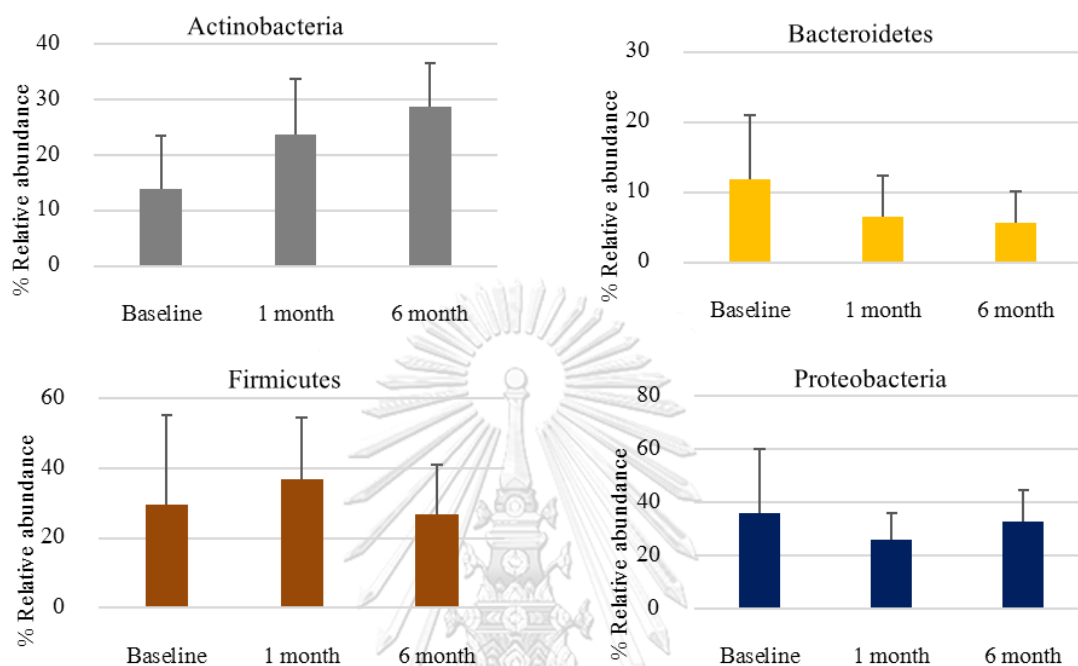
รักษาด้วย EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน ส่วนไฟลัม Firmicutes และ Proteobacteria ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

แผนภูมิที่ 4 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนมจากตัวอย่างบริเวณแก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 จีโนม ได้แก่ Staphylococcus, Corynebacterium, Acinetobacter, Enhydrobacter (แผนภูมิที่ 5) พบว่า Corynebacterium, Acinetobacter, Enhydrobacter มีค่า relative abundance ที่เพิ่มขึ้นหลังได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors ส่วน Staphylococcus ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน

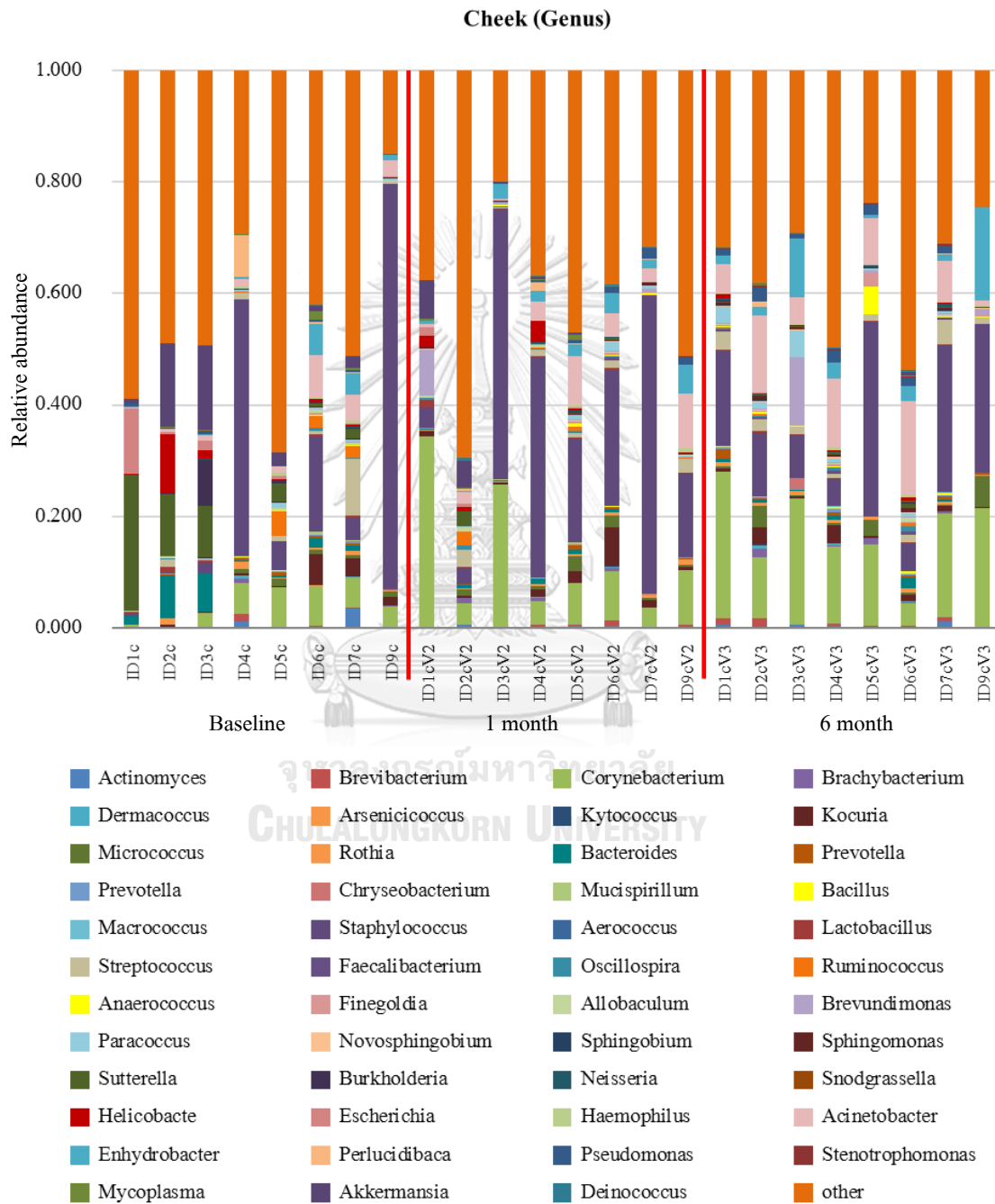
แผนภูมิที่ 2 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัมจากตัวอย่างบริเวณแก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา



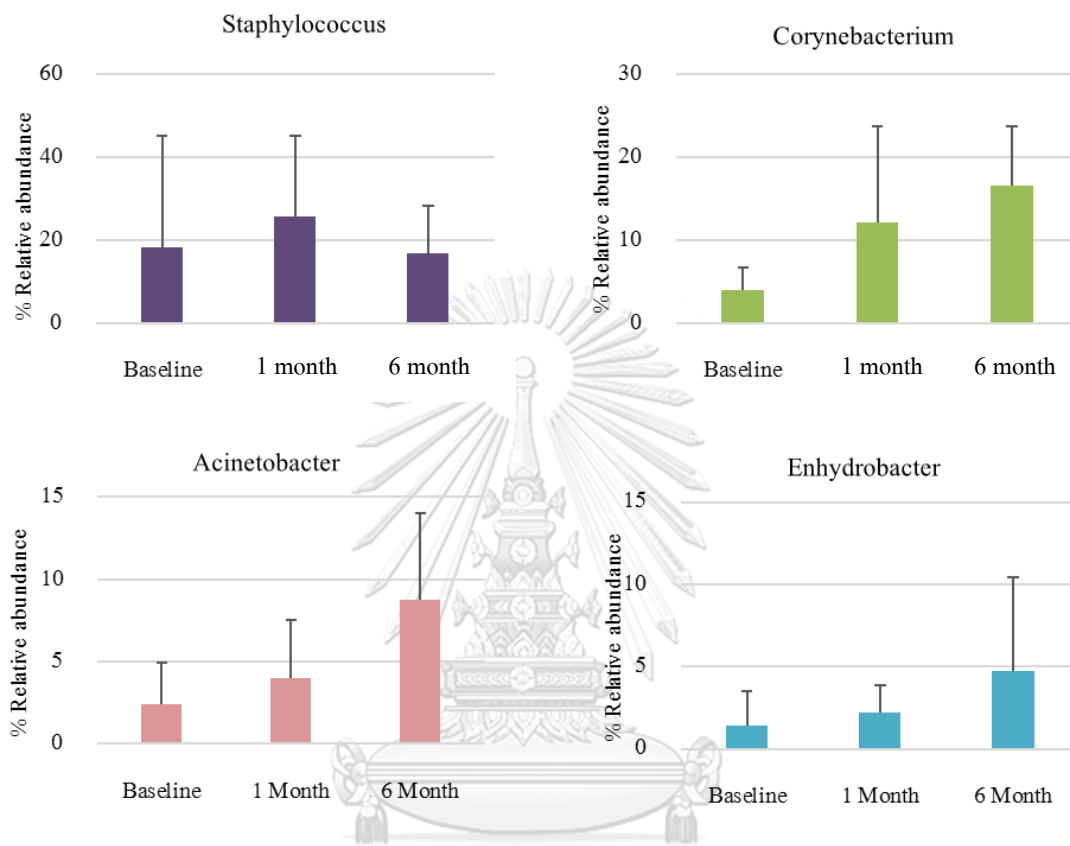
แผนภูมิที่ 3 แสดงผลรวมของค่า relative abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ไฟล์์ม จากตัวอย่างบริเวณ
แก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา



แผนภูมิที่ 4 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนม จากตัวอย่างบริเวณ
แก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา

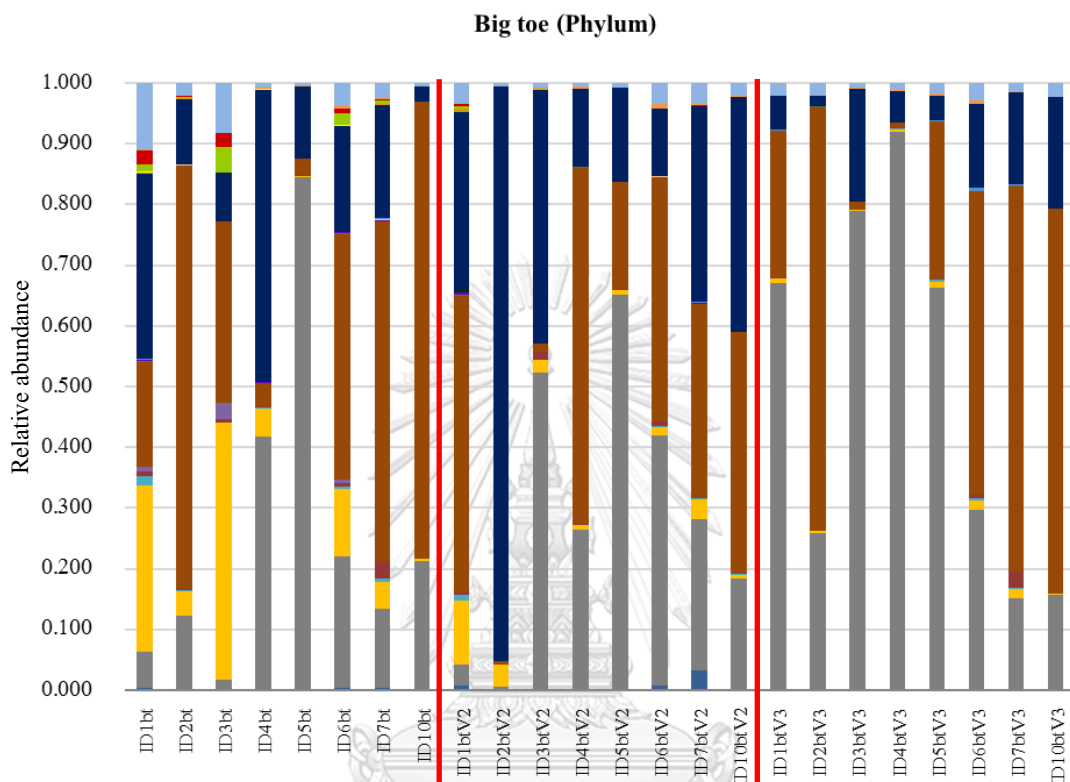


แผนภูมิที่ 5 แสดงผลรวมของค่า relative abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด จากตัวอย่างบริเวณแก้มของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา



แผนภูมิที่ 6 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัม จากตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วโป้งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID10) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 ไฟลัมหลักที่พบในผิวหนัง ดังแสดงในแผนภูมิที่ 7 พบว่าไฟลัม Actinobacteria มีค่า relative abundance เพิ่มขึ้น ส่วนไฟลัม Bacteroidetes และ Proteobacteria มีค่า relative abundance ลดลงหลังได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนของไฟลัม Firmicutes

แผนภูมิที่ 6 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัม จากตัวอย่าง บริเวณซอกเล็บนิ้วโป้งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID10) ที่ 3 ช่วงเวลา

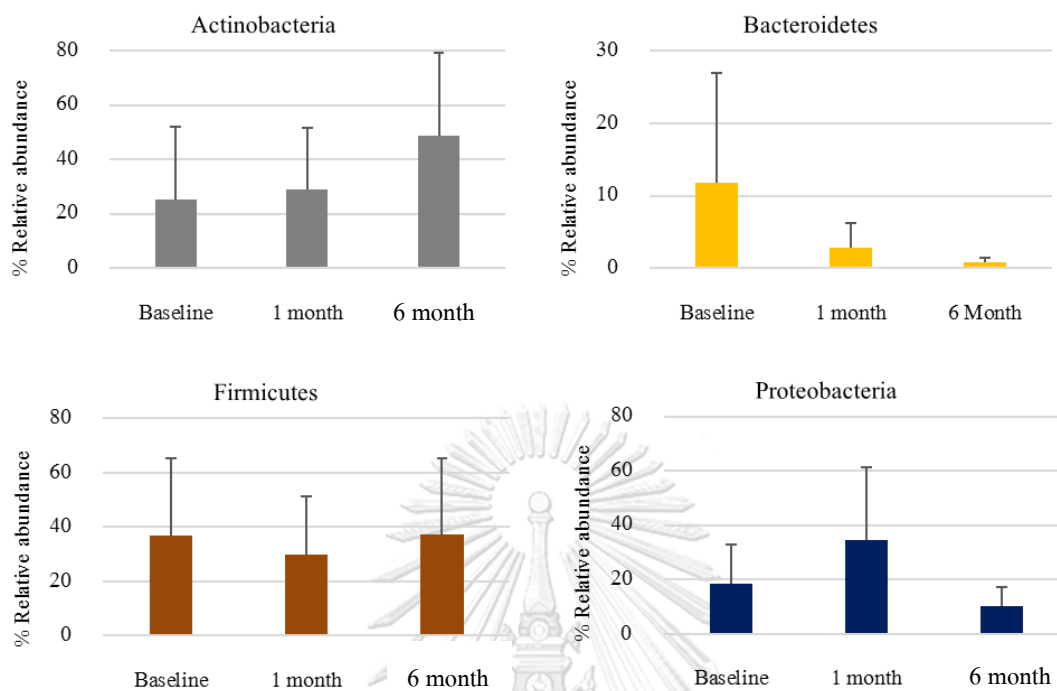


แผนภูมิที่ 7 แสดง



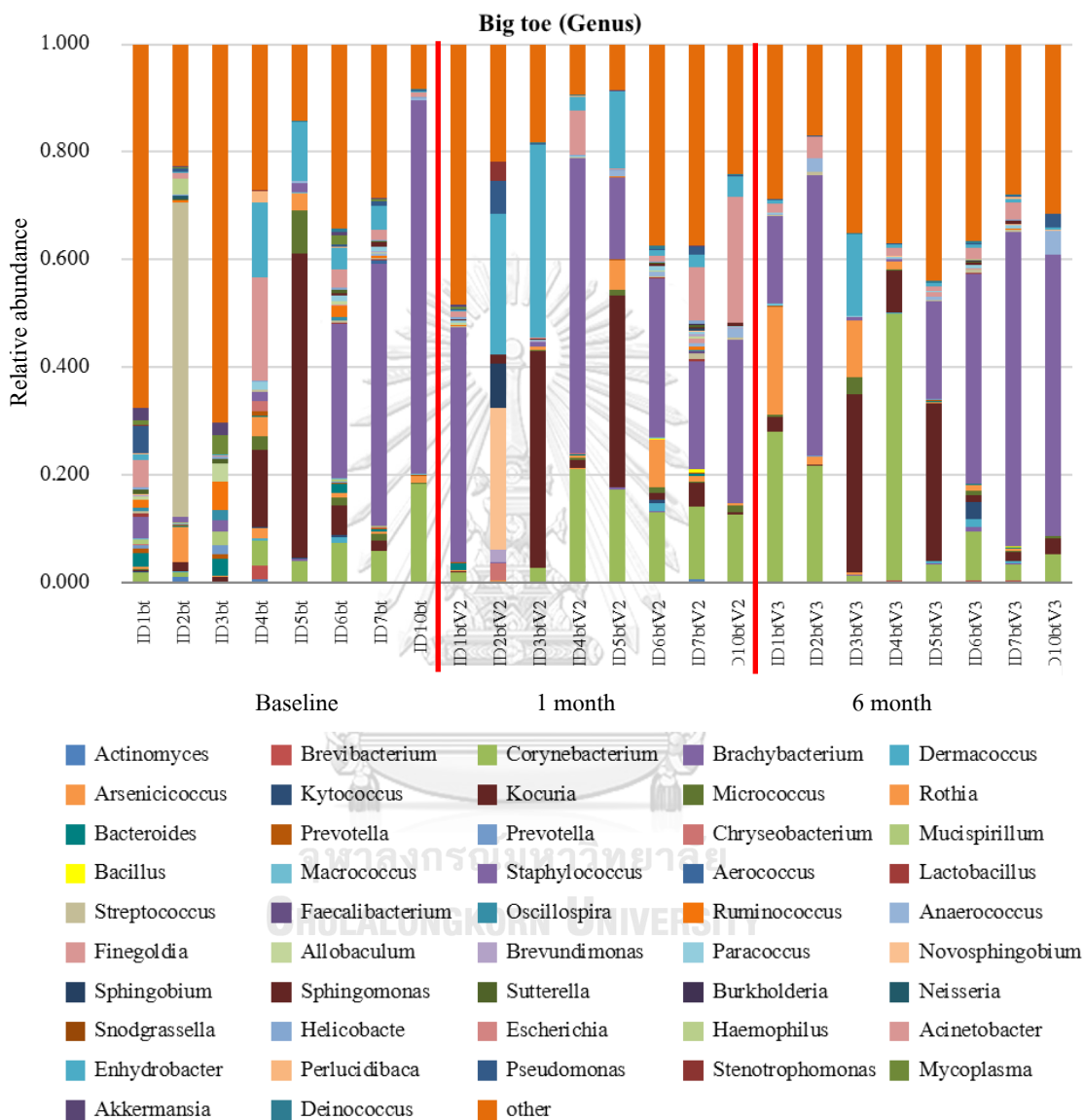
abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ไฟลัม จากตัวอย่างบริเวณซอกเล็บ

นิ้วโป้งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา

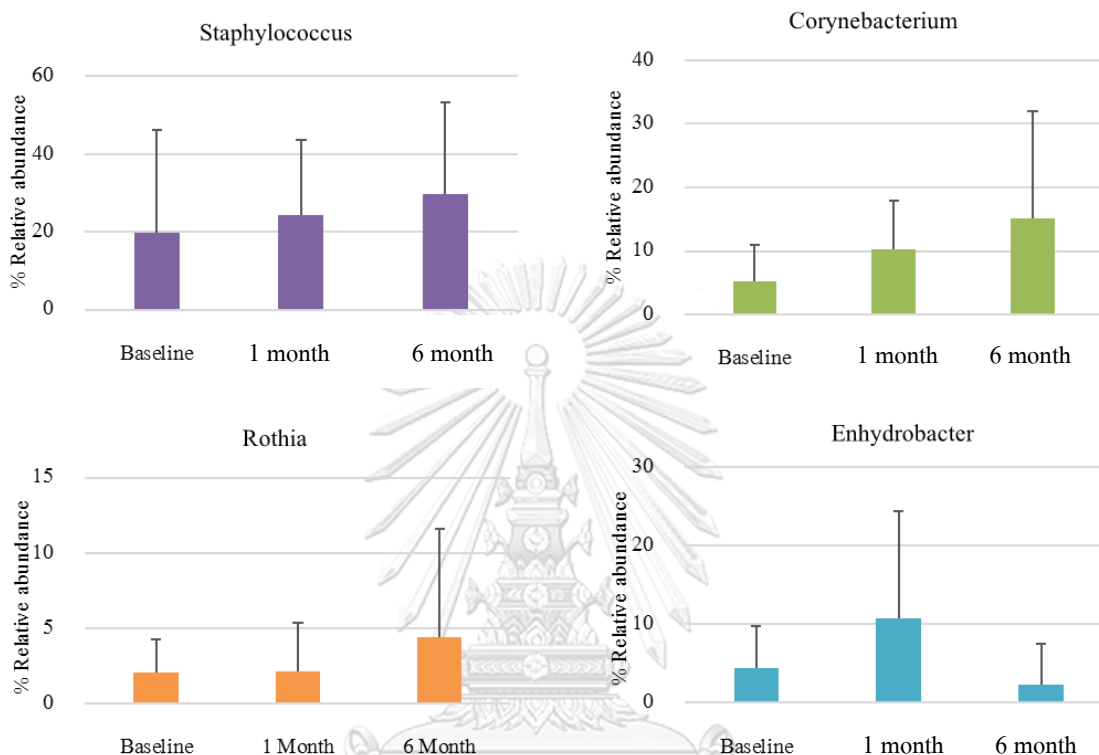


แผนภูมิที่ 8 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนม จาก ตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วโป้งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID10) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อน และหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 จีโนม ได้แก่ Staphylococcus, Corynebacterium, Rothia, Enhydrobacter (แผนภูมิที่ 9) พบว่า Staphylococcus, Corynebacterium, Rothia มีค่า relative abundance เพิ่มขึ้น ส่วน Enhydrobacter มีค่า relative abundance ลดลงหลัง ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors

แผนภูมิที่ 8 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนส จากตัวอย่างบริเวณ ซอกเล็บนิ้วโป้งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID10) ที่ 3 ช่วงเวลา

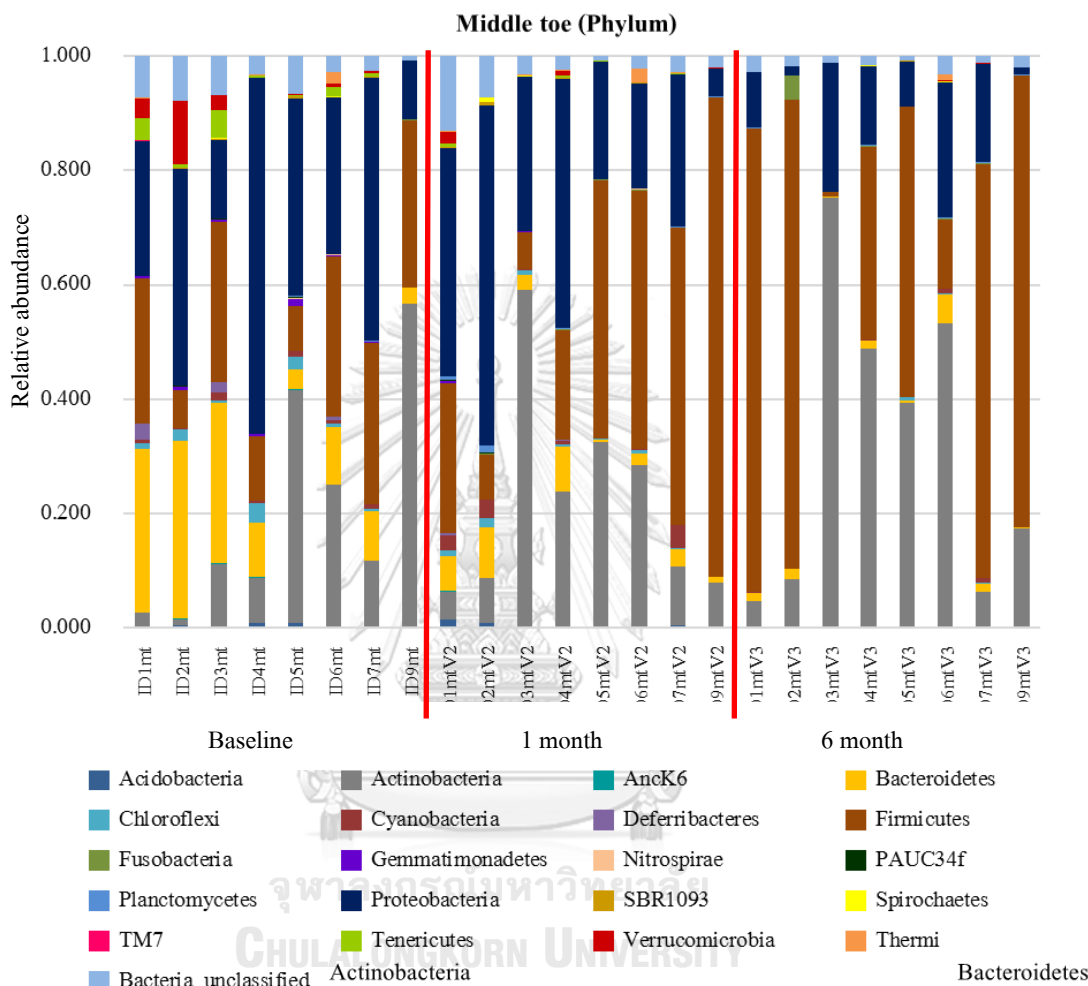


แผนภูมิที่ 9 แสดงผลรวมของค่า relative abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด จากตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วโป่งเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา

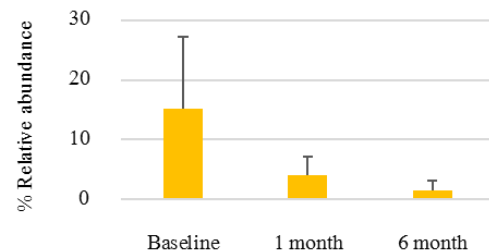
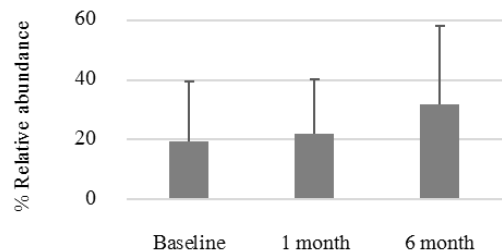


แผนภูมิที่ 10 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัม จากตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อนและหลังได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 ไฟลัมหลักที่พบในผิวหนัง ดังแสดงในแผนภูมิที่ 11 พบว่าไฟลัม Actinobacteria และ Firmicutes มีค่า relative abundance เพิ่มขึ้น ส่วนไฟลัม Bacteroidetes และ Proteobacteria มีค่า relative abundance ลดลงหลังได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors

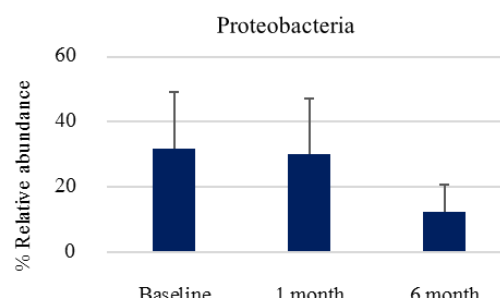
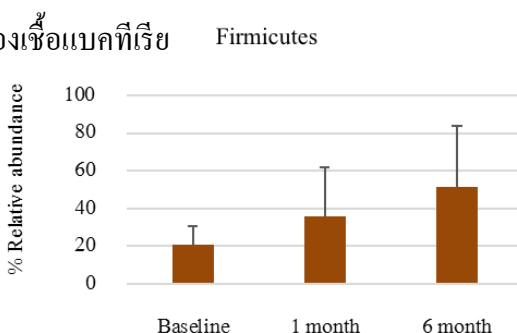
แผนภูมิที่ 10 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับไฟลัม จากตัวอย่าง บริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา



แผนภูมิที่ 11 แสดงผลรวมของค่า relative abundance ของ



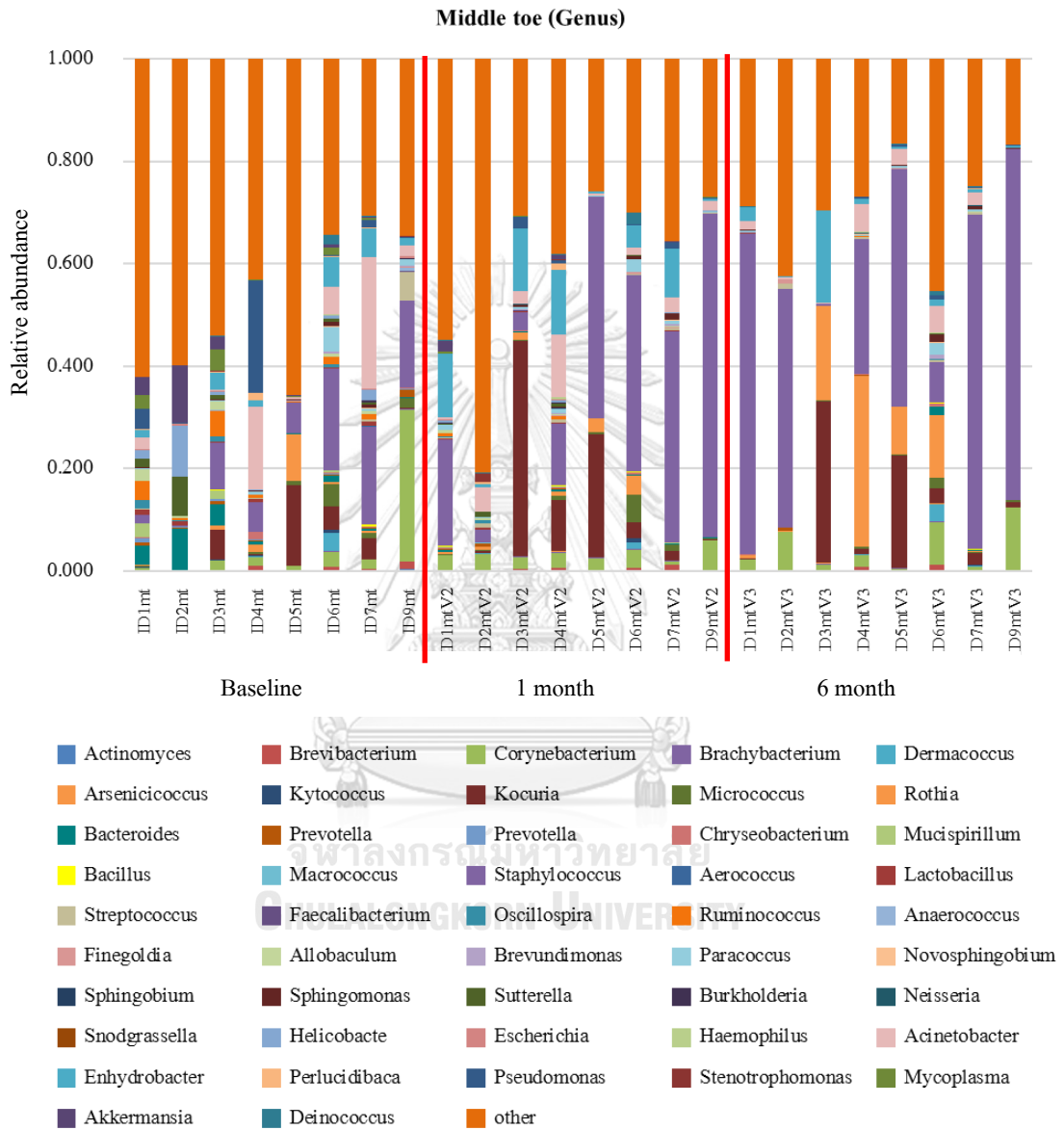
abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ไฟลัม จาก



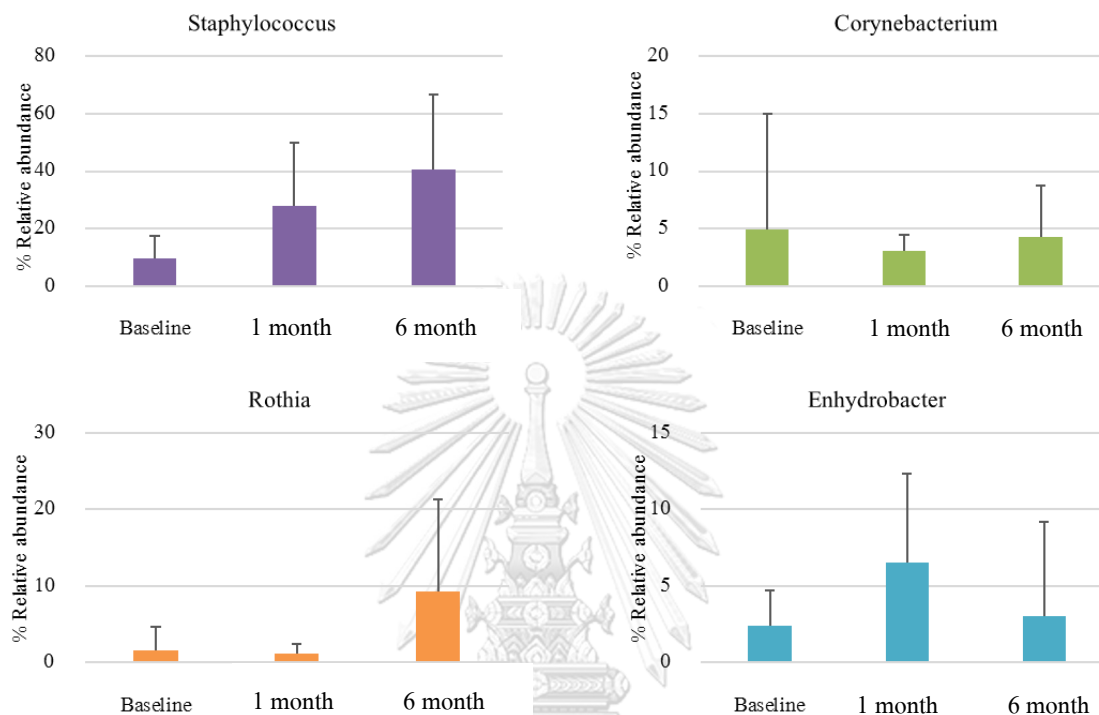
ตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา

แผนภูมิที่ 12 แสดง diversity และ relative abundance ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนม จาก ตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID10) ที่ 3 ช่วงเวลา (ก่อน และหลัง ได้รับยาที่ 1 เดือนและ 6 เดือน) เมื่อพิจารณา 4 จีโนม ได้แก่ Staphylococcus, Corynebacterium, Rothia, Enhydrobacter (แผนภูมิที่ 13) พบว่า Staphylococcus, Rothia มีค่า relative abundance เพิ่มขึ้น ส่วน Corynebacterium, Enhydrobacter ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน หลังได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors

แผนภูมิที่ 12 แสดง diversity และ relative abundances ของแบคทีเรียที่ระดับจีโนส จากตัวอย่าง บริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน (ID01-ID07, ID09) ที่ 3 ช่วงเวลา

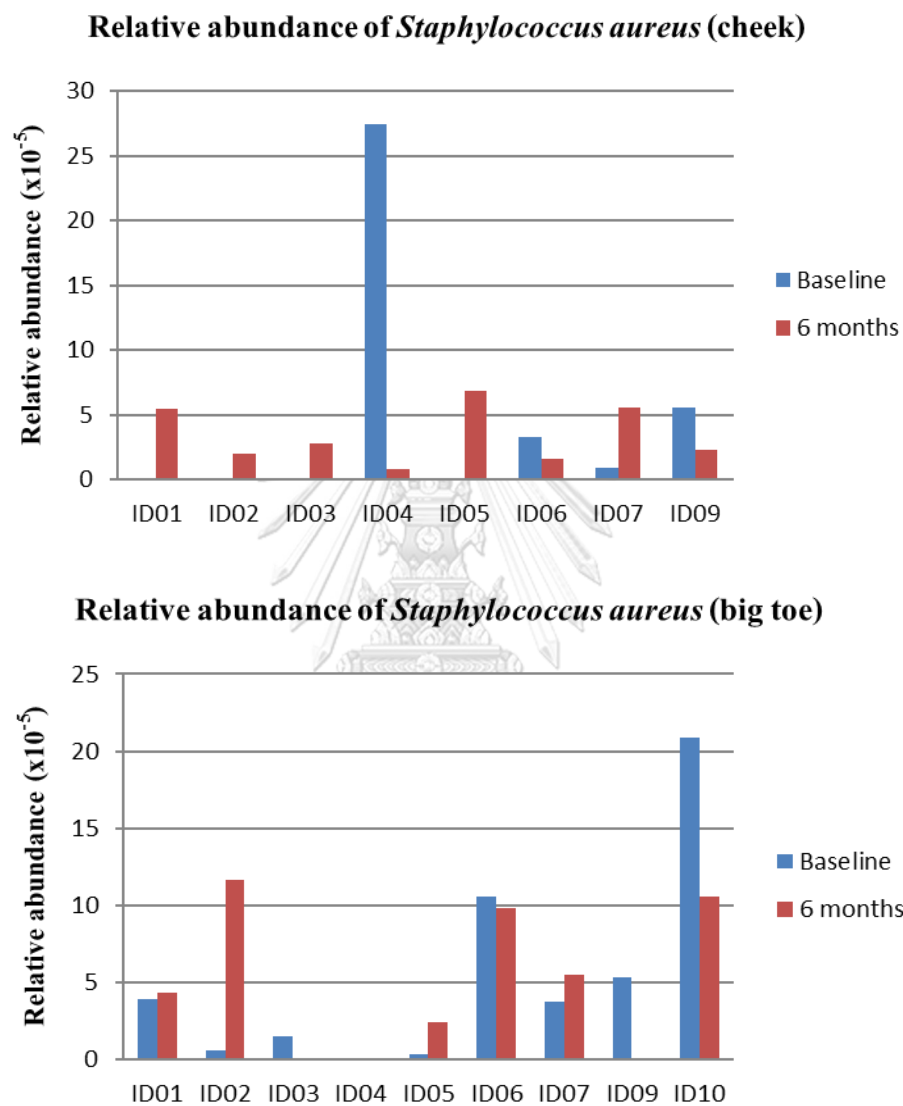


แผนภูมิที่ 13 แสดงผลรวมของค่า relative abundance ของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด จากตัวอย่างบริเวณซอกเล็บนิ้วกลางเท้าของผู้ป่วยจำนวน 8 คน เปรียบเทียบที่ 3 ช่วงเวลา

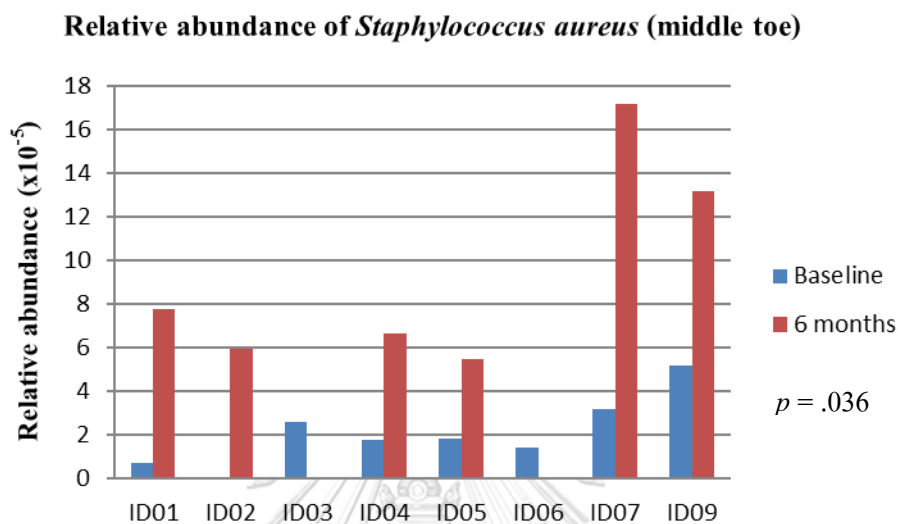


จากการวิเคราะห์ที่ระดับสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่า relative abundance ของ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างทั้ง 3 ตำแหน่ง เปรียบเทียบที่ก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าค่า relative abundance ของ *Staphylococcus aureus* ที่บริเวณซอกนิ้วกลางเท้ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = .036$) แต่ที่บริเวณแก้มและซอกเล็บนิ้วโป่งเท้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แผนภูมิที่ 14)

แผนภูมิที่ 14 แสดงค่า relative abundance ของ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างทั้ง 3 ตำแหน่ง เปรียบเทียบที่ก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitor เป็นระยะเวลา 6 เดือน



แผนภูมิที่ 14 (ต่อ) แสดงค่า relative abundance ของ *Staphylococcus aureus* จากตัวอย่างทั้ง 3 ตำแหน่ง เปรียบเทียบที่ก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน

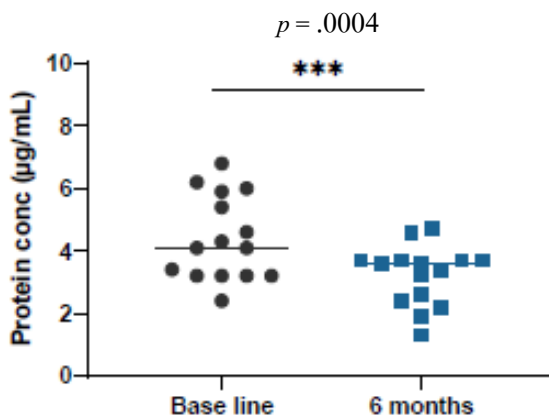


จากการวิเคราะห์ผล total protein และ antimicrobial peptides จากชั้น stratum corneum ที่ได้จาก tape stripping technique จากผู้ป่วยทั้งหมด 15 คน พบว่า total protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = .0004$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังได้รับยา EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน (แผนภูมิที่ 15) เมื่อวิเคราะห์ด้วย ELISA เพื่อดูปริมาณ hBD3 และ RNase7 ตารางที่ 10 แสดงอัตราส่วน AMPs/total protein ของ hBD3 และ RNase7 ที่ก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors ของผู้ป่วยทั้งหมด 15 คน เมื่อคำนวณทางสถิติด้วย paired t-test พบว่า RNase7 มีค่าลดลงจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0267$) แต่ hBD-3 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังการได้รับยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แผนภูมิที่ 16)

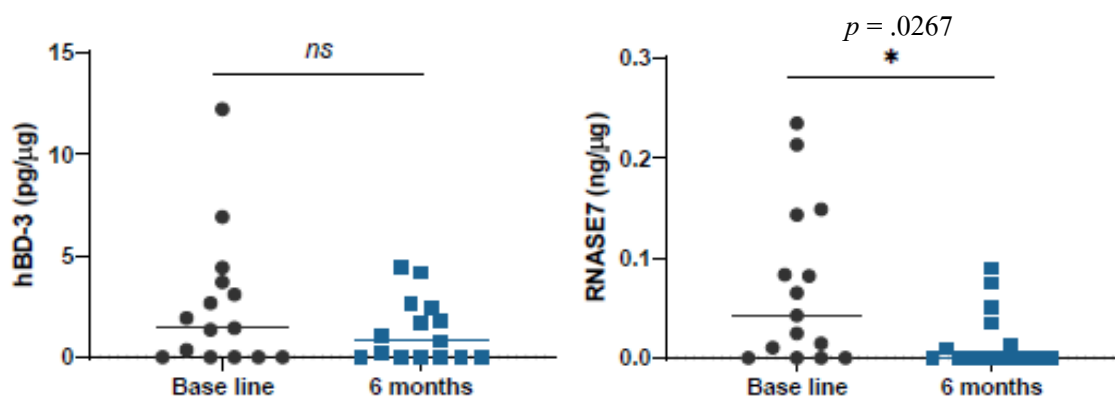
ตารางที่ 10 แสดงอัตราส่วนของ AMPs/total protein ของ hBD-3 และ RNase7 เปรียบเทียบที่ก่อน และหลังรักษาด้วย EGFR inhibitors 6 เดือน

Patient	hBD-3 (pg/ μ g)		Rnase7 (ng/ μ g)	
	Baseline	6 month	Baseline	6 month
ID01	6.921	-0.387	0.082	-0.079
ID02	3.097	-0.565	0.214	-0.019
ID03	-0.524	1.087	0.065	0.035
ID04	1.934	2.434	0.015	-0.149
ID05	1.449	0.796	0.025	0.009
ID06	-0.782	0.203	0.083	0.075
ID07	-1.854	-1.779	0.043	-0.128
ID09	1.35	-0.512	0.01	-0.067
ID10	3.703	4.179	0.235	0.051
ID11	2.665	2.624	0.149	-0.011
ID13	-3.772	1.719	0.143	0.013
ID14	0.359	4.471	-0.047	0.09
ID15	12.236	-0.536	-1.368	-1.51
ID16	4.421	-0.876	-1.268	-1.472
ID17	-0.915	1.809	-1.515	-1.673
Mean	2.019	0.978	-0.209	-0.322

แผนภูมิที่ 15 แสดงค่า total protein ที่วัดได้จาก Micro BCA protein assay kit เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน

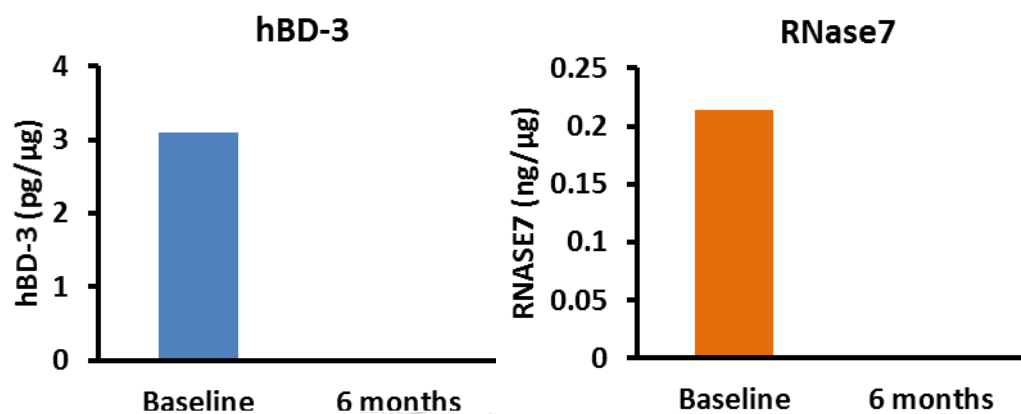


แผนภูมิที่ 16 แสดงค่า hBD-3 และ RNase7 ที่ได้จาก ELISA เปรียบเทียบก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน



นอกจากนี้ยังพบว่า hBD-3 และ RNase7 มีค่าลดลงหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือนในผู้ป่วย ID02 ซึ่งผลเพาะเชื้อจากคุ่มหนองที่ขาพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* (แผนภูมิที่ 17)

แผนภูมิที่ 17 แสดงค่า hBD-3 และ RNase7 ของผู้ป่วย ID02 เปรียบเทียบที่ก่อนและหลังรักษาด้วย EGFR inhibitors



ค่า biophysical properties ในผู้ป่วยทั้งหมด 15 คน เมื่อเปรียบเทียบที่ baseline และหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าความชุ่มชื้นของผิวหนัง (skin moisture), TEWL และ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจาก baseline อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ sebum บริเวณลำตัวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงค่า biophysical properties ของผู้ป่วยจำนวน 15 คน เปรียบเทียบที่ก่อนและหลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน

Biophysical properties measurement	Mean at the baseline	Mean at 6 months	Mean difference	Standard error	t	p-value
Skin elasticity (Cutometer)	0.84	0.72	0.12	0.16	-0.73	0.476
Skin moisture (Corneometer)	38.11	50.44	12.33	2.45	5.031	0.0002
TEWL (Tewameter)	4.18	6.52	2.34	0.72	3.248	0.006
Sebum; Face (Sebumeter)	66.18	64.81	1.37	11.94	-0.115	0.91
Sebum; Trunk (Sebumeter)	10.53	4.97	5.57	2.18	-2.559	0.023
Skin color; Face (Colorimeter)	58.3	56.74	1.56	1.42	-1.104	0.288
Skin color; Arm (Colorimeter)	59.7	59.1	0.6	0.84	-0.718	0.485
Skin pH (pH meter)	5.04	5.38	0.34	0.13	2.63	0.02

บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

EGFR inhibitors เป็นยาพุ่งเป้าชนิดหนึ่งที่น่ามาใช้ในการรักษามะเร็งก่อนระยะแพร่กระจายมากขึ้นในปัจจุบัน เช่น มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอ (squamous cell carcinoma of head and neck) EGFR inhibitors แบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ 1.monoclonal antibodies ออกฤทธิ์ โดยการจับกับ EGFR ที่อยู่บริเวณผิวของเซลล์ ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น cetuximab, panitumumab 2.tyrosine kinase inhibitors ออกฤทธิ์ โดยการยับยั้ง tyrosine kinase function ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น gefitinib, erlotinib, lapatinib(32, 33)

EGFR inhibitors นั้นมีข้อดีในแง่ของผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นกับร่างกายน้อยกว่าการรักษามะเร็งด้วยวิธีดั้งเดิม เช่น การให้เคมีบำบัด และการฉายแสง เนื่องจากยาออกฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งเป็นหลัก อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงทางผิวหนัง (cutaneous adverse events) มักพบได้บ่อยจากการรักษาด้วยยาพุ่งเป้ากลุ่มนี้ เนื่องจาก EGFR มีความสำคัญต่อภาวะสมดุลของเนื้อเยื่อ (tissue homeostasis) และการพัฒนาเจริญเติบโตของหนังกำพร้า (development and physiology of epidermis) โดยพบ EGFR มากที่ basal and suprabasal layer ของหนังกำพร้า และที่ outer root sheath ของ hair follicle(34) ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้จากกลไกของ EGFR signaling ที่ผิวหนัง ในสภาวะปกติ EGFR มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในผิวหนัง หนูลทดลองที่มี EGFR ที่บกพร่องไปจะมีผิวหนังที่ผิดปกติ เช่น ผิวหนังไม่สมบูรณ์ เกิดการอักเสบ หรือมีเส้นขนที่ผิดปกติ(35, 36) การยับยั้ง EGFR signaling ทำให้การเจริญเติบโตของ keratinocyte หยุดชะงัก (growth arrest) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ลดการเคลื่อนย้ายเซลล์ (cell migration) และทำให้เซลล์มีการเจริญที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังทำให้มีการหลั่ง chemokine ที่มากขึ้น รวบรวม inflammatory cell มาที่ผิวหนังมากขึ้น(37-39) เกิดเป็นอาการแสดงทางผิวหนังต่างๆ ได้แก่ ผื่นลักษณะคล้ายสิว (acneiform eruption) ผิวแห้ง (xerosis) เนื้อขอบเล็บอักเสบ (paronychia) ผมร่วง (alopecia) ขนตาหนา (trichomegaly) ภาวะขนดก (hypertrichosis) เยื่อในช่องปากอักเสบ (mucositis) ส่งผลให้อาจต้องลดขนาดยาหรือหยุดยา

หากผู้ป่วยมีผลข้างเคียงที่รุนแรงที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งจากการวิจัยนี้พบ acneiform eruption มากที่สุด โดยพบมากในช่วง 2-4 สัปดาห์หลังเริ่มรักษาด้วย EGFR inhibitors ซึ่งเข้าได้กับการศึกษาของ Willium Jacot และคณะ ที่พบ acneiform eruption เป็นผลข้างเคียงทางผิวหนังที่พบได้มากที่สุด (ร้อยละ 55) ภายหลังจากการรักษาด้วย gefitinib โดยพบมากช่วง 1-2 สัปดาห์หลังเริ่มยา (40) ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่พบมารองลงมาได้แก่ xerosis และ paronychia โดย xerosis พบได้ตั้งแต่หลังได้รับการรักษา 2 สัปดาห์เป็นต้นไป ส่วน paronychia มักพบในช่วง 4-8 สัปดาห์ ส่วน trichomegaly, alopecia และ hypertrichosis เริ่มพบได้ตั้งแต่ 12 สัปดาห์หลังได้รับการรักษา ซึ่งเข้าได้กับการศึกษาของ Caroline Robert และคณะที่พบผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกี่ยวกับเส้นผมและขนในช่วง 8-12 สัปดาห์หลังการรักษาด้วย EGFR inhibitors(41)

EGFR inhibitors มีผลต่อโครงสร้างผิวหนัง เมื่อตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาพบว่าความหนาของชั้น epidermis และชั้น stratum corneum บางลงและอัดกันแน่นมากขึ้น(33, 42) การยับยั้ง EGFR ทำให้ keratinocyte differentiation ผิดปกติ การผลัดเซลล์ (desquamation) ลดลง ทำให้ผิวหนังสูญเสียความสามารถในการกักเก็บน้ำไว้ในชั้น epidermis(37) อาการแสดงที่พบคือผิวแห้งและทำให้มีอาการคันตามมาได้ จากการวิจัยนี้พบว่า transepidermal water loss (TEWL) มีค่าเพิ่มขึ้น และ sebum ที่วัดได้จาก sebumeter บริเวณลำตัวมีค่าลดลง รวมถึงค่า pH ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสามารถอธิบายเรื่องผิวแห้งที่พบในผู้ป่วยหลังได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าที่วัดได้จาก corneometer เพิ่มขึ้นจากก่อนได้รับ EGFR inhibitors อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึง skin moisture ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ที่มีผลต่อความชุ่มชื้นของผิวหนัง เช่น การวัดที่ฤดูกาลที่แตกต่างกันส่งผลให้ความชื้นสัมพัทธ์มีค่าแตกต่างกัน นอกจากนี้การวิจัยนี้มีการให้ครีมชุ่มชื้นแก่ผู้ป่วยไปทาอย่างสม่ำเสมอด้วย

ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นภายหลังจากการรักษาด้วย EGFR inhibitors ในช่วงแรก (early stage) พบว่าเป็นภาวะของการอักเสบที่ไม่มีการติดเชื้อ (sterile inflammation) แต่ในช่วงหลังหรือในรอยโรคที่เป็นต่อเนื่องมานาน (late stage or persistent lesion) มักพบว่ามี การติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น R.E. Eilers และคณะพบว่าผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors จำนวน 221 คน ที่มีผลข้างเคียงทางผิวหนังเกิดขึ้น พบว่าร้อยละ 28 มีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วย ซึ่งพบเป็นเชื้อ

Staphylococcus aureus ร้อยละ 23 โดยเป็น methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ร้อยละ 5.4(33) ส่วนอีกการศึกษาหนึ่งได้วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbiological analyses) จาก pustular eruption ในผู้ป่วยที่ได้รับยา erlotinib พบว่า ร้อยละ 70 ของผู้ป่วยมีการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนมากเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ร้อยละ 53.6) รองลงมาเป็น enterobacteriaceae (ร้อยละ 17.9) และ เชื้ออื่นๆ (ร้อยละ 28.6)(43) ซึ่งจากการวิจัยนี้พบขึ้นเชื้อแบคทีเรียจากการเพาะเชื้อที่ได้จาก acneiform eruption และ paronychia รวมกัน 4 คน จากทั้งหมด 10 คน(ร้อยละ 40) โดยเป็น *Staphylococcus aureus* 2 คน จากการวิจัยนี้ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการเพาะเชื้อจากผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นในช่วงแรก (early stage cutaneous adverse events) จึงอาจอธิบายสาเหตุของการขึ้นเชื่อน้อยในการวิจัยนี้ได้ เนื่องจากในช่วงแรกมักเป็นการอักเสบที่ไม่มีการติดเชื้อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota ในผู้ป่วยที่ได้รับยา EGFR inhibitors จากการศึกษาที่พบการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* มากขึ้นในผู้ป่วยที่มีผลข้างเคียงทางผิวหนังเกิดขึ้นหลังจากรักษาด้วย EGFR inhibitors ในช่วงหลัง (late stage cutaneous adverse events) จึงเกิดสมมติฐานว่าการพบการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เพิ่มมากขึ้นนั้นเกิดจากการ colonization ของเชื้อชนิดนี้มากขึ้นดังเช่นใน atopic dermatitis หรือไม่ว่า ซึ่งจากผล rRNA gene sequencing พบว่า เมื่อพิจารณาที่ระดับสปีชีส์ พบว่า *Staphylococcus aureus* ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นจากก่อนรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการพบการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เพิ่มมากขึ้นใน late stage cutaneous adverse event นั้นเกิดจากการมี *Staphylococcus aureus* colonization เพิ่มขึ้นภายหลังการรักษาด้วย EGFR inhibitors อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ระดับไฟลัม พบว่า Actinobacteria มีค่า relative abundance ที่เพิ่มมากขึ้น และ Bacteroidetes มีค่า relative abundance ที่ลดลง ภายหลังการรักษาด้วย EGFR inhibitors จากตัวอย่างทั้ง 3 ตำแหน่ง (แก้ม ซอกนิ้วโป้ง และซอกนิ้วกลางเท้า) ซึ่งภาวะความไม่สมดุลของเชื้อแบคทีเรีย (Dysbiosis) ที่เกิดขึ้นนี้ อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เพิ่มขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้มีจำนวนประชากรค่อนข้างน้อยจึงอาจทำให้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากมีจำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้นอาจทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมากขึ้นได้

ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors มักมีผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้น ซึ่งการสูญเสียความสามารถในการป้องกันของผิวหนัง (barrier function) ร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง (cutaneous immune system) บกพร่องไปอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบได้มากขึ้นในผู้ป่วยกลุ่มนี้(33) ปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยมะเร็งเสี่ยงต่อการมี *Staphylococcus aureus* colonization ที่ผิวหนัง ได้แก่ การเข้ารับการรักษาแบบผู้ป่วยในมากกว่า 5 ครั้งต่อปี การได้รับเคมีบำบัด การมีโรคผิวหนังเรื้อรัง การได้รับการผ่าตัดแล้วต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาลนาน 2 สัปดาห์(44) ดังนั้นการลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors สามารถทำได้โดยการกำจัดเชื้อที่ colonization อยู่ที่ผิวหนัง รวมทั้งหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับบุคคลที่มี colonization ของเชื้อที่ผิวหนังด้วย(45)

Antimicrobial peptides (AMPs) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ innate immune response ทำหน้าที่ป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรคเข้าสู่ผิวหนัง ถูกสร้างโดย keratinocyte เป็นหลัก แต่ mast cell, eccrine sweat gland(46) หรือแบคทีเรียที่อยู่เป็นเชื้อประจำถิ่น (commensal bacteria) ก็ สามารถสร้าง AMPs ได้(47) ในภาวะที่มีการอักเสบหรือมีการติดเชื้อเกิดขึ้น AMPs จะถูกกระตุ้นให้ผลิตออกมามากขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการกระตุ้น innate immune response หรือกำจัดเชื้อก่อโรคโดยตรง (direct killing pathogen) นอกจากนี้ AMPs ยังมีบทบาทในการรักษาสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวหนังและจำกัดไม่ให้จุลินทรีย์เหล่านี้เข้าสู่เนื้อเยื่อภายในร่างกายได้(48, 49) AMPs ที่พบมากบริเวณผิวหนัง เช่น defensins, cathelicidin, dermcidin, RNase7 และ psoriasin การวิจัยนี้เลือกใช้ tape stripping technique ในการศึกษา AMPs ที่อยู่ในชั้น stratum corneum ของผิวหนัง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดการบาดเจ็บ Maja-Lisa Clausen และคณะ ได้ศึกษา AMPs ที่ผิวหนังโดยใช้ tape stripping technique ซึ่งสามารถตรวจพบทั้ง hBD2, hBD3, RNase7 และ psoriasin แต่ไม่สามารถตรวจพบ cathelicidin ได้จากวิธีนี้(24) จากการศึกษาของ Beate M. Lichtenberger และคณะซึ่งเป็น in vitro study พบว่า erlotinib ทำให้ human keratinocyte ลดการสร้าง hBD-3, RNase7 และ cathelicidin นอกจากนี้ Kio Park และคณะได้ทำ in vitro study พบว่าทั้ง erlotinib และ gefitinib ทำให้ human keratinocyte ใน supernatant ของ *Staphylococcus epidermidis* สร้าง hBD-2 และ hBD-3 ลดลง(27) การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกที่เป็น in vivo study ศึกษา hBD-3 และ

RNase7 ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการได้รับยาเป็นระยะเวลา 6 เดือน จากผลการศึกษาพบว่า RNase7 ที่ได้จากการทำ tape stripping technique จากผิวหนังบริเวณแก้มของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors เมื่อเปรียบเทียบกับที่ก่อนและหลังได้รับยาเป็นระยะเวลา 6 เดือน มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใน hBD-3 ซึ่ง AMPs ทั้งสองชนิดนี้ จัดเป็น cationic AMPs (CAMPs) มีหน้าที่ป้องกันผิวหนังจากเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น *Staphylococcus aureus*(50) จากการศึกษาแบบ in vitro พบว่า RNase7 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ได้(49, 51) ในผู้ป่วย ID02 ที่ผลเพาะเชื้อแบคทีเรียขึ้นเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่ามีการลดลงของ hBD-3 และ RNase7 หลังได้รับ EGFR inhibitors เป็นระยะเวลา 6 เดือน ซึ่งอาจสามารถอธิบายการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากการศึกษาของ AMPs ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ ดังนั้นการลดลงของ RNase7 ที่พบจากการวิจัยนี้อาจเป็นหลักฐานหนึ่งสนับสนุนการพบการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่มีผลข้างเคียงทางผิวหนังจากการรักษาด้วย EGFR inhibitors ได้

จุดแข็งของการวิจัย

จากการศึกษามากมายเกี่ยวกับ EGFR inhibitors ที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มุ่งเป็นการศึกษาเรื่องผลข้างเคียงทางผิวหนังที่เกิดขึ้นภายหลังจากการรักษาด้วย EGFR inhibitors และศึกษาเรื่องการติดเชื้อที่พบได้ในรอยโรคที่เป็นผลข้างเคียงเหล่านั้น โดยพบอุบัติการณ์การติดเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นในรอยโรคที่เกิดภายหลังการได้ EGFR inhibitors มาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งหลายการศึกษาพบว่าผลข้างเคียงทางผิวหนังเหล่านั้นเมื่อเพาะเชื้อแบคทีเรีย มักพบขึ้นเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นส่วนใหญ่ แต่ยังไม่เคยมีการนำ 16S rRNA sequencing มาใช้ในการศึกษา skin microbiota ในกลุ่มผู้ป่วยนี้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงกลไกการเกิดผลข้างเคียงทางผิวหนังจากการที่ EGFR inhibitors ไปยังยับยั้ง EGFR signaling ด้วยวิธีต่างๆตามแต่ชนิดของยา ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ immune response ที่ผิวหนัง ทั้งการกระตุ้นการหลั่ง cytokine และ chemokine ต่างๆ มีการศึกษาทั้งในหนูทดลอง และการศึกษาที่เป็น in vitro study แสดงให้เห็นถึง AMPs ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปภายหลังจากได้รับ EGFR inhibitors เช่นเดียวกับ skin microbiota ยังไม่เคยมีการศึกษา AMPs แบบ in vivo ในผู้ป่วยที่ได้รับ EGFR inhibitors มาก่อน การวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษา skin microbiota ใน

ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย EGFR inhibitors อีกทั้งยังเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษา AMPs ได้แก่ hBD-3 และ RNase7 ที่เปลี่ยนแปลงไปแบบ in vivo ในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ข้อจำกัดในการวิจัย

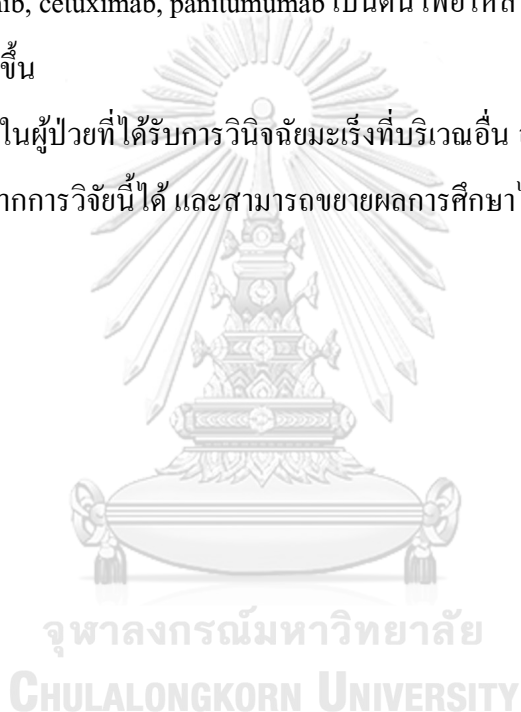
1. จำนวนประชากรของการวิจัยน้อย เนื่องจากผู้ป่วยหลายรายอยู่ต่างจังหวัด จึงมีส่วนน้อยที่สามารถมาตรวจครบตามนัดทุกครั้งได้
2. การทำ 16S rRNA sequencing ของการวิจัยนี้ไม่สามารถทำพร้อมกันทุกตัวอย่างในเวลาเดียวกันได้ เนื่องจากมีการรวบรวมผู้ป่วยเข้ามาในงานวิจัยเรื่อยๆ ดังนั้นอาจเกิดอคติจากการวิเคราะห์ข้อมูลในช่วงเวลาที่ต่างกันได้
3. ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในการวิจัยนี้ได้รับการรักษาด้วย gefitinib จึงอาจไม่สามารถขยายผลการศึกษานี้ไปใช้กับยาชนิดอื่นในกลุ่ม EGFR inhibitors ได้ดีเท่าที่ควร
4. ผู้ป่วยทั้งหมดในการวิจัยนี้ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอด จึงอาจไม่สามารถขยายผลการศึกษานี้ไปใช้กับผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งที่บริเวณอื่น

สรุปผล

การวิจัยนี้พบว่า EGFR inhibitors มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ skin microbiota โดยพบไฟลัม Actinobacteria ที่เพิ่มขึ้นและไฟลัม Bacteroidetes ที่ลดลง ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของ RNase7 ที่ลดลงภายหลังการได้รับยาชนิดนี้ นอกจากนี้ EGFR inhibitors ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง biophysical properties ของผิวหนัง โดยพบ TEWL ที่เพิ่มขึ้น sebum ที่ลดลง และ pH ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับ EGFR inhibitors เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่พบ *Staphylococcus aureus* ที่ colonization ที่ผิวหนังเพิ่มมากขึ้นจากก่อนได้รับยา แต่การพบ *Staphylococcus aureus* infection ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเหล่านี้สามารถอธิบายได้จาก RNase7 ที่ลดลงภายหลังการที่ได้รับ EGFR inhibitors ได้

ข้อเสนอแนะ

1. การวิจัยครั้งหน้าแนะนำให้ใช้จำนวนประชากรที่เพิ่มมากขึ้น อาจทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนมากขึ้น อาจทำให้พบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญทางสถิติได้
2. การรวบรวมผู้ป่วยที่ได้รับ EGFR inhibitors จำนวนมากที่ก่อนและหลังได้รับยา โดยส่งตรวจ 16S rRNA sequencing ในระยะเวลาเดียวกัน เพื่อลดอคติที่อาจเกิดขึ้นได้
3. การศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับ EGFR inhibitors ชนิดอื่นๆเพิ่มมากขึ้น เช่น erlotinib, dacomitinib, cetuximab, panitumumab เป็นต้น เพื่อให้สามารถขยายผลการศึกษาไปใช้ได้มากขึ้น
4. การศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งที่บริเวณอื่น อาจทำให้พบผลการวิจัยที่แตกต่างจากการวิจัยนี้ได้ และสามารถขยายผลการศึกษาไปใช้ได้มากขึ้น



บรรณานุกรม

1. Fredricks DN. Microbial ecology of human skin in health and disease. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001;6(3):167-9.
2. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(4):244-53.
3. Somboonna N, Wilantho A, Srisuttiyakorn C, Assawamakin A, Tongsimma S. Bacterial communities on facial skin of teenage and elderly Thai females. *Arch Microbiol.* 2017;199(7):1035-42.
4. Wilantho A, Deekaew P, Srisuttiyakorn C, Tongsimma S, Somboonna N. Diversity of bacterial communities on the facial skin of different age-group Thai males. *PeerJ.* 2017;5:e4084.
5. Zhai W, Huang Y, Zhang X, Fei W, Chang Y, Cheng S, et al. Profile of the skin microbiota in a healthy Chinese population. *J Dermatol.* 2018;45(11):1289-300.
6. Chang HW, Yan D, Singh R, Liu J, Lu X, Ucmak D, et al. Alteration of the cutaneous microbiome in psoriasis and potential role in Th17 polarization. *Microbiome.* 2018;6(1):154.
7. Williams MR, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2015;15(11):65.
8. Yamazaki Y, Nakamura Y, Nunez G. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergol Int.* 2017;66(4):539-44.
9. Park HY, Kim CR, Huh IS, Jung MY, Seo EY, Park JH, et al. Staphylococcus aureus Colonization in Acute and Chronic Skin Lesions of Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2013;25(4):410-6.
10. Prast-Nielsen S, Tobin AM, Adamzik K, Powles A, Hugerth L, Sweeney C, et al. Investigation of the Skin Microbiome: Swabs vs Biopsies. *Br J Dermatol.* 2019.
11. Staudinger T, Pipal A, Redl B. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. *J Appl Microbiol.* 2011;110(6):1381-9.
12. Von Bultzingslowen I, Adlerberth I, Wold AE, Dahlen G, Jontell M. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(5):278-84.
13. Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Hamilton J, et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-

induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2009;234(4):430-41.

14. Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith GA, Bruley des Varannes S, Massart S, et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(5):515-28.
15. Zhu XX, Yang XJ, Chao YL, Zheng HM, Sheng HF, Liu HY, et al. The Potential Effect of Oral Microbiota in the Prediction of Mucositis During Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *EBioMedicine*. 2017;18:23-31.
16. Chien AL, Tsai J, Leung S, Mongodin EF, Nelson AM, Kang S, et al. Association of Systemic Antibiotic Treatment of Acne With Skin Microbiota Characteristics. *JAMA Dermatol*. 2019;155(4):425-34.
17. Yu JJ, Manus MB, Mueller O, Windsor SC, Horvath JE, Nunn CL. Antibacterial soap use impacts skin microbial communities in rural Madagascar. *PLoS One*. 2018;13(8):e0199899.
18. Bouslimani A, da Silva R, Kosciolk T, Janssen S, Callewaert C, Amir A, et al. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. *BMC Biol*. 2019;17(1):47.
19. Lee HJ, Jeong SE, Lee S, Kim S, Han H, Jeon CO. Effects of cosmetics on the skin microbiome of facial cheeks with different hydration levels. *Microbiologyopen*. 2018;7(2):e00557.
20. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):887-95.
21. Hata TR, Kotol P, Boguniewicz M, Taylor P, Paik A, Jackson M, et al. History of eczema herpeticum is associated with the inability to induce human beta-defensin (HBD)-2, HBD-3 and cathelicidin in the skin of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2010;163(3):659-61.
22. Miller LS, Sorensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, et al. TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J Immunol*. 2005;174(10):6137-43.
23. Clausen ML, Slotved HC, Krogfelt KA, Agner T. Tape Stripping Technique for Stratum Corneum Protein Analysis. *Sci Rep*. 2016;6:19918.
24. Clausen ML, Slotved HC, Krogfelt KA, Agner T. Measurements of AMPs in stratum corneum of atopic dermatitis and healthy skin-tape stripping technique. *Sci Rep*. 2018;8(1):1666.
25. Amitay-Laish I, David M, Stemmer SM. Staphylococcus coagulase-positive skin inflammation associated with epidermal growth factor receptor-targeted therapy: an early and a late

phase of papulopustular eruptions. *Oncologist*. 2010;15(9):1002-8.

26. Cho YT, Chen KL, Sheen YS, Yang CW, Liao JY, Cheng YP, et al. Purpuric Drug Eruptions Caused by Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors for Non-Small Cell Lung Cancer: A Clinicopathologic Study of 32 Cases. *JAMA Dermatol*. 2017;153(9):906-10.
27. Park K, Ommori R, Imoto K, Asada H. Epidermal growth factor receptor inhibitors selectively inhibit the expressions of human beta-defensins induced by *Staphylococcus epidermidis*. *J Dermatol Sci*. 2014;75(2):94-9.
28. Braden RL, Anadkat MJ. EGFR inhibitor-induced skin reactions: differentiating acneiform rash from superimposed bacterial infections. *Support Care Cancer*. 2016;24(9):3943-50.
29. Kwon S, Choi JY, Shin JW, Huh CH, Park KC, Du MH, et al. Changes in Lesional and Non-lesional Skin Microbiome During Treatment of Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(3):284-90.
30. Matsui K, Nishikawa A, Suto H, Tsuboi R, Ogawa H. Comparative study of *Staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis patients. *Microbiol Immunol*. 2000;44(11):945-7.
31. Kong HH, Andersson B, Clavel T, Common JE, Jackson SA, Olson ND, et al. Performing Skin Microbiome Research: A Method to the Madness. *J Invest Dermatol*. 2017;137(3):561-8.
32. Gerber DE. EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res*. 2008;69(6):359-72.
33. Eilers RE, Jr., Gandhi M, Patel JD, Mulcahy MF, Agulnik M, Hensing T, et al. Dermatologic infections in cancer patients treated with epidermal growth factor receptor inhibitor therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):47-53.
34. Nanney LB, Stoscheck CM, King LE, Jr., Underwood RA, Holbrook KA. Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin. *J Invest Dermatol*. 1990;94(6):742-8.
35. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995;376(6538):337-41.
36. Murillas R, Larcher F, Conti CJ, Santos M, Ullrich A, Jorcano JL. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice

- elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J.* 1995;14(21):5216-23.
37. Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(10):803-12.
38. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 1995;269(5221):230-4.
39. Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol.* 2000;10(7):505-10.
40. Jacot W, Bessis D, Jorda E, Ychou M, Fabbro M, Pujol JL, et al. Acneiform eruption induced by epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with solid tumours. *Br J Dermatol.* 2004;151(1):238-41.
41. Robert C, Soria JC, Spatz A, Le Cesne A, Malka D, Pautier P, et al. Cutaneous side-effects of kinase inhibitors and blocking antibodies. *Lancet Oncol.* 2005;6(7):491-500.
42. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, Feyereislova A, Mascaro JM, Herbst R, et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):110-24.
43. Lichtenberger BM, Gerber PA, Holcman M, Buhren BA, Amberg N, Smolle V, et al. Epidermal EGFR controls cutaneous host defense and prevents inflammation. *Sci Transl Med.* 2013;5(199):199ra11.
44. Davis KA, Stewart JJ, Crouch HK, Florez CE, Hospenthal DR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin Infect Dis.* 2004;39(6):776-82.
45. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(1):67-72.
46. Schroder JM, Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(4):469-86.
47. Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol.* 2011;131(10):1974-80.
48. Takahashi T, Gallo RL. The Critical and Multifunctional Roles of Antimicrobial Peptides in

Dermatology. *Dermatol Clin.* 2017;35(1):39-50.

49. Rademacher F, Dreyer S, Kopfnagel V, Glaser R, Werfel T, Harder J. The Antimicrobial and Immunomodulatory Function of RNase 7 in Skin. *Front Immunol.* 2019;10:2553.

50. Ryu S, Song PI, Seo CH, Cheong H, Park Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8753-72.

51. Simanski M, Dressel S, Glaser R, Harder J. RNase 7 protects healthy skin from *Staphylococcus aureus* colonization. *J Invest Dermatol.* 2010;130(12):2836-8.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทิวานันท์ พรหมวรานนท์
วัน เดือน ปี เกิด	30 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล
ที่อยู่ปัจจุบัน	374 ซอยพัฒนาการ 63 ถนนพัฒนาการ แขวงประเวศ เขตประเวศ กทม.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY