

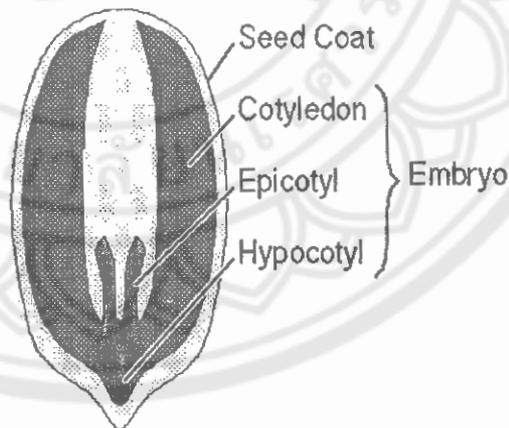
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมล็ด (seeds)

เมล็ด คือ ไซ่อ่อนซึ่งเจริญเต็มที่แล้วภายหลังจากการปฏิสนธิ เมล็ดประกอบด้วย 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนนอกสุดคือเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เป็นส่วนที่เปลี่ยนแปลงมาจากอินเทกิวเมนต์ของโอวูล ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันไม่ให้อ่อนภายในที่สำคัญของเมล็ดได้รับอันตราย [11], [12] ส่วนที่เหลืออีกสองส่วนคือส่วนของเนื้อในเมล็ดหรือ kernels ประกอบด้วย ต้นอ่อน (embryo) หรือคัพภะเป็นส่วนที่เจริญมาจากไซโกต เมื่อเมล็ดงอกจะเจริญไปเป็นลำต้น ใบ และราก และส่วนสุดท้ายของเมล็ดคืออาหารเลี้ยงต้นอ่อน (endosperm) เป็นส่วนที่เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดภายใน endosperm เป็นส่วนที่มีการสะสมสารอาหารต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และแป้ง ไว้ [13]

Dicot Seed Structure



ภาพ 1 ส่วนประกอบในเมล็ดของพืชใบเลี้ยงคู่

ที่มา: <http://www.sprutpeople.com/kids/seedpower.print.html>

องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดผลไม้แตกต่างกันไป พบว่าสารสกัดเมธานอลจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงมีองค์ประกอบหลัก คือ polyphenols สูงถึง 79.5% นอกจากนี้การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเนื้อในเมล็ดมะม่วงประกอบไปด้วย คาร์โบไฮเดรต 21.7% ไนโตรเจน 3.1% ไขมัน 0.5% และ Ash 1.6% [1] ส่วนเนื้อในเมล็ดมะขามประกอบด้วย polysaccharide สูงถึง 46.82-48.39% ที่เหลือคือโปรตีน albuminoid 15.49-16.95% oil 6.03-7.39% reducing sugar 2.80% crude fiber 2.43% Ash 2.45% calcium 0.1% และ phosphorus 0.2% [14], [15] จากการศึกษาของ โมตรี สุทธิจิตต์และคณะพบว่าเปลือกหุ้มเนื้อในของเมล็ดมะขาม (seed skin) มีปริมาณสาร phenolics สูงถึง 134 mg/g ซึ่งมากกว่าในเมล็ดมะขาม ที่มีปริมาณ 40.7 mg/g [16] ในขณะที่การศึกษาในประเทศสิงคโปร์พบว่าเมล็ดมะขาม มีปริมาณสาร phenolics 94.5 mg/g [10] ส่วนประกอบของเมล็ดลำไยมี polyphenols 6.3% [6] เมล็ดขนุนมีโปรตีนที่มีชื่อว่า jacalin [17] และในเมล็ดมะละกอ มีสารพวกคาร์โบไฮเดรต และไขมัน แล้วยังมีสาร glycoside คือ carposide benzylthiocyanate และ alkaloid คือ carpasemine อีกด้วย [5]

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดผลไม้

รายงานการศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอธานอลของเนื้อในเมล็ดมะม่วง เนื้อในเมล็ดมะขาม เมล็ดลำไย และเมล็ดขนุน ประกอบไปด้วยสารพวก phenolics ปริมาณมาก ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านยีสต์ เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรียได้ [10] สารสกัดเอธานอลและเอธานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 50 : 50 (v/v) ของเมล็ดลำไยมีสาร phenolics ที่มีองค์ประกอบหลักคือ gallic acid และ ellagic acid ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ต้านมะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส และต้านเนื้องอก [6], [18]

สารสกัดเอธานอลจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคที่มักปนเปื้อนมากับอาหาร 18 ชนิด 43 สายพันธุ์ โดยมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) อยู่ระหว่าง 50-2500 ppm และสารสกัดสามารถทนต่ออุณหภูมิ -20 ถึง 121 องศาเซลเซียส และทนความเป็นกรด-ด่างในช่วง pH 3-9 ได้ การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบสารสกัดนี้พบว่ามีสาร polyphenols เป็นองค์ประกอบหลัก และน่าจะเป็นส่วนที่ทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย [1] เมื่อปี 2545 กฤษณ์ บุญอริยเทพได้ศึกษาสารสกัดด้วยเอธานอลจากมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยพบสาร polyphenols จากเนื้อในเมล็ดมะม่วงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดจากส่วนของใบอ่อน ใบแก่ และเปลือกผลดิบ มีกลไก

ในการออกฤทธิ์เกิดจากการกำจัดอนุมูลอิสระไม่ได้เกิดจากการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และเมื่อศึกษาถึงกลุ่มของสาร phenolics ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ พบสาร 2 กลุ่มที่มีฤทธิ์ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอยด์ และกลุ่มแทนนินที่มีรสฝาด ดังนั้นเมล็ดมะม่วงจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อเตรียมสาร ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ทางอาหารเสริมและยาได้ในอนาคต [19] และจากการศึกษาสารฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในเมล็ดมะม่วง (ไม่ได้ระบุขนาดที่ให้) พบว่ามีผลช่วยลดปริมาณ cholesterol ในหนูที่ป่วยเป็นโรค dyslipidemia เช่นเดียวกับหนูที่ป่วยเป็นโรค hypercholesterolemic ที่มีการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase ลดลง โดยฟลาโวนอยด์จากสารสกัดดังกล่าวช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด รวมทั้งช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระ lipid peroxide ด้วย [20], [21]

สารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดโดยสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูทดลองเพศผู้ได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากให้สารสกัดเป็นระยะเวลา 7 วัน [22] ในปี พ.ศ. 2545 โมตรีและคณะได้ทำการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทย 155 ชนิด พบว่ามีสมุนไพรจำนวน 13 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง รวมทั้งสารสกัดเมล็ดและเปลือกของมะขาม ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจากสารกลุ่ม polyphenols [16] และจากการประเมินความเป็นพิษของ polysaccharide ที่สกัดได้จากเนื้อในเมล็ดมะขาม โดยใช้หนูแรทเพศผู้และเพศเมียเป็นสัตว์ทดลอง โดยให้หนูกินสารสกัดเมธานอลจากเนื้อในเมล็ดมะขามขนาด 4, 8 และ 12 % เป็น เวลา 2 ปี พบว่าพฤติกรรมของหนูไม่เปลี่ยนแปลง รวมทั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว น้ำหนักของอวัยวะต่างๆ การเผาผลาญอาหาร ส่วนประกอบของเลือดและปัสสาวะ [14]

สารสกัดด้วยเมธานอลจากส่วนของลำต้น เปลือก ราก แก่นของราก ใบ ผล และเมล็ดของขนุนโดยเฉพาะสารสกัดจากเปลือก ราก และผล มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่ไม่มีสารสกัดจากส่วนใดเลยมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา [23] และยังพบว่าในเมล็ดขนุนมีโปรตีนที่มีชื่อว่า jacalin ซึ่งมีไนโตรเจนปริมาณสูง และมีผลในการกระตุ้น CD4⁺ T lymphocytes ของมนุษย์ จึงนำมาศึกษาในผู้ป่วยโรคติดเชื้อโดยเฉพาะโรคเอดส์ [17]

สารสกัดเมธานอลและเอทิลอะซิเตทจากเมล็ดมะละกอมีผลในการคุมกำเนิดโดยปราศจากผลข้างเคียงในหนูทดลอง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) โดยไม่มีความเป็นพิษเกิดขึ้น แต่จากการศึกษาผลในการคุมกำเนิด พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะละกอนี้เป็นพิษโดยตรงต่อเนื้อเยื่อของมดลูกในหนูทดลอง [24] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดแก่ของมะละกอมีคุณสมบัติต้านเชื้ออหิวา [25]

ในการรักษา [32] หลายประเทศให้ความสำคัญกับนโยบายด้านสาธารณสุขเป็นอันดับต้นๆ ส่วนหนึ่งของนโยบายด้านสาธารณสุขของประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องเกณฑ์มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ประการหนึ่งของอาหารควบคุมและอาหารที่กำหนด ต้องไม่มีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค 4 ชนิดคือ *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* [33]

B. cereus และ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งขนาดใหญ่ ดิดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ภายในเซลล์หรือที่เรียกว่า endospore และสปอร์ของเชื้อความทนทานต่อความร้อนและสารเคมีและสามารถจะกระจายลงไปในอาหารหรือ ปนไปกับฝุ่นละออง ในอากาศ ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไปได้ [35] ทั้ง *B. cereus* และ *B. subtilis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส โดยที่ *B. cereus* มักปนเปื้อนลงในอาหารที่ปรุงสุกแล้วและเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ทำให้มีการเจริญของเชื้อและผลิตสารพิษออกมาปนเปื้อนในอาหาร [36] *B. cereus* ทำให้เกิดอาการเป็นพิษได้บ่อย อาการทางคลินิกและกลไกการก่อโรคที่เกิดจากสายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin ซึ่งมี 2 ชนิดด้วยกันคือ [37] ชนิดแรก emetic toxin เป็นสารพิษที่ทนความร้อนทำให้เกิดอาการหลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไปเพียง 1-6 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้อาเจียน ท้องเสียเล็กน้อย *B. cereus* ชนิดที่สร้างสารพิษทำให้อาเจียนนี้ตามปกติมักพบในอาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าว และบ่อยครั้งที่มีรายงานการระบาดที่เกิดจากข้าวผัดที่เหลือบริโภคแล้วนำกลับบ้านมาอุ่นที่อุณหภูมิไม่สูงและไม่นานพอจึงเป็นการกระตุ้นให้สปอร์แบคทีเรียงอกและเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นจนผลิตสารพิษออกมาและเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษเรียกว่าโรคจากภัตตาคารจีน (Chinese restaurant syndrome) [38] ชนิดที่สอง diarrheal toxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อนทำให้เกิดอาการได้ช้ากว่าชนิดแรกคือประมาณ 10-12 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มีพิษของเชื้อเข้าไป อาการจะเริ่มด้วยปวดท้องรุนแรง อาเจียน ท้องร่วงมากสารพิษนี้จะไปกระตุ้นให้มีการเพิ่ม cyclic AMP [37] คล้าย cholera toxin มีผลทำให้เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารมีการหลั่งสารน้ำและเกลือแร่ออกสู่ทางเดินอาหาร ผู้ป่วยจึงมีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำจำนวนมาก อาการทั้ง 2 น่าจะชนิดหายได้เองใน 24 ชั่วโมง เมื่อสารพิษนั้นๆ หมดฤทธิ์ไป [36] มีรายงานการระบาดของ *B. cereus* ในปี ค.ศ. 1969 และ ค.ศ. 1971 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอังกฤษตามลำดับ [37] รายงานการระบาดของโรคไม่ค่อยพบหรือไม่ได้มีการวินิจฉัยเนื่องจาก *B. cereus* ชนิดที่ทำให้ท้องร่วงมีอาการที่เหมือนกับการได้รับพิษจากเชื้อ *S. aureus* หรืออาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *C. perfringens* [36] การที่เชื้อ *B. cereus* สามารถสร้างเอนไซม์ β - lactamase ทำให้เชื้อมักดื้อต่อยากลุ่ม penicillins และ cephalosporins จึงควรรักษาด้วย

vancomycin หรือ clindamycin *B. cereus* เป็นเชื้อที่ดื้อยาได้ทั่วไป การรักษานิยมใช้ clindamycin ควบคู่ไปกับ gentamicin [38] ส่วน *B. subtilis* เป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสที่สำคัญ ในการติดเชื้อที่ระบบต่างๆ สามารถก่อโรคปอดบวมชนิดรุนแรง การติดเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัด และโรคท้องร่วง [39] มีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับ *Bacillus* spp. ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในปี ค.ศ. 1906 ที่สถานพักฟื้นแห่งหนึ่งทำให้ผู้อยู่อาศัยและเจ้าหน้าที่ 300 คนเจ็บป่วยจากอาการปวดท้องและอาเจียน [38]

E.coli เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่หรือไม่เคลื่อนที่ได้ บางสายพันธุ์สร้างแคปซูลได้ เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น [40] *E.coli* สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ในน้ำได้หลายสัปดาห์ อยู่ตามเสื้อผ้าแห้ง และฝุ่นละอองได้หลายวัน แต่ถูกทำลายเมื่อต้มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที [41] ก่อนปี ค.ศ. 1982 ไม่ถือว่า *E.coli* เป็นแบคทีเรียที่มีอันตรายและสามารถถูกยับยั้งได้ ในทางเดินอาหารของคน แต่ภายหลังพบว่า *E.coli* ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดอาการท้องเดิน ของเด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาและยังได้เกิดการระบาดอย่างรุนแรง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษา กลไกการเกิดโรคกันอย่างกว้างขวาง โรคที่เกิดจากเชื้อ *E.coli* ที่สำคัญคือ โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ การติดเชื้อในกระแสเลือด และเป็นหนึ่งในเชื้อก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อยที่สุด [42] อาการของโรคโดยทั่วไปคือ มีไข้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย และอาจขาดน้ำอย่างรุนแรงถึงช็อกได้ [43] นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เป็นต้นมา *E.coli* ได้รับการจัดไว้ในประเภทจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และสามารถจำแนก *E.coli* ตามกลไกการก่อโรคและลักษณะอาการเป็น 5 กลุ่ม คือ [44] กลุ่มแรก Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) มีกลไกการก่อโรคเริ่มจากการสร้างสารที่ช่วยในการยึดเกาะ เช่น colonization factor antigen (CFA) เพื่อเกาะติดกับเซลล์เป้าหมาย [45] สาร CFA เป็นปัจจัยหลักในการเกาะติดกับโมเลกุลของ glycoprotein ที่เป็นหน่วยรับบนผิวเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้เล็ก หลังจากการเกาะติดเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษ enterotoxin 2 ชนิด คือ ชนิดที่ทนความร้อน และชนิดที่ไม่ทนความร้อน [46] การบริโภคอาหารที่มีเชื้อประมาณ 10^6 - 10^{10} cfu/g เข้าไปแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนในลำไส้เล็กพร้อมกับขับสารพิษออกมาทำให้เกิดอาการท้องร่วง ถ้าสารพิษเป็นชนิดไม่ทนความร้อนจะกระตุ้นให้ขับสาร adenylyl cyclase จากผนังลำไส้ ซึ่ง เป็นผลให้มีสาร cAMP เพิ่มขึ้นทำให้มีช่องเหลวหลังออกมามากในทางเดินอาหาร [47] ส่วนสารพิษชนิดที่ทนความร้อนจะกระตุ้นให้มีการหลั่ง cyclic guanosine monophosphate (cGMP) เพิ่มขึ้นในเยื่อเมือก ทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวและอิเล็กโทรไลต์ของร่างกายเช่นกัน ETEC เป็นสาเหตุสำคัญ

ของโรคท้องร่วงโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนาพบได้บ่อยในเด็กและนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปพื้นที่ที่มีการระบาด [48] กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) แบคทีเรียทำให้เกิดโรคโดยกลไกการเกาะติดเฉพาะที่กับเซลล์ของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า attachment-and-effacement [44] เป็นผลให้เกิดการรวมตัวกับเยื่อเมือกในลำไส้ จากนั้นแบคทีเรียจะเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในเยื่อเมือกลำไส้ แล้วขับโปรตีนออกมายับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาว มักทำให้เกิดอาการท้องร่วงกับทารกอายุต่ำกว่าหนึ่งขวบโดยเฉพาะในสถานรับเลี้ยงเด็ก และในประเทศกำลังพัฒนา [49] กลุ่มที่ 3 คือ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ทำลายเซลล์ของโฮสต์ในระบบทางเดินอาหาร มักพบในลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียจะเจาะเข้าไปทางเซลล์ชั้นนอก (epithelial cells) แล้วกระจายไปยังเซลล์ใกล้เคียง ทำให้เกิดโรคท้องร่วงทั้งแบบที่ถ่ายมีเลือดปนและไม่มีเลือดปน เป็น *E. coli* สายพันธุ์แรกที่พบว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดขึ้นในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1947 กับนักเรียนที่บริโภคปลาซัลมอน [38] กลุ่มที่ 4 คือ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) แบคทีเรียสร้างสารพิษ enterotoxin ชนิดที่ทนความร้อน 2 แบบ ที่มีโครงสร้างเป็น A-B toxin ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเอ 1 หน่วย และหน่วยย่อยบี 5 หน่วย หน่วยย่อยบีจับกับหน่วยรับ คือ globotriaosylceramide บนผิวเซลล์เยื่อของทางเดินอาหารหรือไต ส่วนหน่วยย่อยเอเมื่อถูกเข้าสู่เซลล์จะเข้าจับตัวกับ 28S rRNA บนไรโบโซมและยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์ทำให้เซลล์ตายเกิดเป็นแผลที่ผนังลำไส้และมีเลือดออกปนในอุจจาระ ตัวอย่าง *E. coli* ในกลุ่มนี้ คือ *E. coli* O157:H7 [38] และกลุ่มสุดท้าย Enteraggregative *E. coli* (EAEC) เป็นสายพันธุ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่ยังไม่ปรากฏความรุนแรงและกลไกก่อโรคยังไม่ชัดเจน ลักษณะเด่นของการเกิดโรคคือพบเชื้อเกาะรวมกลุ่มกันคล้ายกองอิฐอยู่บนเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้เล็ก [50] ยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจาก *E. coli* ได้แก่ กลุ่ม β -lactamase, fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracycline, และ sulfonamides [51] แต่ในปัจจุบันเชื้อ *E. coli* มีอัตราการดื้อยาสูงอย่างรวดเร็วและพบการดื้อยาต่อหลายกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อที่พบก่อโรคในโรงพยาบาล ซึ่งการดื้อของเชื้อต่อยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporins โดยสร้างเอนไซม์ extended-spectrum β -lactamase (ESBL) นี้พบเพิ่มสูงมากขึ้นและเป็นปัญหาในการรักษา [52]

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งสั้นๆ ขนาดเล็ก ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่พบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรืออาจเรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์แต่เคลื่อนที่ได้ บางครั้งจะเห็นแบคทีเรียปรากฏขึ้นมีลักษณะคล้ายเป็นอักษรจีน [40], [38] เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในสัตว์ แต่สามารถพบการก่อโรคในคนได้ [52], [53] *L. monocytogenes* จัดเป็นเชื้อขวยโอกาส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสได้ ทำให้เกิดปัญหากับอาหารที่เก็บในตู้เย็น

หรือพวกอาหารแช่แข็ง [54], [55] การเกิดพิษของ *L. monocytogenes* เกิดเมื่อแบคทีเรียผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารจะเข้าไปเกาะกับเซลล์ของลำไส้พร้อมกับขับสารบางชนิดที่เป็นโปรตีนบางชนิดที่มีคุณสมบัติป้องกันตนเองจากการทำลายของเม็ดเลือดขาว โดยอาศัยกลไกการช่วยเหลือของสารพิษ คือ เบตา-เฮโมไลซิน (beta-haemolysin) ที่เรียกว่า ลิสเตอริโอไลซินโอ ทำให้แบคทีเรียเข้ามาอยู่ในแวกคิวโอล และการที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนต้องออกจากแวกคิวโอลเข้าไปในส่วนอื่นๆ ของเซลล์ และสามารถเคลื่อนที่จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้พร้อมกับทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ผ่านเข้าไป [38] การก่อโรคของเชื้อ *L. monocytogenes* มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อของระบบประสาทส่วนกลางทำให้เกิดโรคที่สำคัญคือโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด [56] การเกิดโรคที่รุนแรงมักเกิดกับทารกโดยผ่านทางเลือดเชื้อบุกกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อตัวอ่อนในครรภ์ทำให้แท้งได้ [38] ถึงแม้การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *L. monocytogenes* พบได้ไม่บ่อยเมื่อเทียบกับเชื้ออื่นๆ แต่ก็ทำให้เกิดโรครุนแรงและมีอัตราการตายที่สูงคือประมาณ 20%-30% บางรายงานพบสูงถึง 70 % โดยเฉพาะหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องจึงทำให้เชื้อนี้ได้รับความสนใจกันมาก [57] ในปี ค.ศ. 1929 มีรายงานการระบาดครั้งแรกในคน จากนั้นเชื้อนี้ได้แพร่กระจายไปทั่วโลกโดยร้อยละ 98 ทำให้เกิดโรคในคน นับตั้งแต่ทศวรรษที่ 1990 ได้มีคำเตือนให้ระวังเกี่ยวกับโรคลิสเตอริโอซิสมากขึ้น รายงานพบว่ามีคนตายถึง 29 % หลังจากกินนมพาสเจอร์ไรซ์ นอกจากนี้ยังมีคนตายถึง 90 คน จากการกินเนยแข็งที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* [36] ยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้รักษาโรคมียหลายชนิดคือ ampicillin โดยอาจใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น gentamicin ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้หรือแพ้ยาในกลุ่ม penicillins อาจเลือกใช้ยา trimethoprim/sulfamethoxazole แทนได้ และยาอื่นๆ ที่ใช้ได้ผลคือ imipenem, vancomycin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol และ rifampin [58], [59]

Salmonella Typhi เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล *S. Typhi* มีแอนติเจน O, H และ Vi ที่ผิวเซลล์ช่วยในการยึดเกาะกับโฮสต์ได้ดีขึ้น [38] การติดเชื้อ *S. Typhi* จะต้องได้เชื้อเข้าไปประมาณ 10^3 เซลล์ หลังได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายทางการกิน เชื้อจะบุกกรุกชั้นผนังลำไส้และถูกกินโดยเซลล์ macrophage ซึ่งจะนำเชื้อผ่านทางเดินน้ำเหลืองเข้าสู่กระแสเลือดไปยังตับ ม้าม และไขกระดูก [60], [61] ระยะเวลาจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ต่อมาประมาณ 2 สัปดาห์ ผู้ป่วยจะมีไข้ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ และตับม้ามโต เป็นระยะที่เชื้อกระจายเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะต่างๆ เมื่อเชื้อกลับสู่ทางเดินอาหารอีกครั้งจะทำให้เกิดการอักเสบและเน่าตายของเนื้อเยื่อผนังลำไส้เกิดเป็นแผล

จึงเริ่มมีอาการผิดปกติในทางเดินอาหารเช่นปวดท้อง และถ่ายเหลว [62] *S. Typhi* เป็นเชื้อทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่พบได้มากที่สุดก่อโรคเฉพาะในคนเท่านั้น และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ [61] นอกจากนี้ เชื้อยังมีความสามารถในการอาศัยอยู่ภายในเซลล์แบบปรสิติกภายใน ทำให้เชื้อรอดพ้นจากการถูกทำลาย และเป็นปัญหาทำให้โรคไม่หาย *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารอาจแพร่ไปกับอาหารข้ามทวีปได้ และเป็นสาเหตุการระบาดของสูงเป็นอันดับ 1 ในสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และในอีกหลายประเทศ [38] ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2544 รายงานการศึกษาของอรุณ ปางตระกูลนนท์และคณะพบผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* spp. เฉลี่ย 8.88 % ในอุจจาระพนักงานในโรงงานผลิตอาหารแช่แข็ง จำนวน 9,465 ตัวอย่าง และปรากฏว่าอัตราของผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* spp. สูงสุดในหน้าร้อนและต่ำสุดในหน้าฝน [63] การรักษาผู้ป่วยโรคทางเดินอาหารอักเสบที่มีอาการไม่รุนแรงนั้นควรรักษาแบบประคับประคองโดยการให้สารน้ำและเกลือแร่ ไม่จำเป็นต้องให้ยาต้านแบคทีเรียเพราะนอกจากไม่ช่วยลดระยะเวลาการดำเนินโรคและไม่ลดปริมาณเชื้อแล้วยังอาจมีผลให้อัตราการเกิดโรคซ้ำเพิ่มสูงขึ้น ในผู้ป่วยโรคไข้ไทฟอยด์หรือรายที่ติดเชื้อรุนแรงเดิมให้ผลดีกับการรักษาด้วย chloramphenicol แต่พบว่ายานี้กระตุ้นให้เชื้อมีอัตราการดื้อยาสูงมากขึ้นพบอัตราการเกิดโรคซ้ำสูง และยังเป็นพิษต่อไขกระดูก [61] ในปัจจุบันยาหลักที่ใช้สำหรับการรักษาไข้ไทฟอยด์คือกลุ่ม quinolones และ extended-spectrum cephalosporins เช่น ceftriaxone [40] พบว่าเชื้อ *S. Typhi* มีอัตราดื้อยาเพิ่มสูงมากเชื้อสามารถดื้อต่อยาหลายชนิดซึ่งถูกควบคุมโดยกลุ่มของยีนบนพลาสมิด การใช้ยาต้านเชื้อแบคทีเรียอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นปัจจัยกระตุ้นสำคัญที่ทำให้เชื้อสายพันธุ์ดื้อยามีการกระจายได้อย่างรวดเร็ว [64], [65]

Serratia marcescens เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุ prodigiosin ซึ่งมีสีแดงขึ้น ดังนั้นเมื่อเจริญเติบโตบนอาหารจะทำให้บริเวณผิวของอาหารมีสีแดง [36] ไม่ค่อยพบว่าอยู่ในทางเดินอาหาร แต่มักอาศัยอยู่ในทางเดินปัสสาวะและทางเดินหายใจ โดยเฉพาะผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่เป็นเด็กแรกเกิด และผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน [66] *S. marcescens* พบก่อโรคในคนบ่อยที่สุดของจีนัสนี้ โดยมักพบก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาส และพบว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล [50] สามารถก่อโรคได้หลายระบบได้แก่ โรคปอดบวม โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อของผิวหนังหรือบาดแผล แผลผ่าตัด และการติดเชื้อในกระแสเลือด [67], [36] มีรายงานการระบาดของผู้ป่วยติดเชื้อ *S. marcescens* จากการใช้น้ำยาล้างมือในมหาวิทยาลัยไอโอวาประเทศญี่ปุ่น จากจำนวน 2.7 ราย ต่อผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล

1,000 ราย ในปี ค.ศ. 1992 เพิ่มเป็น 8.6 รายต่อผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 1,000 ราย ในปีเดียวกัน [63] *S. marcescens* คือยาต้านเชื้อแบคทีเรียในอัตราสูง [68] รวมถึงยาในกลุ่ม penicillins ยาที่สามารถเลือกใช้ได้เช่นยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides และ fluoroquinolones [40]

Shigella sonnei เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีแคปซูล เป็นสาเหตุสำคัญของโรคบิด (bacillary dysentery) มาตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 แต่ทำให้เกิดโรคบิดกับคนและสัตว์ชั้นสูงที่เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น [54], [36], [38] *S. sonnei* มีความสามารถในการติดเชื้อสูงมากเชื้อประมาณ 200-1000 เซลล์ก็ทำให้ติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม *shigella* spp. เป็นแบคทีเรียที่อ่อนแอ ไม่ทนความร้อน ความแห้งแล้ง ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส ทำลายเชื้อได้ภายในเวลา 2-3 วินาที [69] เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะเข้าไปเจริญเติบโตที่ลำไส้ใหญ่ เชื้อนี้ endotoxin ทำให้เกิดอาการไข้ และสร้าง enterotoxin ทำลายเซลล์เยื่อเมือก ในลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดแผลอักเสบมีเลือดออก อาเจียน ปวดท้อง ปวดเบ่งเวลาถ่ายอุจจาระเนื่องจากการเกร็งของลำไส้ตรง อุจจาระมีมูกเลือด ปกติเชื้อไม่บุกรุกเข้ากระแสเลือด นอกจากแผลอักเสบรุนแรงจึงทำให้พบเชื้อในเลือดชั่วคราว [36] พบว่าโรคที่เกิดจากเชื้อ *Shigella* spp. มีความรุนแรงในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่โดยประมาณ 2 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมดและส่วนใหญ่ของผู้เสียชีวิตเป็นเด็กอายุต่ำกว่า 10 ปี และพบว่ามีอัตราการติดเชื้อซ้ำในชุมชนค่อนข้างสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ การระบาดของโรคเกิดขึ้นได้บ่อยในประเทศที่มีอากาศร้อน ในแหล่งที่เป็นชุมชนแออัดและประชาชนมีสุขอนามัยส่วนบุคคลไม่ดี [70] มีรายงานการระบาดของเชื้อ *S. sonnei* ที่ประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1989 และ ค.ศ. 1991 พบจำนวนผู้ป่วย 2,316 คน และ 9,830 คน ตามลำดับ และในปี ค.ศ. 1992 ได้เกิดการระบาดขึ้นในเมืองแคมบริดจ์เชียร์ในประเทศอังกฤษ พบผู้ป่วยมีอาการท้องเดิน 107 คน จากทั้งหมด 200 คนที่มาในงานเลี้ยงแบบบุฟเฟต์ [38] ในปัจจุบันเชื้อ *Shigella* spp. มีอัตราการดื้อยาต้านเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างสูง และการรักษาด้วยยาต้านแบคทีเรียมักกระตุ้นให้เชื้อเกิดการดื้อยาได้ง่าย [71] ยาต้านแบคทีเรีย เพื่อช่วยลดการแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น ลดระยะเวลาการดำเนินโรคและลดอัตราการ กลายเป็นพาหะของเชื้อจากการเกิดโรคได้แก่กลุ่ม fluoroquinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole, ampicillin, chloramphenicol, tetracyclines และ azithromycin [40]

แบคทีเรียดื้อยา

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขอีกปัญหาหนึ่ง ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด และบางชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะทุกชนิด (panresistance) [72] และเนื่องจากความสามารถในการดื้อต่อยานั้นสามารถถ่ายทอดให้แก่กันได้ [73] จึงพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่ดื้อยาเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ซึ่งการติดเชื้อในกลุ่มนี้มักมีอัตราการตายสูง [48] แบคทีเรียดื้อยากลุ่มที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขในปัจจุบันคือ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* และ *Acinetobacter* spp. [48], [72]

จากรายงานของ National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) พบว่าอัตราการดื้อยาต่อยาเมธิซิลลินของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยหนัก (ICU) ของโรงพยาบาลในสหรัฐอเมริกา เพิ่มขึ้นจากประมาณ 51 % ในปี พ.ศ. 2545 เป็น 59.5 % ในปี พ.ศ. 2546 [74] เช่นเดียวกับบางประเทศในยุโรป ได้แก่ อังกฤษและไอร์แลนด์ พบ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่แยกได้จากผู้ป่วยมากกว่า 40 % [75] นอกจากนี้มีข้อมูลการศึกษาจากเครือข่ายอาเซียนในการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยา 11 ประเทศ (ANSORP) บ่งชี้ว่าปัญหาเชื้อดื้อยามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีโอกาสที่จะเกิดการแพร่ระบาดระหว่างประเทศในกลุ่มอาเซียน [76] สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อ MRSA ครั้งแรกเมื่อปีพ.ศ. 2503 และในปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *S. aureus* ในโรงพยาบาลส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่ม MRSA [77] จากผลการศึกษาและเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าเชื้อโรคหลายชนิดมีอัตราการดื้อยาสูงมากถึง 50% เช่น ในปี 2541 พบว่าเชื้อ MRSA อยู่จำนวน 24 % และในปีพ.ศ. 2546 ได้เพิ่มสูงถึง 32 % นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2541 ยังพบเชื้อ *S. pneumoniae* ที่แยกได้ในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบดื้อยา penicillin 46 % ได้เพิ่มขึ้นเป็น 63 % ในปี พ.ศ. 2546 ในปี พ.ศ. 2541 พบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ดื้อยา imipenem 2 % ในปี พ.ศ. 2546 และได้เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 3 % และการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี [78] ปัญหาการดื้อยาทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและอัตราการตายสูงขึ้น

ทั้งนี้กลไกที่แบคทีเรียใช้ในการดื้อยามีอยู่หลายกลไก กลไกหนึ่งๆสามารถใช้ในการดื้อยาหลายชนิดหรือแบคทีเรียชนิดหนึ่งสามารถดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียได้หลายกลุ่มด้วยกลไกที่เหมือนหรือแตกต่างกันมีดังนี้ [79]

1. ผลิตสารหรือเอนไซม์ออกมาทำลายยา (antimicrobial detoxification) เช่น แบคทีเรียบางชนิดผลิต β - lactamase ออกมาทำลาย penicillin และ cephalosporin ได้เป็น penicilloyl และ cephalosporyl ตามลำดับ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอีกต่อไป และแบคทีเรียบางชนิดโดยเฉพาะในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ยังสามารถสร้างเอนไซม์ extended-spectrum β - lactamase (ESBL) ที่สามารถไปทำลายยาในกลุ่ม extended-spectrum cephalosporin และ monobactams ได้ด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีการสร้างเอนไซม์อื่นๆ เช่น chloramphenicol acetyltransferase ออกมาทำลายยา chloramphenicol ได้เช่นกัน

2. เปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาในเชื้อ (target alteration) เพื่อลดหรือขัดขวางการเข้าจับของยากับเป้าหมาย เช่น การดื้อต่อ streptomycin โดยเปลี่ยนแปลงลักษณะของ ribosome ที่ยังคงทำหน้าที่ผลิตโปรตีนได้แต่ยาเข้าจับไม่ได้ หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ penicillin-binding protein (PBP) ในเชื้อ MRSA โดยสร้าง PBP2a ที่ไม่ตอบสนองต่อ β - lactam antibiotics ขึ้นแทนที่ PBP2a

3. การเพิ่มจำนวนของเป้าหมาย (overproduction of targets) แม้ยาจะเข้าจับกับเป้าหมายไปแล้วก็ยังมีสารเป้าหมายเหลือพอที่จะทำหน้าที่ในกระบวนการต่างๆ เช่น การเพิ่มจำนวน dihydrofolate reductase ซึ่งเป็นเป้าหมายของ trimethoprim เป็นต้น

4. ลด permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ (decrease uptake) ทำให้จำนวนยาที่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้น้อยลง เช่น ในแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* และ *P. aeruginosa* มีการลดจำนวนของ porin ซึ่งเป็นโปรตีนอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก โปรตีนนี้มีการจัดเรียงตัวลักษณะเป็นช่องที่ใส่ขนส่งสารโมเลกุลใหญ่ที่ละลายน้ำได้เข้าสู่เซลล์ การลดจำนวน porin ลง ซึ่งทำให้ยาด้านจุลชีพบางชนิดเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง ทำให้เชื้อทั้งสองนี้ดื้อต่อยากลุ่ม β - lactam และ quinolones เป็นต้น

5. เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ให้ข้ามขั้นตอนที่ต้องใช้เป้าหมายของยาไป (Absence of enzyme-metabolism pathway) ถึงแม้ยาจะเข้าจับกับเป้าหมายได้ แต่ก็ไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการนั้น เช่นการดื้อต่อ vancomycin ของเชื้อ *Lactobacilli* และ *Lactococcus* โดยจะไม่สร้าง D-alanyl-D-alanine ขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์ผนังเซลล์ แต่จะเปลี่ยนเป็นสร้าง D-alanyl-D-lactate ขึ้นแทนทำให้ยา vancomycin ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์โดยเข้าจับกับ D-alanyl-D-alanine ออกฤทธิ์ไม่ได้

6. การขนส่งยาออกนอกเซลล์ (active efflux) โดยการสร้างกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ขับยาออกนอกเซลล์ และมีผลให้เกิดการดื้อยาหลายชนิด จึงเรียกโครงสร้างโปรตีนนี้ว่า multidrug resistance pump (MDR pump) แบคทีเรียบางชนิด เช่น *E.coli* และ *P. aeruginosa* จะมีระบบ MDR pump ขนส่งโปรตอนเข้าสู่เซลล์ โดยแลกกับการขนส่งสารแปลกปลอมออกนอกเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่อยู่ในระดับที่จะมีผลต่อเชื้อได้ เช่น การดื้อต่อยากลุ่ม tetracyclines และ quinolones เป็นต้น

Acinetobacter spp. เป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งสั้นขนาดเล็กคล้ายรูปกลม ติดสีแกรมลบ สามารถพบเชื้อมีชีวิตในสภาพแห้งได้นับเดือน [80] ปัจจุบัน *Acinetobacter* มี 19 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคนมากที่สุดถึง 80 % คือ *Acinetobacter baumannii* ปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อยังไม่ทราบชัดเจน ไม่พบการสร้างสารพิษที่มีบทบาทในการก่อโรค แคปซูลอาจมีส่วนช่วยด้านการถูกจับกินโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว [81] *Acinetobacter* spp. มักฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ที่มีความต้านทานต่ำ ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่ต้องใส่เครื่องช่วยหายใจ สายสวนปัสสาวะ ในโรงพยาบาล แดงยุโรปพบเชื้อ *Acinetobacter* spp. ที่มักทำให้เกิดโรคการติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) อย่างไรก็ดีตามถึงแม้ว่าจะสามารถก่อโรคได้หลายระบบในร่างกายแต่เชื้อมีความรุนแรงต่ำ [36] *Acinetobacter* spp. ยังคงเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีอัตราการตายสูง ซึ่งสร้างปัญหาในการรักษาโรคอย่างมากเนื่องจากในปัจจุบันและมีแนวโน้มในอนาคตว่าเชื้อนี้ดื้อยาหลายชนิด [80], [82] รายงานการศึกษาจากโรงพยาบาลทุกภูมิภาคของประเทศไทยในปี พ. ศ. 2543 พบว่า *Acinetobacter* spp. ดื้อต่อยา ceftazidime 63 % amikacin 58 % imipenem 15 % ปัจจุบันยาด้านแบคทีเรียที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Acinetobacter* spp. ได้แก่ ยาในกลุ่ม carbapenems, fluoroquinolones, ampicillin/sulbactam และ colistin [78]

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่นอาจพบอยู่เดี่ยวๆหรืออยู่เป็นคู่ [38] สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4-50 องศาเซลเซียส และทนต่อความร้อนสูงถึง 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทนต่ออุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานหลายเดือน [83] *S. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบริเวณผิวหนังและภายในโพรงจมูกของบุคคลทั่วไป บางครั้งเชื้อมักก่อให้เกิดโรคและพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังได้บ่อยที่สุดในบรรดาเชื้อก่อโรคทั้งหลาย การติดเชื้อส่วนใหญ่ถือว่าไม่รุนแรง เช่น อาจเกิดเป็นลักษณะของหนองฝีติดเชื้อ และส่วนใหญ่หายเองได้โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะ [36] อย่างไรก็ดีตามเชื้อ *S. aureus* อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงได้ เช่น การติดเชื้อที่แผลผ่าตัด หรือปอดอักเสบ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคโดยการบุกรุกและแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกายและมี

ความสามารถในการสร้าง enterotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหารเป็นผลให้เกิดอาการท้องเสียและเอนไซม์ต่างๆที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นจึงทำให้เกิดโรคได้เกือบทุกอวัยวะ [73], [38] ในเชื้อ staphylococci ทั้งหมด *S. aureus* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษบ่อยที่สุด อาหารมักถูกปนเปื้อนเชื้อโดยผู้ประกอบอาหารที่มีเชื้ออยู่ในมือและอาหารนั้นมักเก็บไว้ในตู้เย็นที่ไม่เย็นพอ จึงทำให้เชื้อเจริญเติบโตและสร้างพิษขึ้นได้ หากมีการปนเปื้อน *S. aureus* ในอาหารสำเร็จที่จำหน่ายตามท้องตลาดอาจมีผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก พบรายงานการศึกษาเชื้อ *S. aureus* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1894 และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *S. aureus* อย่างต่อเนื่อง [38] เท่าที่ผ่านมาแพทยรักษาภาวะติดเชื้อ

S. aureus ชนิดรุนแรงด้วยยาในกลุ่ม penicillin แต่ปรากฏว่าในระยะหลัง พบเชื้อ *S. aureus* ดื้อยามากขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเนื่องจากการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมจึงทำให้เชื้อดื้อยาเพิ่มขึ้น ซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ [84] จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1961 พบเชื้อดื้อยา methicillin และเรียกว่าเชื้อกลุ่มนี้ว่า Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA เชื้อ MRSA สามารถสร้าง virulence factor และก่อโรคได้เช่นเดียวกับกับเชื้อ *S. aureus* ที่ไวต่อยา methicillin (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*) หรือ MSSA ความรุนแรงของเชื้อ MRSA และ MSSA ไม่ต่างกัน แต่การติดเชื้อ MRSA มีความสำคัญมากกว่าเพราะไม่สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อ staphylococci [63] เชื้อ MRSA ดื้อต่อยา methicillin โดยการสร้าง PBP ที่ผิดปกติคือ PBP2a ที่กำกับโดยยีน *mecA* PBP2a มี affinity ลดลงต่อ methicillin และยาอื่นๆในกลุ่มเบต้าแลคแทม การสร้าง PBP2a ของเชื้อที่ดื้อยาดังกลไกแบบนี้เป็น true MRSA มีการดื้อต่อ methicillin ในระดับสูง [85] ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 พบเชื้อ MRSA ดื้อต่อยา vancomycin ที่ได้มีการนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อ MRSA และมีการตั้งชื่อเป็นกลุ่ม Vancomycin-Intermediate/Resistant *S. aureus* (VISA/VRSA) [77] ปัจจุบันได้มีรายงานการพบเชื้อ *S. aureus* ที่ลดความไวต่อยาในกลุ่ม glycopeptides ที่เรียกว่า glycopeptide-Intermediate *S. aureus* (GISA) [88]

P. aeruginosa แบคทีเรียรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วยไพลาร์แฟลกเจลลลา มักอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นลูกโซ่สั้นๆ และผลิต pigment คือ pyocyanin (สีน้ำเงินแกมเขียว) และ fluorescein (สีเหลืองแกมเขียว) [40] นอกจากนี้ที่ผนังเซลล์ของ *P. aeruginosa* ยังประกอบด้วยลิพอโพลีแซ็กคาไรด์ที่ยื่นออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทางซีโรโลยีและความไว (susceptible) ต่อแบคทีริโอซินหรือไฟโอซินและแบคทีริโอเฟจ เชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีชั้นเมือกที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์และมีพิไลอยู่ที่ผิว

เซลล์ช่วยในการยึดเกาะบนพื้นผิวต่างๆ ภายในและการสร้าง biofilm ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่อการดื้อยาของเชื้อนี้ [36] โดยปกติแล้ว *P. aeruginosa* ไม่ค่อยทำให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรืออ่อนแอ หรือเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายในบริเวณที่มีความต้านทานผิดปกติ เช่น เยื่อเมือกหรือผิวหนังที่มีรอยถลอก คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ รอยแผลไฟไหม้ การติดเชื้อที่ตา คนใช้สูงอายุ และโรคที่ภูมิคุ้มกันถูกกด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาวมักเกิดการติดเชื้อ *Pseudomonas* spp. ได้ง่าย [87] นอกจากนี้ เชื้อ *Pseudomonas* spp. ยังเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) โดยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือทางการแพทย์ เช่น เครื่องช่วยหายใจ เครื่องสวนในหลอดเลือดหรือปัสสาวะ การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มักร้ายแรงและดื้อต่อยาที่ใช้รักษา ทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนขึ้น [88], [89] โรคที่เกิดจาก *P. aeruginosa* ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการปล่อยสารพิษออกมาจากตัวเชื้อเอง โดยสารพิษที่ซึมออกมาจากเซลล์ สามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ เช่น เม็ดเลือดขาวน้อยกว่าปกติ ปอดบวม ตับและไตถูกทำลาย เป็นต้น [40] และสารพิษที่อยู่ภายในเซลล์ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง *P. aeruginosa* ยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำลายกระจกตา (cornea) และหากติดเชื้อที่ตาอาจทำให้ตาบอดได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดหูอักเสบหรือหูหนวกของนักว่ายน้ำ เชื้อ *P. aeruginosa* ดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียในอัตราสูงและเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการรักษา การดื้อยาเกิดขึ้นได้จากหลายกลไก [90], [91] เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้ยาผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงและทำให้เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดโดยธรรมชาติ [92] การสร้างเอนไซม์ β - lactamase และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBP ทำให้เชื้อดื้อต่อยาส่วนใหญ่ในกลุ่ม β - lactamase เชื้อยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม aminoglycosides และ chloramphenicol กลไกในการยับยั้งยาหลายชนิดออกจากเซลล์ [93] รวมถึงการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา เช่น การทำลายพันธะของเอนไซม์ DNA gyrase ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม quinolones นอกจากนี้เชื้อส่วนใหญ่ยังดื้อต่อยาในกลุ่ม tetracyclines, macrolides, rifampin และ trimethoprim/sulfamethoxazole สายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิดซึ่งโดยปกติเชื้อมีความไวยานั้นเรียกว่า multidrug-resistant strain ซึ่งพบเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน และเริ่มพบการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems [94] เนื่องจากปัจจุบันเชื้อ *P. aeruginosa* มีอัตราการดื้อยาสูงและดื้อยาในหลายกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล การรักษาด้วยยาเพียงชนิดเดียวมักทำให้เกิดการดื้อยาชนิดนั้นในระหว่างการรักษาได้บ่อย [95] โดยทั่วไปจึงควรใช้ยามากกว่า 1 ชนิดร่วมกันในการรักษา ยาต้านจุลชีพที่อาจ

เลือกใช้ได้แก่ยาในกลุ่ม antipseudomonal penicillins, antipseudomonal cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides และ fluoroquinolones

Streptococcus pneumoniae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือรีอยู่กันเป็นคู่ มักเรียกว่า diplococci ติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรียที่ค่อนข้างทนเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมจะสร้างแคปซูล สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1-2 สัปดาห์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมของเลือดและซีรัม และเพาะเชื้อในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ประมาณ 5% [36] *S. pneumoniae* เป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน ได้รับเชื้อจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปหรือการหายใจ โดยมากก่อโรคในเด็ก คนชรา และคนที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ กลไกการก่อโรคของเชื้อ *S. pneumoniae* นั้นยังไม่ทราบชัดเจน และไม่พบการสร้างสารพิษที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อโดยตรง เชื่อว่าพยาธิสภาพเป็นผลจากการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อเป็นหลัก [96] *S. pneumoniae* เป็นเชื้อสาเหตุหลักก่อให้เกิดโรคปอดบวม (pneumonia) ซึ่งเป็นการอักเสบของเนื้อปอด โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคหูชั้นกลางอักเสบ เป็นต้น *S. pneumoniae* พบการติดเชื้อได้บ่อยที่สุดในเด็กที่อายุ 3-5 ปี โดยประมาณร้อยละ 10 ของเด็กที่มารับการรักษาด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ ซึ่งจัดว่าเป็นโรคที่มีความสำคัญมากเนื่องจากเป็นโรคที่มีความรุนแรงมากที่สุดของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็ก [40] องค์การอนามัยโลกคาดว่าโรคปอดอักเสบและเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อ *S. pneumoniae* เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตประมาณ 1.6 ล้านรายต่อปี โดยกว่าร้อยละ 90 ของการเสียชีวิตจากปอดอักเสบเป็นเด็กในประเทศที่กำลังพัฒนา [97] รายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2510 พบการดื้อยา penicillins ของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่หมู่เกาะปาปัว นิวกินี และการดื้อยา penicillins ในระดับต่ำเรียกว่า Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) ในระยะ 10 ปีหลังจากนั้นพบเชื้อ PRSP กระจายทั่วโลก ในปี 2530 พบการระบาดของเชื้อ *S. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยา penicillins ในระดับสูงและเชืวดื้อยาอื่นอีกหลายชนิดจึงเรียกว่า drug-resistant *S. pneumoniae* (DRSP) จากนั้นพบว่าเชื้อ DRSP แพร่กระจายไปทั่วโลก [98] ในประเทศไทยพบแนวโน้มของเชื้อ *S. pneumoniae* ดื้อยาเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะเชื้อที่ดื้อยาระดับสูง [76] อย่างไรก็ตาม *S. pneumoniae* มีกลไกการดื้อยาดังนี้คือ การดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ของเชื้อ *S. pneumoniae* ไม่ได้เกิดจากการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง PBP ที่ผนังเซลล์ของเชื้อ การที่ยาจับกับ PBP ได้ลดลง ทำให้ผนังเซลล์ไม่แตกออกจึงไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ เชื้อดื้อยาระดับสูงมีการเปลี่ยนแปลงของ PBP มากกว่าเชื้อที่ดื้อปานกลาง การดื้อยา chloramphenicol

เกิดจากการสร้าง chloramphenicol acetyltransferase ของเชื้อทำให้ยาหมดฤทธิ์ ส่วนการดื้อยาหลายชนิดเกิดจากการที่ conjugate transposon นำยีน ดื้อยาส่งต่อกันระหว่างสายพันธุ์ ยาด้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้รักษาเชื้อนี้มีหลายชนิดเช่นกลุ่ม cephalosporins, macrolides, chloramphenicol และ glycopeptides [99]

สารต้านอนุมูลอิสระจากพืช

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่มีอะตอมหรือหมู่อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว ซึ่งอาจมีจำนวนอิเล็กตรอนการขาดหรือเกินก็ได้ ตัวอย่างอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่พบบ่อย เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot -}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) อนุมูลอิสระเป็นตัวออกซิไดซ์ที่ว่องไวมากสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอะตอมของธาตุอื่นๆได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีการเสื่อมสภาพและการทำลายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม [100], [101] ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระก็คือสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระได้โดยกลไกต่างๆ [16], [101] สารกลุ่มนี้มีมากมายหลายชนิดในธรรมชาติทั้งที่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ เช่น วิตามินซี และบี สารที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินอี และสารแคโรทีนอยด์ [102] อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระตามแหล่งที่อยู่ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรก คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular antioxidant) เป็นกลุ่มของสารต่อต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์พบในปฏิกิริยาภายในร่างกาย เช่น catalase, superoxide dismutase และ glutathione peroxidase เป็นต้น และอีกกลุ่มหนึ่งคือ สารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก (extracellular antioxidant) เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากอาหาร เช่น ascorbic acid polyphenols และ flavonoids เป็นต้น [103], [19] สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้จากพืชหลายชนิด สารสำคัญในพืชที่มีบทบาทและคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารกลุ่ม polyphenols ซึ่งที่พบได้ในพืชมักเป็นพวก phenolic acid และ flavonoids [102] พืชที่มีรายงานว่ามีส่วนประกอบนี้ อยู่มาก ได้แก่ องุ่น แอปเปิล ชา กาแฟ โกโก้ เมล็ดพืชบางชนิด เช่น เมล็ดป่าน เมล็ดมะกอก และเมล็ดทานตะวัน นอกจากนี้ยังพบในผักต่างๆ เช่น บร็อคโคลี่ และ หัวหอม เป็นต้น [19], [102] มีรายงานการศึกษาศาสตร์กักตุนโพลีฟีนอลจากเมล็ดขนุน ลำไย มะม่วง มะขาม พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณ phenolics สูงกว่าส่วนของเนื้อผลไม้ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร oligomeric proanthocyanidin ซึ่งพบมากในผลไม้ ผัก ถั่ว เมล็ดพืช ดอกไม้ และเปลือกไม้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน [104] การศึกษาในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองพบสาร flavonoids ในต้นไม้จำพวกที่มีฝักและผลไม้ใน

ตระกูลส้ม มีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระได้ดี [105] พืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้แก่ ฝรั่ง กานพลู อบเชย ชะเอม [106] กระเทียม ขมิ้นชัน หอมหัวใหญ่ ขิง มะละกอ [107] ว่านชักมดลูก มะเขือ [108], [109] ข้าเลียด กระโดนน้ำ มะม่วง พันธ์ุเขียวเสวย ผักแว่น [19], [110] นอกจากนี้ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระออกมาจำหน่ายในท้องตลาดจำนวนมาก เช่น สารสกัดจากเปลือกลำต้นของมะม่วงภายใต้ชื่อการค้า Vimang® ซึ่งมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพ โดยมี phenolic acids เช่น gallic acid, 3,4-dihydroxy benzoic acid และ benzoic acid เป็นองค์ประกอบ [111], [112], [113], [114] และสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีสารชื่อ pycnogenol มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิตามินซี 20 เท่า และมากกว่าวิตามินอีถึง 50 เท่า [115]

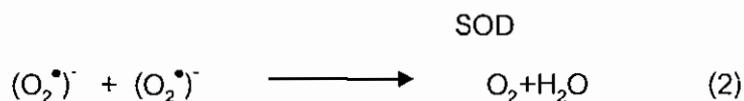
กลไกการควบคุมอนุมูลอิสระ

ธรรมชาติของร่างกายมนุษย์และสัตว์ชั้นสูงจะมีกลไกหรือระบบการป้องกันหรือทำลายสารพิษ รวมทั้งระบบในการทำลายหรือต่อต้านอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารที่ไม่มีอันตราย ซึ่งหากมีการสะสมของอนุมูลอิสระในเซลล์หรือเมื่อกลไกของระบบการต่อต้านอนุมูลอิสระของร่างกายถูกรบกวนหรือทำลายย่อมส่งผลต่อการเสื่อมสภาพของการทำลายของอวัยวะนั้นๆ ตามมา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องควบคุมสภาวะของการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระให้สมดุล โดยสารต้านอนุมูลต่างๆมีกลไกในการควบคุมสภาวะดังนี้

1. กลไกยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ โดยสารกลุ่ม antioxidant enzymes เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในร่างกายมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระต่างๆ ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ได้แก่ Catalase หรือ CAT เป็นเอนไซม์ในเซลล์ทำหน้าที่ทำลาย Hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยจะเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) ดังสมการที่ 1



Superoxide dismutase หรือ SOD เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ของร่างกายเช่นกันทำหน้าที่เปลี่ยน superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) ให้ไปเป็น (H_2O_2) ดังสมการที่ 2 จากนั้น H_2O_2 จะถูกทำลายต่อไปตามสมการที่ 1 และ 3

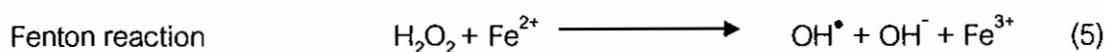


Glutathione peroxidase ซึ่งมีอยู่ในเซลล์ทุกเซลล์จะช่วยเปลี่ยน H_2O_2 หรือ alkyl hydroperoxide (ROOH) ให้อยู่ใน H_2O โดยจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่าง glutathione (GSH) และ H_2O_2 ดังสมการ 3 และ 4



แม้ว่าเอ็นไซม์เหล่านี้ในร่างกายจะมีประสิทธิภาพสูงในการที่จะกำจัดอนุมูลอิสระ แต่ก็มีการผลิตขึ้นมาได้อย่างไม่ต่อเนื่อง ร่างกายจึงจำเป็นต้องมีตัวช่วยกำจัดอนุมูลอิสระทั้งที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่สามารถละลายในน้ำ เช่น วิตามินต่างๆ และละลายในไขมัน ซึ่งได้แก่ วิตามินเอ วิตามินอี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่ uric acid, bilirubin, glutathione, sulhydryl containing protein และ amino acids รวมไปถึงจนถึงธาตุที่จำเป็นที่มีอยู่จำนวนเล็กน้อยในร่างกาย เช่น Zinc ก็มีบทบาทในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็นโคเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาด้านออกซิเดชันต่างๆ และช่วยเสริมการทำงานของเอ็นไซม์ต่างๆ นี้

นอกจากนี้ยังมีกลไกในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระโดยใช้ Metal binding protein ธาตุทรานสิชั่นโดยเฉพาะเหล็ก และ ทองแดง จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า Fenton reaction และ Harber -Weiss reaction ซึ่งเป็นการเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็น OH^{\bullet} ดังสมการที่ (5)-(8)



Harber Weiss reaction





Fe Catalyst



ทั้ง H_2O_2 และ $\text{O}_2^{\bullet -}$ นั้นถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ทุกเซลล์เป็นปกติ และจะถูก catalase และ superoxide dismutase ช่วยกำจัดเป็นส่วนมากแต่ถ้ายังคงมีหลงเหลืออยู่ และเมื่อมีสารพวกโลหะ อยู่ในปริมาณที่สูง ก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็น OH^\bullet ได้มาก โดยผ่านปฏิกิริยา Fenton และ Haber-weiss reaction ดังที่กล่าวมาแล้ว [116], [117] ดังนั้นโปรตีนในกลุ่ม Metal binding protein ซึ่งสามารถจับกับธาตุทรานสิชันเหล่านี้เองจะมีผลในการลดการสร้างอนุมูลอิสระได้

2. กลไก radical-scavenging antioxidants โดยแบ่งเป็นยับยั้งการเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (inhibit chain initiation) เช่น วิตามินซี กรดยูริก และอัลบูมิน และการทำงานแบบหยุดปฏิกิริยา (break chain propagation) เช่น วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และ ubiquinol วิตามินซี หรือ ascorbic acid สามารถกำจัด superoxide, hydrogen peroxide, hyperchloric acid, peroxy radicals และ singlet oxygen ได้โดยรับอิเล็กตรอน 2 ตัว จากปฏิกิริยา oxidation กลายเป็น dehydroascorbic acid ได้สารตัวกลางระหว่างการเกิดปฏิกิริยา คือ ascorbyl radical ซึ่งมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาไม่มาก อย่างไรก็ตาม dehydroascorbic acid ที่ได้ก็ไม่เสถียรโดยจะถูกไฮโดรไลต์ กลายเป็น L-2,3-diketogulonic acid อย่างรวดเร็วและสามารถกลับสู่รูป ascorbate ได้ [118]

3. กลไกการทำงานแบบซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายและฟื้นฟูองค์ประกอบต่างๆ (repair and de novo antioxidants) เช่น lipase, protease, transferase และ DNA repair enzyme [119] สารชีวโมเลกุลทุกชนิดสามารถถูกทำลายได้โดยอนุมูลอิสระ แต่ไขมัน (lipids) มีโอกาสถูกทำลายได้มากที่สุด และเยื่อหุ้มเซลล์จะประกอบด้วย polyunsaturated fatty acids มากที่สุด ทำให้สามารถถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายจากอนุมูลอิสระ ส่วน DNA มีโอกาสถูกทำลายได้จากอนุมูลอิสระ น้อยกว่าเช่นเดียวกันกับโปรตีน ซึ่ง DNA จะเกิดความเสียหายได้อย่างมากก็ต่อเมื่อเกิด site-specific damage ซึ่งถ้าการซ่อมแซมของ DNA ไม่ทันต่อขบวนการการจำลองก็จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์จากการออกซิไดซ์เอ็นไซม์ ribonucleases ซึ่งการตรวจวัดปัสสาวะจะเป็นหลักฐานที่บ่งชี้การถูกทำลายของ DNA อย่างต่อเนื่อง [120] แต่ไม่ว่าระบบการซ่อมแซม DNA จะมีประสิทธิภาพเพียงใด หากความเสียหายเพียงเล็กน้อยเหล่านี้เกิดการสะสมก็อาจจะทำให้เกิด

mutation หรือเกิดความผิดปกติ เช่น การเกิดเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นกระบวนการซ่อมแซม หรือเป็นการเคลื่อนย้ายสารอนุมูลอิสระที่สะสม โดยการออกซิไดซ์หรือทำลาย เช่น ใน nucleic acids ต้องซ่อมแซมด้วยเอ็นไซม์ที่เฉพาะเจาะจง การทำลายโปรตีนที่เสื่อมสภาพ โดยใช้ proteolytic enzymes และการออกซิไดซ์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้เอ็นไซม์ lipase, peroxidases และ acyl transferases เป็นต้น [121]

การก่อการกลายพันธุ์

การก่อการกลายพันธุ์หมายถึง การกระตุ้นให้เกิดความเสียหายที่ดีเอ็นเอและเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ข้อมูลรหัสพันธุกรรม สารพิษที่กระตุ้นให้เกิดความเสียหายเหล่านี้เรียกว่า สารก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) [122] มีสารเคมีหลายชนิดสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งอาจพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น เขม่า sulfuroxides, nitrogen, oxide, benz (a) anthracene และ ozone สารบางอย่างก็พบได้ในอุตสาหกรรมเหมืองแร่ เช่น hematite และ auramine เป็นต้น [123] สารเคมีที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ พวก halogens และ halogenated derivative เช่น vinyl chloride monomer ที่ใช้ผลิตท่อ PVC alcohols เช่น methanol และ ethylene โลหะหนัก เช่น ตะกั่ว และปรอท เป็นต้น [124] ส่วนสารที่พบได้ในอาหาร เช่น aflatoxin, Tryp P-1, Tryp P-2, Glu-P-2, MeIQ, IQ, Phen P-1, Glu-P-2 และ McA & C เป็นต้น สารบางอย่างก็เป็นองค์ประกอบของยารักษาโรค เช่น chloramphenicol, phenacetin, mitomycin C, methotrexate, dacarbazine และ nitrofurantoin เป็นต้น นอกจากสารเคมีแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆที่ทำให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ ได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น รังสีต่างๆ หรือการติดเชื้อไวรัสโดยเฉพาะไวรัสชนิด oncogenic viruses [123]

สารเคมีหรือสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น โดยการสัมผัส การหายใจ การกิน และดื่ม เมื่อถูกดูดซึมจะเข้าสู่เส้นเลือด Hepatic portal vein ไปยังอวัยวะสำคัญที่เป็นเป้าหมายของสารพิษคือ ตับ ไต ปอด ต่อมไทรอยด์ และทางเดินอาหาร จะทำหน้าที่เก็บสะสมและมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเพื่อการทำลายและขับออกจากร่างกาย รูปร่างหรือโครงสร้างโมเลกุลของสารเคมีจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ สารเคมีที่เป็นพิษจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารตัวกลางที่มีฤทธิ์น้อยลง ทำให้มีการละลายในน้ำได้มากขึ้น และได้สารตัวสุดท้ายที่ไม่มีพิษเลย อย่างไรก็ตามในทางตรงกันข้าม มีสารเคมีหลายชนิดที่ถูกเปลี่ยนให้เป็นสารใหม่ที่มีพิษมากขึ้น และมักจะทำปฏิกิริยาเคมีโดยตรงกับสารชีวโมเลกุล ได้แก่ ดีเอ็นเอ, โปรตีน ไขมัน ไขมัน และทำให้เกิดโรคต่างๆตามมา ทั้งนี้กลไกการก่อการกลายพันธุ์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ [122]

โรคหัวใจและตับชื่อ Triphala ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด เมื่อนำมาทดสอบวิธีเฮอร์สโดยใช้เชื้อ *S. Typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 พบว่าสารที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และอะซิโตนมีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสารทั้งที่เป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง และสารก่อกลายพันธุ์ในกลุ่มที่อาศัยเอ็นไซม์จากตับเป็นตัวกระตุ้น ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว คณะผู้วิจัยได้ให้ความเห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์อาจเกิดจากสารประกอบกลุ่ม polyphenols ที่พบในสมุนไพรดังกล่าว โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์หลายกลไกประกอบกัน เช่น เป็นการเข้าไปทำลาย (scavenger) หรือมีผลต่อระบบเอนไซม์ที่กระตุ้นหรือทำลายสารพิษ เป็นต้น [125] และที่ประเทศอินเดียเช่นเดียวกันมีรายงานการศึกษาสารสกัดด้วยน้ำ และ เอลานอลจากเปลือกผลไม้พื้นเมืองที่มีสีทับทิมพบว่า มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ [126] และนอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาที่ประเทศจีนของสมุนไพรจีนจำนวน 36 ชนิด ซึ่งเป็นสมุนไพรต้านมะเร็ง เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์โดยวิธีเฮอร์ส โดยใช้เชื้อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 พบว่าสมุนไพรจีนที่สกัดด้วยน้ำจำนวน 7 ชนิดใน 36 ชนิด แสดงฤทธิ์ด้านผลของ picrolonic acid ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง และจำนวน 15 ชนิดใน 36 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของ benzo[a]pyrene ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่ต้องถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ และในจำนวนนี้มี 5 ชนิดที่ยับยั้งได้ทั้ง picrolonic acid และ benzo[a]pyrene [127] ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของพืชสมุนไพรพบว่าสารสกัดเมธานอล 50 % จากเปลือกมังคุดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 และมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์จากสาร 2 - (2-fluryl) - 3 (5-nitro-2-fluryl) acrylamide (AF2) ต่อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 แต่สารสกัดด้วยน้ำร้อนไม่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์จากสารสกัด AF2 และ 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) ต่อ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 [128] รายงานการศึกษาผักพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย 15 ชนิด พบว่ามีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์หลายชนิด เช่น เสาวรส พริก เป็นต้น [129] และนอกจากนี้ในน้ำมันหอมระเหยจาก ชิง ไหระพา กระเพรา และดอกกระดังงา มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์เช่นเดียวกัน [130] และมีรายงานการศึกษาในประเทศไทยพบสารสกัดเอลานอลจากคำฝอยมีฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ต่อแบคทีเรีย *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100 ในสภาวะที่ต้องการเอ็นไซม์จากตับกระตุ้นการเกิดฤทธิ์ [101], [122] การนำพืชหรือสารสกัดจากพืชมาทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์มีประโยชน์ในด้านการนำพืชหรือสารสกัดจากพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติมาใช้ป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากการกลายพันธุ์ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดอุดตัน และโรคข้ออักเสบ เป็นต้น [16], [122]

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์

สารเคมีที่ทำลายยีนพบอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบๆตัวเรา ซึ่งเป็นการทำให้เกิดพิษโดยการทำลายในส่วนของยีนหรือดีเอ็นเอโดยตรง และการเปลี่ยนแปลงของยีนมีความเกี่ยวข้องกับการก่อการกลายพันธุ์ การเกิดมะเร็ง และการเกิดลูกวิรูป เป็นต้น การตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ จึงเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากปัจจุบันมีรายงานการเพิ่มขึ้นของโรคที่เกี่ยวข้องกับหน่วยพันธุกรรมที่มีผลเนื่องมาจากสารก่อการกลายพันธุ์ วิธีการทดสอบต่างๆ ของการกลายพันธุ์ ซึ่งมีหลักการของการทดสอบโดยกว้างๆ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) การเปลี่ยนแปลงในโครโมโซม (chromosome aberration) และการเปลี่ยนแปลงในส่วนของดีเอ็นเอ (primary DNA damage) [124] การทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ทำได้หลายวิธีต่อไปนี้

1. การทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย [131]

สายพันธุ์แบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบจะต้องครอบคลุมถึงชนิดของการกลายพันธุ์แบบ base pair substitution ทั้ง transition และ transversion และแบบ frame-shift mutation นอกจากนี้ต้องมีความไวต่อสารเคมีหลายชนิด เช่น สายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงผนังเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นต้น การทดสอบนิยมใช้ระบบ reverse mutation การทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองที่นิยมใช้กันมากและเป็นที่ยอมรับนั้นคือ วิธีของเอมส์ (Ames'test) [135] ค้นพบครั้งแรกในปี พ. ศ. 2516 โดยศาสตราจารย์เอมส์และคณะ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเบอร์คเลย์ แคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา แบคทีเรียที่นิยมใช้ทดสอบฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ได้แก่ *S. Typhimurium* และ *E. coli* โดยอาศัยหลักการว่าสารที่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์จะเหนี่ยวนำให้เกิด reverse mutation แก่แบคทีเรียสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจากเดิมคือ ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนฮิสทีดีนขึ้นได้เอง แบคทีเรียจึงไม่สามารถเจริญในตัวกลางที่ขาดกรดอะมิโนชนิดนี้เรียกว่า Histidine dependent เมื่อสารที่นำมาทดสอบและมีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียจะไปมีผลให้มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนฮิสทีดีนอีกครั้ง โดย *S. Typhimurium* สายพันธุ์ TA 1535 และ TA 100 เป็นการแลกเปลี่ยนเบสภายนอกดีเอ็นเอ และสายพันธุ์ TA 1537, TA 1538 และ TA 98 เป็นการเลื่อนที่ของเบสในดีเอ็นเอ วิธีของเอมส์ในปัจจุบันได้พัฒนาเป็นหลายวิธีให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมดังนี้คือ spot test โดยสารทดสอบจะถูกวางบน agar ซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อลักษณะวุ้นและถูกเคลือบด้วยแบคทีเรีย เอ็นไซม์ที่ใช้กระตุ้น หรือบัพเฟอร์ถ้าไม่ใช้เอ็นไซม์กระตุ้น และ Top agar สารทดสอบเป็นของเหลวหยดบนกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร สารที่เป็นของแข็งตัดวาง 2-3 ชิ้นบนวุ้น นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น spot test เป็นการทดสอบแบบเชิงคุณภาพเหมาะจะใช้ในกรณีที่มีสารที่ต้องการ

ทดสอบเป็นจำนวนมาก เช่น มากกว่า 100 ตัวอย่าง วิธีนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อเป็นการประหยัดเวลา ก่อนที่ทำการทดสอบตามวิธีอื่นต่อไป [101] วิธี plate incorporation test นำส่วนผสมทั้งหมดคือ สารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แบคทีเรีย เอ็นไซม์ที่ใช้กระตุ้น หรือ บัฟเฟอร์ถ้าไม่ใช้เอ็นไซม์กระตุ้น เทลงบน minimal agar plate จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น [122] และวิธีที่นิยมมากที่สุดคือ preincubation test เป็นวิธีที่ถูกปรับปรุงบางขั้นตอนเพื่อให้มีความไวต่อสารก่อกลายพันธุ์มากกว่า วิธี plate incorporation เพราะสารก่อกลายพันธุ์บางชนิด เช่น ไดมัททิล และไดเอททิลไนโตรซามีน ต้องการการกระตุ้นก่อนเข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของเซลล์โดยตรงทันที โดยวิธีนี้สารเคมีที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ แบคทีเรีย เอ็นไซม์ที่ใช้กระตุ้น หรือ บัฟเฟอร์ถ้าไม่ใช้เอ็นไซม์กระตุ้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเติม top agar ลงไป วิธีนี้เหมาะในการตรวจสอบสารก่อมะเร็งจำพวกไนโตรซามีนและสารกลุ่มอัลคาลอยด์ รวมทั้งสารเคมีที่ระเหยง่าย [124], [101]

2. การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในจุลชีพที่สูงกว่าแบคทีเรีย [122]

จุลชีพดังกล่าวได้แก่ Shizosaccharomyces, Neurospora, Saccharomyces และ Aspergillus ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นทดสอบ reverse mutation และสายพันธุ์ที่เลือกใช้จะต้องครอบคลุมถึงชนิดของการกลายพันธุ์แบบ base pair substitution ทั้ง transition และ transversion และแบบ frame-shift mutation นอกจากนี้จะต้องมีความไวต่อสารเคมีหลายชนิด วิธีการคือทำได้ทั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

3. การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในแมลง [124]

แมลงที่ใช้ทดสอบต้องมีคุณสมบัติที่จะวัด forward gene mutations และการมีแตกหักชิ้นเล็กของส่วนสำคัญบน genome ของโครโมโซม หลักการโดยทั่วไปคือ การทดสอบทางพันธุกรรมในแมลงต้องใช้สายพันธุ์ที่มีความไวมากที่สุดจนสามารถตรวจสอบสารก่อกลายพันธุ์ในช่วงกว้าง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด วิธีที่นิยมคือ six-linked recessive lethal test โดยใช้แมลงหวี่ *Drosophila* (fruit fly) เมื่อนำแมลงตัวผู้มาเลี้ยงด้วยสารทดสอบที่ผสมอยู่ในอาหารเช่น น้ำตาลทราย แล้วนำไปผสมพันธุ์กับตัวเมียซึ่งไม่ได้รับสารใดๆ แล้วดูลูกที่เกิดมา ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้รวดเร็ว สังเกตผลได้ง่ายและชัดเจนถ้ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

4. การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของยีนในเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ชั้นสูงที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง [101]

เซลล์ที่ใช้ทดสอบจะต้องมีคุณสมบัติคือ ไวต่อการที่จะถูกสารเคมีกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเฉพาะของโครโมโซม เซลล์ที่ใช้ต้องปราศจากการปนเปื้อนจาก mycoplasma มีการแบ่งเซลล์เร็วและได้เหมือนเซลล์เดิม นอกจากนี้เซลล์ยังต้องสามารถกระตุ้นให้สารเคมีแสดงฤทธิ์ออกมาได้ ถ้าสารที่ทดสอบเป็น promutagen อาจใช้การกระตุ้นด้วยเอ็นไซม์จากแหล่งอื่นเช่น ตับ หลักการของวิธีนี้คือ การทดสอบต้องสามารถตรวจวัดสารก่อกลายพันธุ์ได้หลายชนิด โดยประเมินความไวของการทดสอบ การใช้ระบบเอ็นไซม์กระตุ้น การกลายพันธุ์ของยีนในเซลล์ของร่างกายเป็นการตรวจวัดทดสอบตำแหน่งบนโครโมโซมว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกทางฟีโนไทป์อย่างไร

5. การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของยีนในสัตว์เลือดอุ่น [124]

สัตว์ที่นำมาทดสอบแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ พวกสัตว์ทะเล ได้แก่ หนูถีบจักร หนูพุกขาวและหนูแฮมสเตอร์ เป็นต้น ส่วนอีกพวกหนึ่งนั้นเป็นพวกสัตว์ที่ไม่ใช่พวกสัตว์ทะเล ได้แก่ สุนัขและลิง เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้มากได้แก่ หนูถีบจักร หนูพุกขาว หนูตะเภา และกระต่าย สัตว์ที่นำมาทดสอบจะมีตำแหน่งที่จำเพาะบนโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไวต่อการก่อกลายพันธุ์เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ วิธีนี้ต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากเพื่อให้การทดสอบไวต่อฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารเคมีและผู้ทำการทดสอบต้องมีความเชี่ยวชาญเฉพาะ การทดสอบวิธีนี้เป็น การตรวจวัดการก่อกลายพันธุ์แบบ base pair substitution และมีความเหมาะสมกับการประเมินความเสี่ยงอันตรายของเซลล์สืบพันธุ์เนื่องจากใช้สารเคมีที่มีขนาดต่างกัน ตัวอย่างได้แก่ วิธี Dominant Lethal Test เป็นวิธีตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมทั้งในด้านจำนวน และโครงสร้างซึ่งหากมีการผ่าเหล่าหรือกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะทำให้เสียชีวิตได้ เช่น การทดสอบพิษก่อการกลายพันธุ์ต่อการสร้างอสุจิในหนูพุกขาว วิธีการคือ ให้สารทดสอบในขนาดประมาณหนึ่งในห้าของ LD₅₀ แก่หนูตัวผู้ จากนั้นนำไปผสมพันธุ์กับตัวเมียที่ไม่ได้รับสารเคมีใดๆ รอให้หนูตัวเมียดังท้องได้ 14 วัน นำไปฆ่าแล้วตรวจดูความผิดปกติของตัวอ่อน เป็นต้น

การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในอดีตส่วนใหญ่นิยมใช้สัตว์ทดลอง แต่ในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าหลายวิธีสามารถทดแทนได้ด้วยการใช้วิธีใหม่ หรือเทคโนโลยีที่เหมาะสม เช่น การทดสอบในหลอดทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งนี้เพราะยีนและโครโมโซมของจุลินทรีย์นั้นไม่ซับซ้อนและสะดวกต่อการเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งจะช่วยให้สามารถประหยัดทรัพยากรผลที่ได้รวดเร็ว และถูกต้องมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีอื่นยังเป็นที่ยอมรับใช้อยู่คือ การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในสัตว์ทดลอง การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในเซลล์เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นต้น [124]