

**บทที่ 4**  
**ผลการวิจัย**

**1. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิส ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells)**

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้น 50 mg/ml มาเจือจางลำดับส่วนแบบ 2 เท่า ที่ความเข้มข้น 24 ถึง 25,000 µg/ml และทดสอบความเป็นพิษกับ Vero cell ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมแล้วนำไปบ่มที่ 37°C ใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 3 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 390.62 ถึง 25,000 µg/ml มีความเป็นพิษต่อ Vero cell เนื่องจากเปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย มีค่า 100% และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 24 ถึง 195 µg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตาราง 5) เมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (50% cytotoxicity dose, CD<sub>50</sub>) เท่ากับ 280 µg/ml ดังนั้นในการทดลอง เพื่อทดสอบผลยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมจึงเลือกใช้สารสกัดที่มีค่าเข้มข้นน้อยกว่าค่า CD<sub>50</sub>

**ตาราง 5** เปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของ Vero cell เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส

ความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิส (µg/ml)	เซลล์ตาย (%)
25000.00	100
12500.00	100
6250.00	100
3125.00	100
1562.50	100
781.25	100
390.62	100
195.31	0
97.66	0
48.83	0
24.41	0

## 2. การหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay

เมื่อตรวจหาปริมาณไวรัสเริ่มต้นจากการนับ plaque ของเชื้อ HSV หลังการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cells พบว่าปริมาณไวรัสเริ่มต้นของ HSV-1 เท่ากับ  $2.6 \times 10^6 \pm 0.37$  PFU/ml ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของ HSV-2 เท่ากับ  $6.5 \times 10^6 \pm 0.52$  PFU/ml (ตาราง 6)

ตาราง 6 ปริมาณไวรัสเริ่มต้นของเชื้อ HSV

ชนิดของไวรัส	ปริมาณไวรัส (PFU/ml) <sup>a</sup>
HSV-1	$2.6 \times 10^6 \pm 0.37$
HSV-2	$6.5 \times 10^6 \pm 0.52$

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง

## 3. การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์

เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสกับเชื้อ HSV โดยเติมสารสกัดโพรพอลิส ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง และตรวจสอบผลการยับยั้งเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม พบการยับยั้งเชื้อไวรัส ดังนี้

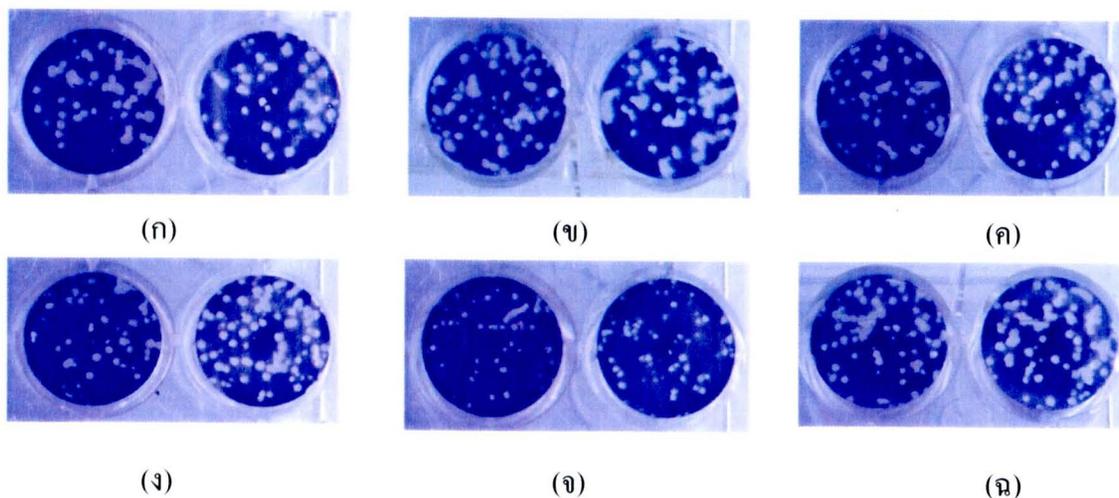
### 3.1 การยับยั้งเชื้อ HSV-1

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ในช่วงก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 5.1, 13.9, 22.0 และ 32.3% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 1.0  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อได้ 22.4% (ตาราง 7, ภาพ 7)

ตาราง 7 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	$32.3 \pm 1.03$
	48.8	$22.0 \pm 2.06$
	24.2	$13.9 \pm 1.03$
	12.2	$5.1 \pm 0.41$
Acyclovir	1.0	$22.4 \pm 0.21$

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 7 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml (ก) ความเข้มข้น 48.8 µg/ml (ข) ความเข้มข้น 24.2 µg/ml (ค) ความเข้มข้น 12.2 µg/ml (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาด้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

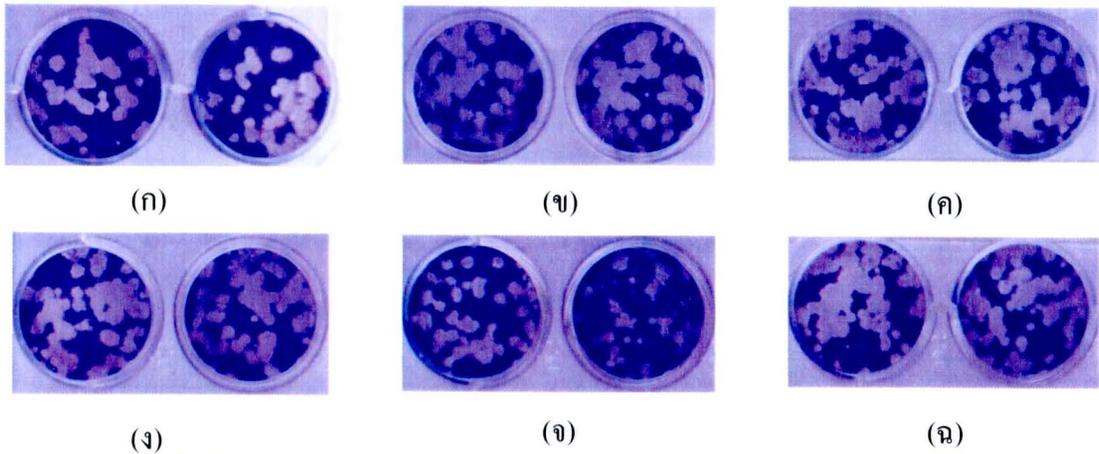
### 3.2 การยับยั้งเชื้อ HSV-2

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ในช่วงก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 16.3, 22.8, 33.3 และ 43.1% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 2.0 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อได้ 40.7% (ตาราง 8, ภาพ 8)

ตาราง 8 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/ml)	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	43.1 ± 0.92
	48.8	33.3 ± 1.85
	24.2	22.8 ± 3.69
	12.2	16.3 ± 1.84
Acyclovir	2.0	40.7 ± 2.18

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



**ภาพ 8** การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml (ก) ความเข้มข้น 48.8 µg/ml (ข) ความเข้มข้น 24.2 µg/ml (ค) ความเข้มข้น 12.2 µg/ml (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาด้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

#### 4. การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์

เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสกับเชื้อ HSV โดยเติมสารสกัดโพรพอลิส ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง และตรวจสอบผลการยับยั้งเปรียบเทียบกับกลุ่ม ไวรัสควบคุม พบการยับยั้งเชื้อไวรัส ดังนี้

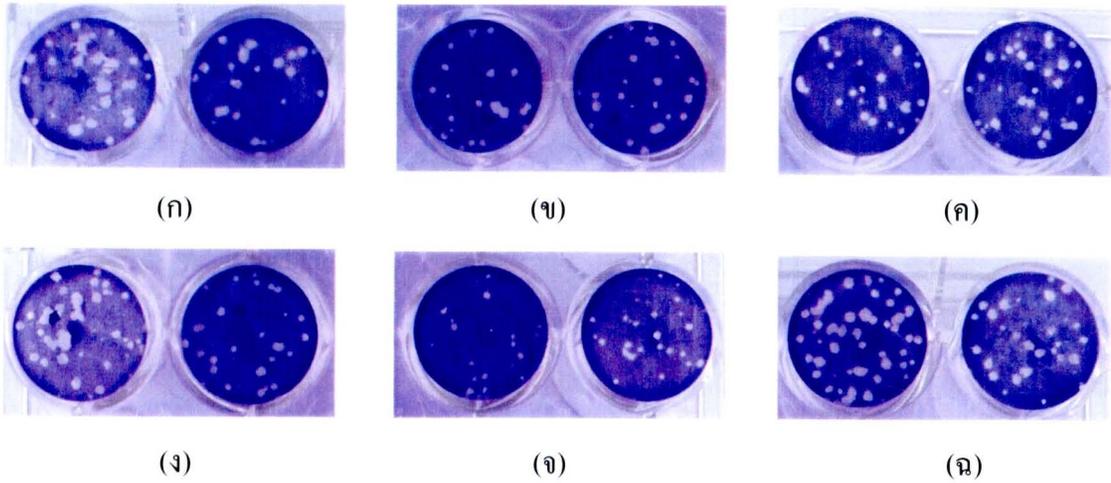
##### 4.1 การยับยั้งเชื้อ HSV-1

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ในช่วงขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 16.7, 30.4, 34.1 และ 42.8% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อได้ 41% (ตาราง 9, ภาพ 9)

**ตาราง 9** การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ขณะไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/ml)	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	42.8 ± 0.68
	48.8	34.1 ± 1.76
	24.2	30.4 ± 1.38
	12.2	16.7 ± 1.23
Acyclovir	1.0	41.0 ± 3.79

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 9 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml (ก) ความเข้มข้น 48.8 µg/ml (ข) ความเข้มข้น 24.2 µg/ml (ค) ความเข้มข้น 12.2 µg/ml (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาด้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

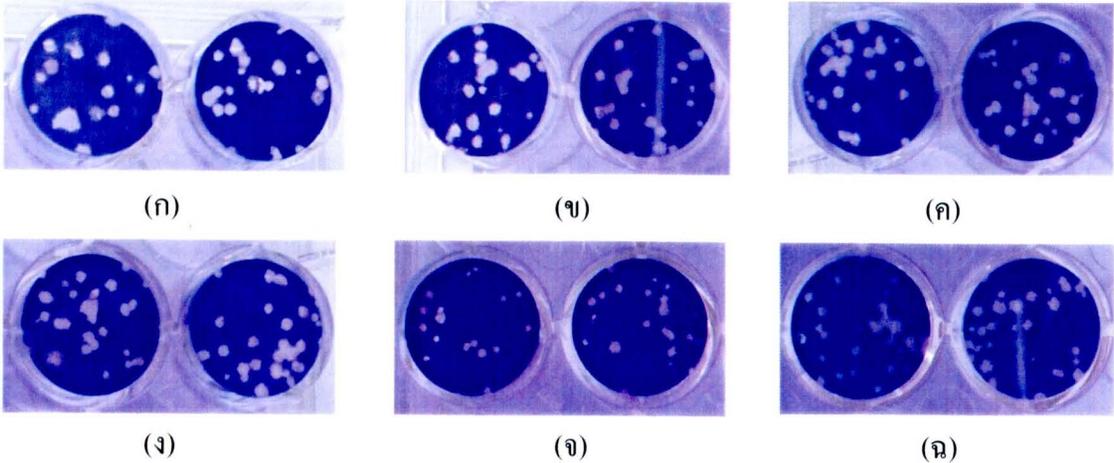
#### 4.2 การยับยั้งเชื้อ HSV-2

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ในช่วงขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 7.0, 22.8, 36.8 และ 47.3% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 2.0 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อได้ 37.7% (ตาราง 10, ภาพ 10)

ตาราง 10 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ขณะไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (µg/ml)	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	47.3 ± 2.23
	48.8	36.8 ± 4.96
	24.2	22.8 ± 1.20
	12.2	7.0 ± 2.48
Acyclovir	2.0	37.7 ± 4.61

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



ภาพ 10 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6  $\mu\text{g/ml}$  (ก) ความเข้มข้น 48.8  $\mu\text{g/ml}$  (ข) ความเข้มข้น 24.2  $\mu\text{g/ml}$  (ค) ความเข้มข้น 12.2  $\mu\text{g/ml}$  (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาด้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

## 5. ผลการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์

เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสกับเชื้อ HSV โดยเติมสารสกัดโพรพอลิส ที่ความเข้มข้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง และตรวจสอบผลการยับยั้งเปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม พบการยับยั้งเชื้อไวรัส ดังนี้

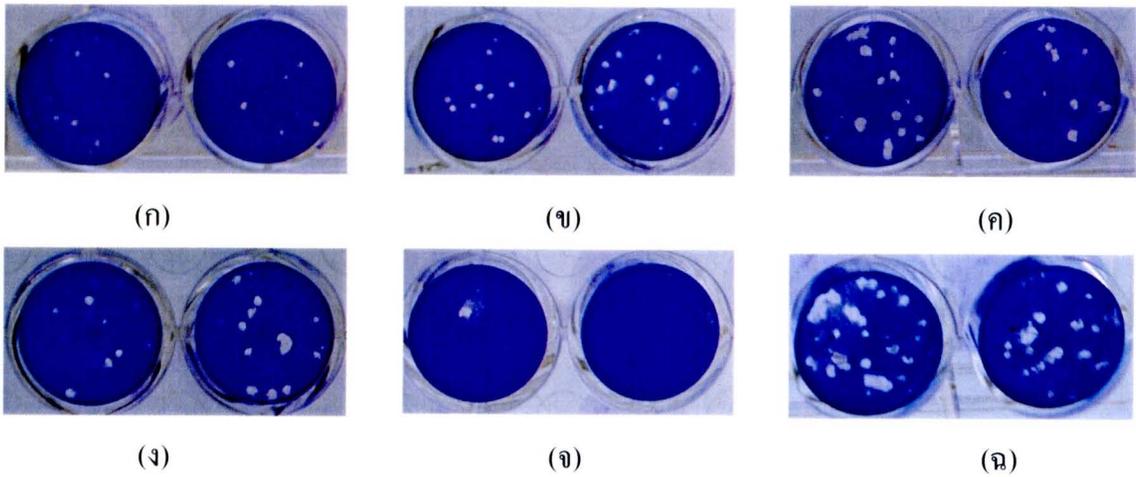
### 5.1 การยับยั้งเชื้อ HSV-1

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ในช่วงหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 13.0, 30.4, 47.8 และ 60.0% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 1.0  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อได้ 96.5% (ตาราง 11, ภาพ 11)

ตาราง 11 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

สารทดสอบ	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	60.0 $\pm$ 2.46
	48.8	47.8 $\pm$ 1.19
	24.2	30.4 $\pm$ 2.99
	12.2	13.0 $\pm$ 3.87
Acyclovir	1.0	96.5 $\pm$ 0.20

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



**ภาพ 11** การยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6  $\mu\text{g/ml}$  (ก) ความเข้มข้น 48.8  $\mu\text{g/ml}$  (ข) ความเข้มข้น 24.2  $\mu\text{g/ml}$  (ค) ความเข้มข้น 12.2  $\mu\text{g/ml}$  (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาด้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

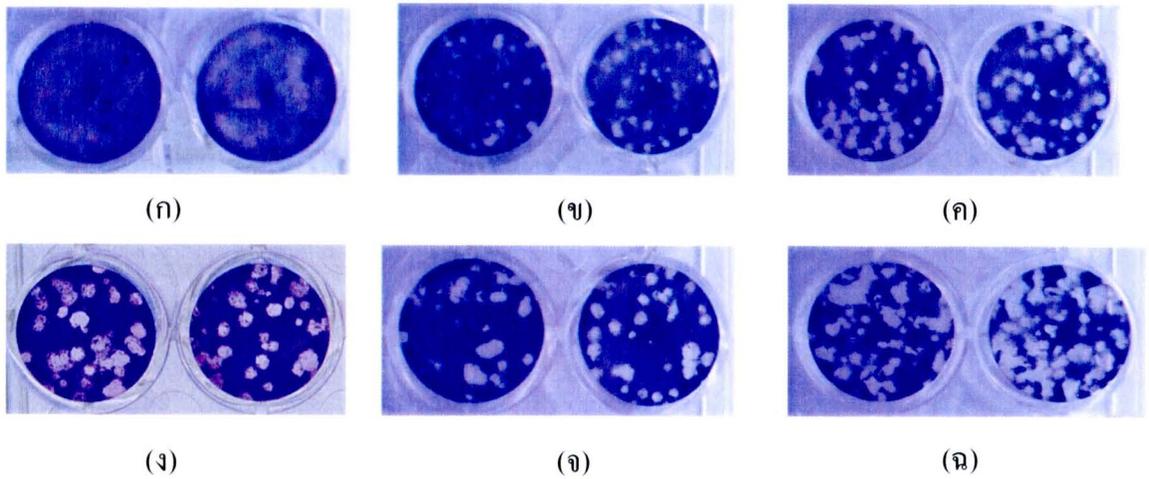
## 5.2 การยับยั้งเชื้อ HSV-2

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ในช่วงหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 12.2, 24.2, 48.8 และ 97.6  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 20.1, 27.8, 50.0 และ 74.6% ส่วนยา acyclovir ที่ความเข้มข้น 2.0  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งเชื้อได้ 61.3% (ตาราง 12, ภาพ 12)

**ตาราง 12** การยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับ Vero cell โดยสารสกัดโพรพอลิส

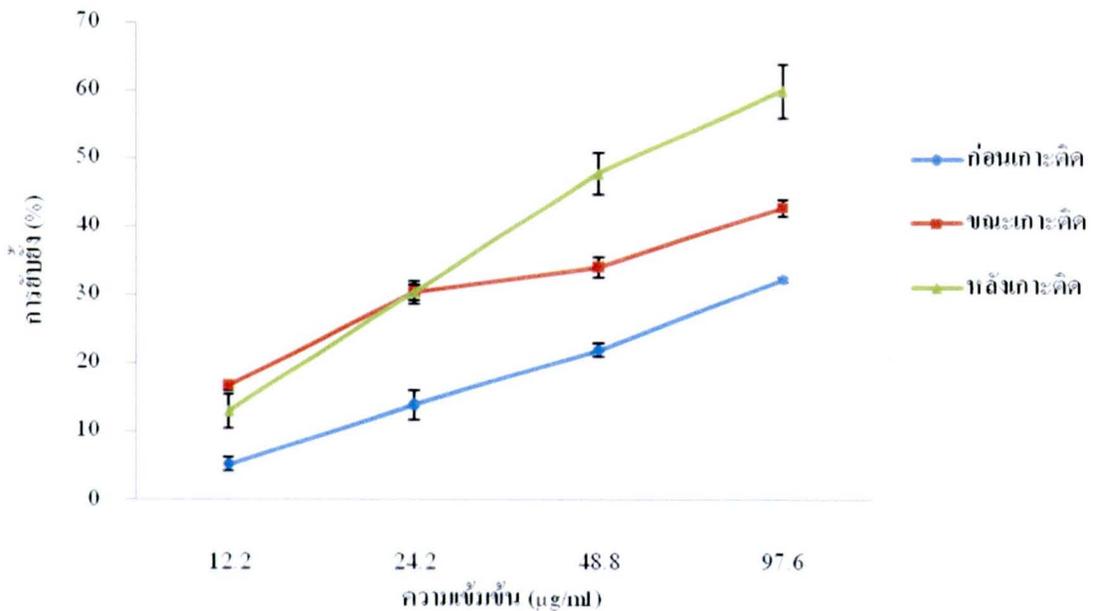
สารทดสอบ	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	การยับยั้ง (%)
สารสกัดโพรพอลิส	97.6	74.6 $\pm$ 1.02
	48.8	50.0 $\pm$ 1.46
	24.2	27.8 $\pm$ 5.83
	12.2	20.1 $\pm$ 2.18
Acyclovir	2.0	61.3 $\pm$ 1.74

<sup>a</sup> ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง



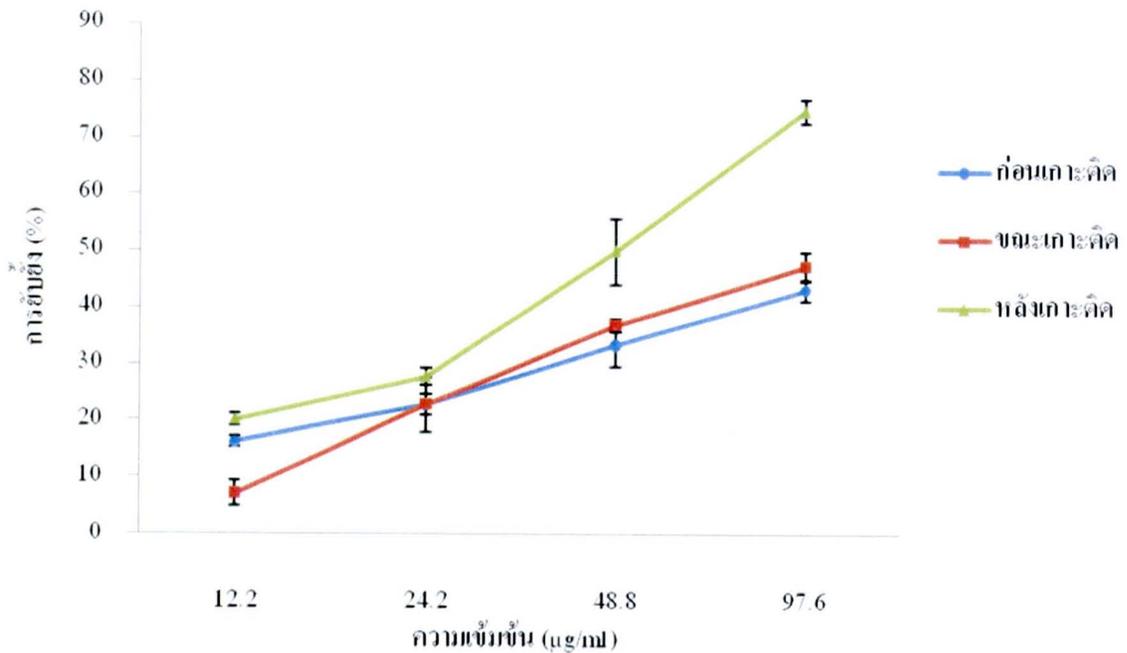
ภาพ 12 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml (ก) ความเข้มข้น 48.8 µg/ml (ข) ความเข้มข้น 24.2 µg/ml (ค) ความเข้มข้น 12.2 µg/ml (ง) เปรียบเทียบการทดสอบกับยาค้านไวรัส ACV (จ) และไวรัสควบคุม (ฉ)

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคริมฝีปากทั้งสองสายพันธุ์ ในขั้นตอนต่างๆ เมื่อทำการเปรียบเทียบการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ก่อนเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง ขณะเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1 หลังเกาะติดได้ดีที่สุด รองลงมาคือขณะเกาะติด และก่อนเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง (ภาพ 13)



ภาพ 13 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองสายพันธุ์ ในขั้นตอนต่างๆ เมื่อทำการเปรียบเทียบการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6  $\mu\text{g/ml}$  ในการยับยั้งเชื้อ HSV-2 ก่อนเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง ขณะเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อ HSV-2 หลังเกาะติดได้ดีที่สุด รองลงมาคือขณะเกาะติด และก่อนเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง (ภาพ 14)



ภาพ 14 กราฟแสดงการยับยั้งเชื้อ HSV-2 ในขั้นตอนก่อนเกาะติด ขณะเกาะติด และหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง

## 6. ผลการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งอนุภาคของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมโดยตรง

เมื่อผสมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง กับไวรัส HSV โดยใส่สารสกัดโพรพอลิสใช้ที่ความเข้มข้น 195.3  $\mu\text{g/ml}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมในแต่ละเวลาไปหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay พบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริม เปรียบเทียบกับกลุ่มไวรัสควบคุม ดังนี้

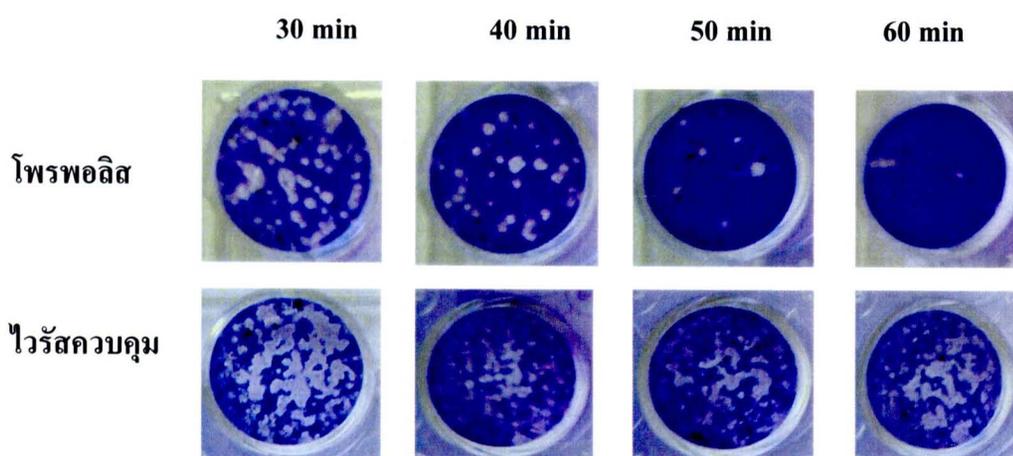
### 6.1 การยับยั้ง HSV-1

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งอนุภาคของเชื้อไวรัส HSV-1 โดยตรง พบว่าเมื่อผสมสารสกัดจากโพรพอลิส ที่ความเข้มข้น 195.3  $\mu\text{g/ml}$  กับไวรัสเป็นเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมงพบว่าการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 เท่ากับ 100% ในทุกเวลาของการทดสอบ ดังนั้นจึงลดระยะเวลาของการทดสอบเป็น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

พบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 เท่ากับ 23.2, 36.5, 77.4, 85.1, 97.4 และ 99.7% ตามลำดับ (ตาราง 13, ภาพ 15)

ตาราง 13 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรงที่ชั่วโมงต่างๆ

เวลา (นาที)	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)		การยับยั้ง (%)
	ทดสอบกับโพรพอลิส	ไวรัสควบคุม	
10	$5.3 \times 10^7$	$6.9 \times 10^7$	23.2
20	$3.3 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	36.5
30	$1.2 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	77.4
40	$7.0 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$	85.1
50	$1.8 \times 10^7$	$6.8 \times 10^7$	97.4
60	$1.5 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$	99.7



ภาพ 15 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-1 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3  $\mu\text{g/ml}$

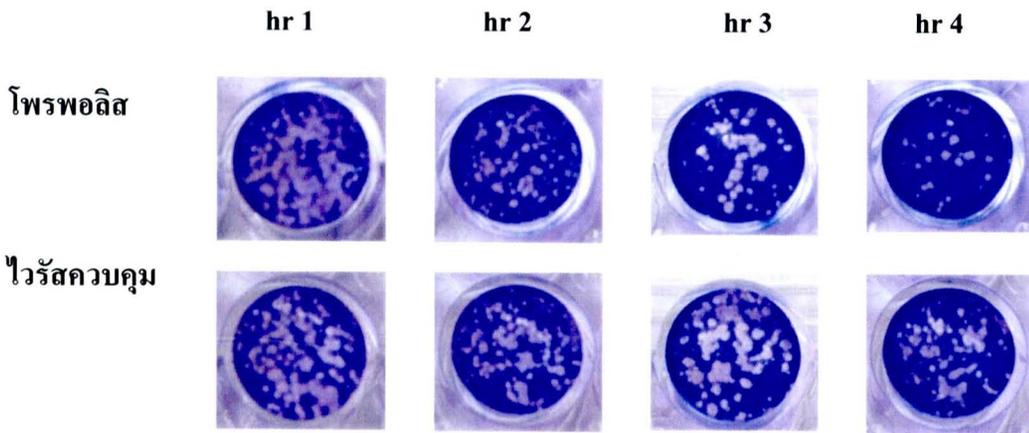
## 6.2 การยับยั้ง HSV-2

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้นน้อยกว่าค่า  $CD_{50}$  มาทำการทดสอบการยับยั้งอนุภาคของเชื้อไวรัส HSV-2 โดยตรง พบว่าเมื่อผสมสารสกัดจากโพรพอลิส ที่ความเข้มข้น 195.3  $\mu\text{g/ml}$  กับไวรัสเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 เท่ากับ 9.7, 19.3, 52.3 และ 70.7% ตามลำดับ (ตาราง 14, ภาพ 16)



ตาราง 14 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-2 โดยตรงที่ชั่วโมงต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)		การยับยั้ง (%)
	ทดสอบกับโพรพอลิส	ไวรัสควบคุม	
1	$1.2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	9.7
2	$9.6 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	19.3
3	$5.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	52.3
4	$3.6 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	70.7



ภาพ 16 การยับยั้งอนุภาคของเชื้อ HSV-2 โดยตรง โดยสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 195.3  $\mu\text{g/ml}$

## 7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสก่อโรคเรื้อรังที่ระยะเวลาต่างๆ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบสารสกัดโพรพอลิส ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสารสกัดโพรพอลิส ที่ความเข้มข้น 97.6  $\mu\text{g/ml}$  ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสก่อโรคเรื้อรังทั้งภายในและภายนอกเซลล์เปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม ณ เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง แล้วหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay พบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเรื้อรังเปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส ดังนี้

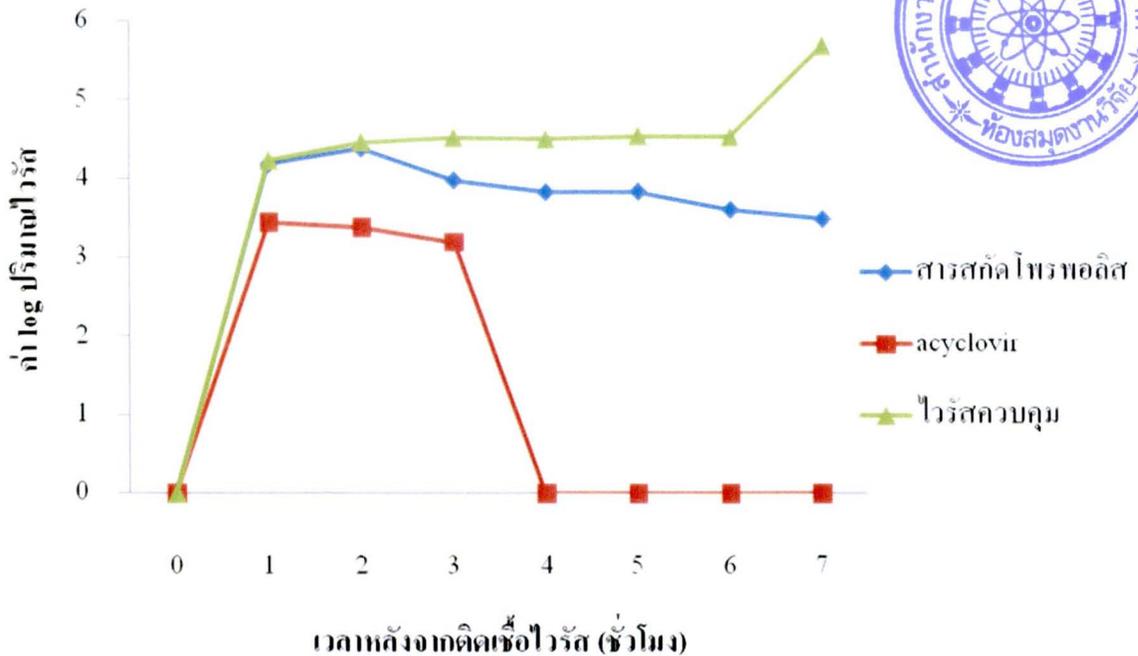
### 7.1 การยับยั้ง HSV-1

ผลการทดสอบสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อ HSV-1 โดยเปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir ที่ 0.4  $\mu\text{g/ml}$  ในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อใช้ไวรัส  $1 \times 10^6$  PFU/ml พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังการติดเชื้อ (Cytopathic

effect, CPE) ของเซลล์ติดเชื้อในกลุ่มไวรัสควบคุมมีลักษณะกลมวาว และค่อยๆ เปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ปกติเป็นเซลล์ที่ติดเชื้อมากขึ้น ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติที่มีลักษณะยาวรี ไม่วาวแสง ส่วนเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่เติมสารสกัดโพรพอลิสลงไป พบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิส เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการตรวจหาปริมาณไวรัส HSV-1 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสกับสารสกัดโพรพอลิส พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 2 ปริมาณไวรัสในกลุ่มทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิสมีปริมาณเท่ากับ  $2.4 \times 10^4$  PFU/ml ในขณะที่กลุ่ม acyclovir มีปริมาณไวรัสเท่ากับ  $2.4 \times 10^3$  PFU/ml กลุ่มไวรัสควบคุมมีปริมาณไวรัสเท่ากับ  $2.9 \times 10^4$  PFU/ml และเมื่อเวลาผ่านไป 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมงพบว่าปริมาณไวรัสในกลุ่มทดสอบโดยสารสกัดโพรพอลิสมีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับกลุ่มยาด้านไวรัส ซึ่งพบว่าในกลุ่มยาด้านไวรัสไม่สามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อไวรัส จากการทำการวิจัยพบว่าสารสกัดจากโพรพอลิส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ได้ดี เนื่องจาก จากการตรวจสอบพบว่าสารสกัดจากโพรพอลิสสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้มากกว่า 50 % ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 หลังจากการติดเชื้อ (ตาราง 15, ภาพ 17)

ตาราง 15 การยับยั้งเชื้อ HSV-1 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ACV ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)			การยับยั้ง (%)	
	สารสกัดโพรพอลิส	acyclovir	ไวรัสควบคุม	สารสกัดโพรพอลิส	acyclovir
	97.6 µg/ml	0.4 µg/ml		97.6 µg/ml	0.4 µg/ml
0	-	-	-	-	-
1	$1.5 \times 10^4$	$2.8 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$	11.8	83.5
2	$2.4 \times 10^4$	$2.4 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4$	17.2	91.7
3	$9.6 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^4$	70.9	95.2
4	$6.9 \times 10^3$	0	$3.4 \times 10^4$	79.7	100
5	$7.0 \times 10^3$	0	$3.5 \times 10^4$	80.0	100
6	$4.1 \times 10^3$	0	$3.2 \times 10^4$	87.2	100
7	$3.1 \times 10^3$	0	$4.9 \times 10^5$	99.4	100



ภาพ 17 ปริมาณ HSV-1 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir และไวรัสควบคุม

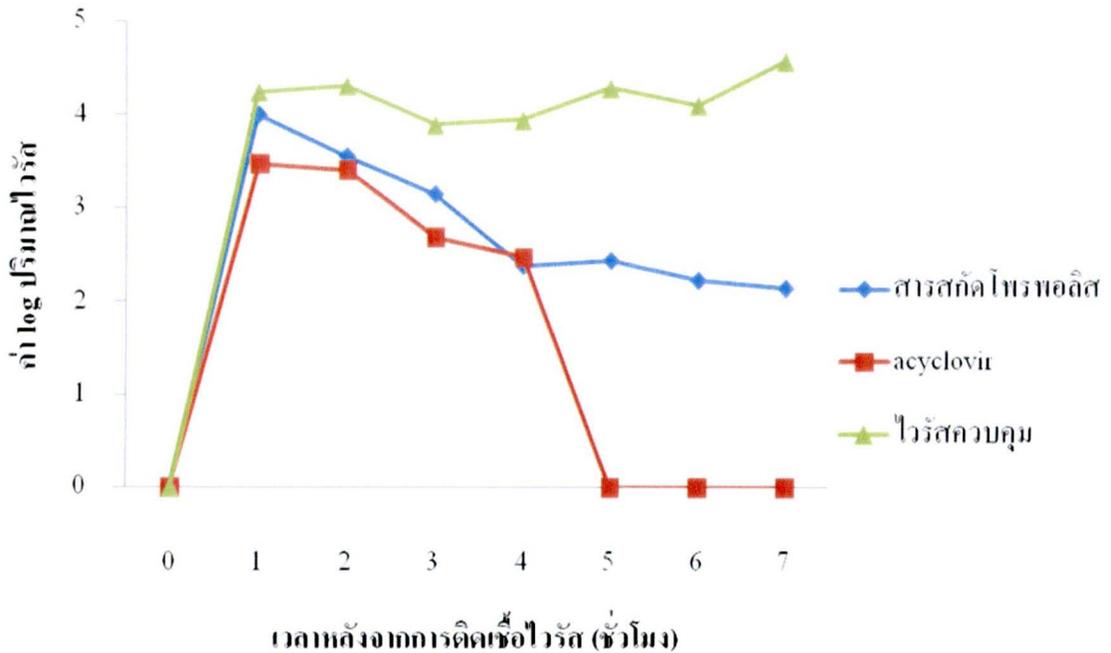
## 7.2 การยับยั้ง HSV-2

ผลการทดสอบสารสกัดโพรพอลิส และยาด้านไวรัส ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อ HSV-1 โดยเปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir ที่  $3.1 \mu\text{g/ml}$  ในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อใช้ไวรัส  $1 \times 10^6$  PFU/ml พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หลังการติดเชื้อ (Cytopathic effect, CPE) ของเซลล์ติดเชื้อในกลุ่มไวรัสควบคุมมีลักษณะกลมวาว และค่อยๆ เปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ปกติเป็นเซลล์ที่ติดเชื้อมากขึ้น ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ปกติที่มีลักษณะยาวรี ไม่วาวแสง ส่วนเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่เติมสารสกัดโพรพอลิสลงไป พบว่าเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิส เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการตรวจหาปริมาณไวรัส HSV-2 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสกับสารสกัดโพรพอลิส พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ที่ชั่วโมงที่ 2 ปริมาณไวรัสในกลุ่มทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิสมีปริมาณเท่ากับ  $3.6 \times 10^3$  PFU/ml ในขณะที่กลุ่ม acyclovir มีปริมาณไวรัสเท่ากับ  $2.6 \times 10^3$  PFU/ml กลุ่มไวรัสควบคุมมีปริมาณไวรัสเท่ากับ  $2.1 \times 10^4$  PFU/ml และเมื่อเวลาผ่านไป 3, 4, 5, 6 และ 7

ชั่วโมงพบว่าปริมาณไวรัสในกลุ่มทดสอบโดยสารสกัดโพรพอลิสมีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับกลุ่มยาต้านไวรัส ซึ่งพบว่าในกลุ่มยาต้านไวรัสไม่สามารถตรวจพบไวรัสได้ตั้งแต่ 5 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ จากการทำการวิจัยพบว่าสารสกัดจากโพรพอลิส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ได้ดี เนื่องจาก จากการตรวจสอบพบว่าสารสกัดจากโพรพอลิส สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้มากกว่า 50 % ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ภายหลังจากการติดเชื้อ (ตาราง 16, ภาพ 18)

ตาราง 16 การยับยั้งเชื้อ HSV-2 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนกับสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส ACV ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไวรัส (PFU/ml)			การยับยั้ง (%)	
	สารสกัดโพรพอลิส 97.6 µg/ml	Acyclovir 3.1 µg/ml	ไวรัสควบคุม	สารสกัดโพรพอลิส 97.6 µg/ml	Acyclovir 3.1 µg/ml
0	-	-	-	-	-
1	$1.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	44.4	83.3
2	$3.6 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$	$2.1 \times 10^4$	82.8	87.6
3	$1.4 \times 10^3$	$5.0 \times 10^2$	$8.0 \times 10^3$	82.5	93.8
4	$2.5 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$9.0 \times 10^3$	97.2	96.7
5	$2.8 \times 10^2$	0	$2.0 \times 10^4$	98.6	100
6	$1.7 \times 10^2$	0	$1.3 \times 10^4$	98.9	100
7	$1.4 \times 10^2$	0	$3.9 \times 10^4$	99.6	100



ภาพ 18 ปริมาณ HSV-2 ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ชั่วโมง หลังจากการติดเชื้อ เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส เปรียบเทียบกับยาด้านไวรัส acyclovir และไวรัสควมคุม

#### 8. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิส ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells)

จากการนำสารสกัดโพรพอลิสผงความเข้มข้น 100 mg/ml มาทำการเจือจางลำดับส่วนแบบ 2 เท่า ที่ความเข้มข้น 48.82 ถึง 50,000  $\mu\text{g/ml}$  มาทดสอบกับ HeLa cell ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมแล้วนำไปบ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  ใน  $\text{CO}_2$  incubator เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธีของ Reed and Muench (Reed and Muench, 1938) โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 48.82 ถึง 195.31  $\mu\text{g/ml}$  ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 390.62 ถึง 50,000  $\mu\text{g/ml}$  มีความเป็นพิษต่อ HeLa cell เนื่องจากเปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย มีค่า 75-100% เมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (50% cytotoxicity dose,  $\text{CD}_{50}$ ) เท่ากับ 316  $\mu\text{g/ml}$  จากนั้นจะทำการเลือกความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาทำการทดสอบการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูก (ตาราง 17)

ตาราง 17 เปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของ HeLa cell เมื่อทดสอบกับสารสกัด โพรพอลิส

ความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิส ( $\mu\text{g/ml}$ )	เซลล์ตาย (%)
50000.00	100
25000.00	100
12500.00	100
6250.00	100
3120.50	100
1562.25	100
781.25	100
390.62	75
195.31	0
97.65	0
48.82	0

### 9. การทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) โดย APOPercentage apoptosis assay (Biocolor,UK)

ผลการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์แตกหัก และมีการตายแบบ apoptosis เนื่องจาก เมื่อทำการทดสอบเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละช่วง เวลาพบว่าเซลล์ที่ตายจะย้อมติดสีแดงของ APOPercentage dye เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม โดยพบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกจะย้อมติดสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

จากผลการทดสอบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 730, 1100, 1460 และ 2190  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าเมื่อทำการทดสอบในชั่วโมงที่ 12 สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ โดยทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดการตายแบบ apoptosis ได้เท่ากับ 10.7, 15.1, 19.7 และ 21.4% จากผลการทดสอบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชั่วโมงที่ 18 พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้เท่ากับ 14.1, 18.9, 24.7 และ 25.8% ตามลำดับ และที่ชั่วโมงที่ 24 พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้เท่ากับ 29.7, 30.8, 41.5 และ 46.7% ตามลำดับ และเซลล์ควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis โดย etoposide (ETS) 500  $\mu\text{M}$  เกิด apoptosis 94.2% (ตาราง 18)

ตาราง 18 ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm เมื่อทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลาย  
ดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น µg/ml	ค่า OD					การทำลาย ดีเอ็นเอแบบ apoptosis (%)
		T1	T2	T3	เฉลี่ย	หาค่าควบคุม	
12	730	0.113	0.109	0.098	0.1066	0	10.7
	1100	0.151	0.162	0.141	0.1513	0	15.1
	1460	0.193	0.200	0.197	0.1966	0	19.7
	2190	0.214	0.216	0.211	0.2136	0	21.4
18	730	0.145	0.135	0.144	0.1413	0	14.1
	1100	0.194	0.187	0.186	0.1890	0	18.9
	1460	0.249	0.244	0.245	0.2460	0	24.6
	2190	0.260	0.266	0.248	0.2580	0	25.8
24	730	0.300	0.299	0.292	0.2970	0	29.7
	1100	0.321	0.308	0.293	0.3076	0	30.8
	1460	0.412	0.431	0.403	0.4153	0	41.5
	2190	0.464	0.479	0.458	0.4670	0	46.7
	ETS 500 µM	0.967	0.919	0.940	0.942	0	94.2

จากผลการทดสอบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกพบว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกในแต่ละชั่วโมง กับความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิส พบว่าในชั่วโมงที่ 12, 18 และ 24 เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิสเพิ่มขึ้นจะสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในแต่ละชั่วโมงได้เพิ่มขึ้น และพบว่าในชั่วโมงที่ 24 สามารถทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีที่สุด (ภาพ 19 และ 20)



(ก)



(ข)



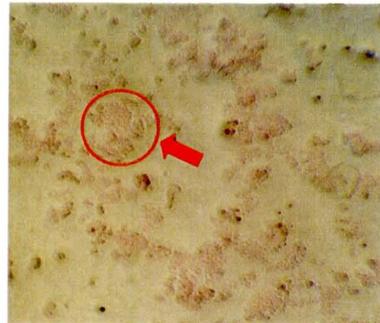
(ค)



(ง)

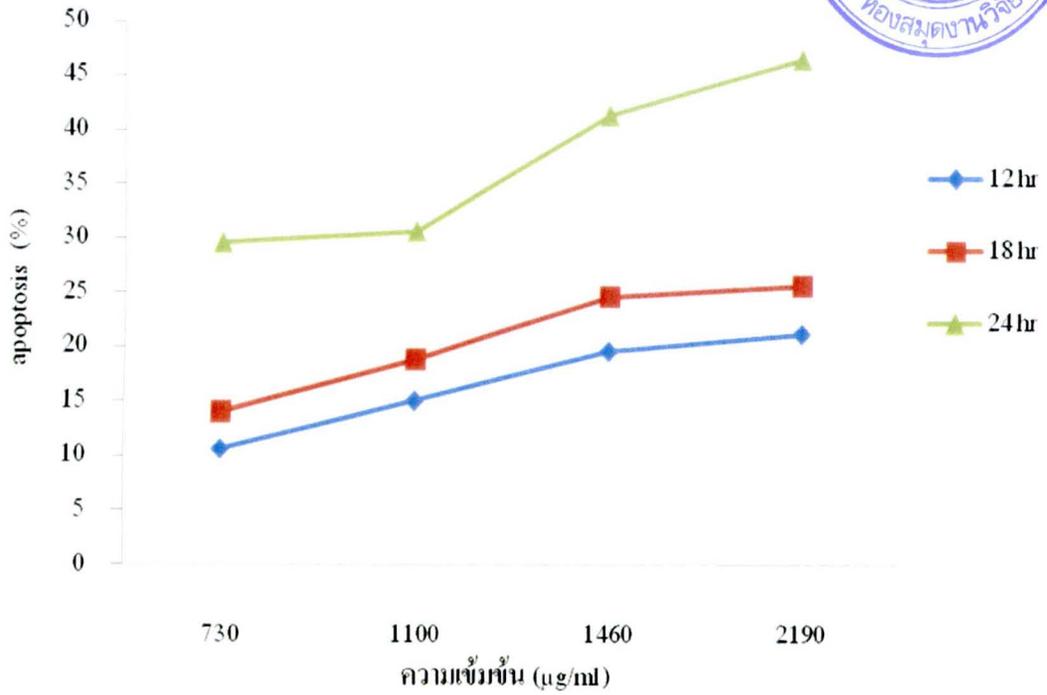


(จ)



(ฉ)

**ภาพ 19** เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ย้อมติดสีแดงของ APOPercentage dye เมื่อทดสอบด้วยสารสกัด โพรพอลิสที่ความเข้มข้น 730 µg/ml (ก) 1100 µg/ml (ข) 1460 µg/ml (ค) และ 2190 µg/ml (ง) เซลล์ควบคุม (จ) ลูกศรแสดงกลุ่มเซลล์ที่เกิด apoptosis โดย Etoposide 500 µM (ฉ)



ภาพ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกแบบ apoptosis เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดโพรพอลิสความเข้มข้น 730, 1100, 1460, 2190 µg/ml เป็นเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง