บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

การหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิส กับเซลล์เพาะเลี้ยง (Vero cells) โดยวิธีของ Reed and Muench ซึ่งเป็นการหาความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิสที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า มีค่า 50% cytotoxicity dose (CD_{50}) เท่ากับ 280 µg/ml ซึ่งสำหรับการทดลองได้เลือกใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิสที่น้อยกว่าค่า CD_{50} เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบกับเชื้อไวรัสสายพันธุ์มาตรฐาน คือ HSV-1 และ HSV-2

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองสายพันธุ์ในขั้นตอนก่อนไวรัสเกาะติดกับเซลล์ ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ และหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสในช่วงหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ ได้ดีกว่าขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ และก่อนเกาะติดกับเซลล์ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 97.6 µg/ml กับเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสก่อนเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 32.3 % และ 43.1% สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสขณะเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 42.8% และ 47.3 % สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสหลังเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยงได้ 60.0% และ 74.6% แสดงว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งการเกาะติดของไวรัสกับ receptor บนผิวเซลล์ โดยอาจมีการแย่งจับกับ receptor ขณะไวรัสเกาะติดกับเซลล์ และทำลายอนุภาคไวรัสโดยตรง ทั้งนี้ได้มีการทดสอบ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายในสารสกัดพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 0.312% ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของโพรพอลิส ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองชนิด นอกจากนี้สามารถยับยั้งอนุภาคไวรัสภายในเซลล์โดยงานนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Amoros *et al.* ในปี 1992 พบว่าโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 30 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ HSV-1, HSV1-R และ HSV-2 หลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์ได้ 99.9% และสามารถยับยั้ง Vesicular stomatitis virus (VSV) หลังเชื้อเกาะติดกับเซลล์ได้ 90% และสอดคล้องกับการศึกษาของ Nolkemper *et al.* ในปี 2010 ซึ่งทำการศึกษาสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้ง HSV-2 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่สกัดโดยน้ำและโพรพอลิสที่สกัดโดย ethanol สามารถยับยั้งเชื้อหลังเกาะติดได้ดีกว่าก่อนเกาะติด และพบว่าสารสกัดจาก ethanol สามารถยับยั้งไวรัสก่อน

เกาะติดและหลังเกาะติดได้ดีกว่าสารสกัดน้ำ โดยสารสกัดโพรพอลิสสามารถจับกับ receptor ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสบนผิวของเซลล์เพาะเลี้ยง ทำให้ไวรัสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนั้นสารสกัดโพรพอลิสยังมีผลทำให้สภาวะภายในของเซลล์เพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลง จึงทำให้เชื้อไวรัสที่เข้าสู่เซลล์แล้วไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากโพรพอลิสจะไปมีผลต่อ RNA และโปรตีนภายในเซลล์ และยังมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ทำให้ไวรัสไม่สามารถใช้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้

นอกจากนี้ในปี 2002 Huleihel and Isanu ได้ทำการศึกษาโพรพอลิสที่สกัดโดยน้ำ กับเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 ซึ่งผลการศึกษาพบว่าเมื่อทำการทดสอบกับไวรัสขณะเกาะติดกับเซลล์โดยใช้สารสกัดโพรพอลิส 0.1% สามารถยับยั้งเชื้อได้ 5-12% และโพรพอลิส 1% สามารถยับยั้งเชื้อได้ 85-90% และโพรพอลิส 0.5% สามารถยับยั้ง HSV ได้ 50% เมื่อทดสอบโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 10% ในช่วงหลังไวรัสเกาะติดกับเซลล์พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้ 80-85% นอกจากนี้ยังพบว่า caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ซึ่งพบในโพรพอลิส เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างมาก และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดี พบว่าที่ความเข้มข้น 10 M สามารถยับยั้ง HSV-1 ขณะเกาะติดได้ 70% โดยพบว่าสาร CAPE จะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีน RNA และทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงอีกด้วย

การศึกษาครั้งนี้ให้ผลต่างไปจากงานวิจัยของ จารุวรรณ (2552) ซึ่งพบว่าโพรพอลิสสามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในช่วงขณะเกาะติดได้ดีกว่าหลังเกาะติด เนื่องมาจากวิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมขณะที่ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ของจารุวรรณจะไม่มีการดูดเชื้อไวรัสและสารสกัดออกหลังจากการทดสอบ ดังนั้นผลการยับยั้งที่ได้จึงเป็นการยับยั้งเชื้อไวรัสที่อยู่ภายนอกเซลล์และเชื้อไวรัสที่ติดเชื้อเข้าไปในเซลล์แล้ว แต่งานวิจัยนี้มีการดูดเชื้อไวรัสและสารสกัดออก หลังจากการทดสอบการยับยั้งของโพรพอลิสขณะที่ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ ดังนั้นผลการยับยั้งจะเป็นผลจากการยับยั้งไวรัสที่อยู่ภายนอกเซลล์เท่านั้นจึงทำให้การยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ในช่วงขณะเกาะติดต่ำกว่างานวิจัยของจารุวรรณ

การทดสอบการทำลายอนุภาคไวรัสก่อโรคเริมโดยตรงโดยผสมสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์กับไวรัสก่อโรคเริม บ่มที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ แล้วนำมาตรวจหาปริมาณไวรัสโดยวิธี plaque titration assay จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสในการทำลายอนุภาคไวรัส HSV-1 โดยทำการทดสอบการทำลายอนุภาคของไวรัสที่เวลา 10, 20, 30,

40, 50 และ 60 นาที พบว่าปริมาณไวรัสที่ทำการทดสอบมีปริมาณที่ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และเมื่อนำปริมาณไวรัสในกลุ่มทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส มาทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลายอนุภาคไวรัส โดยเปรียบเทียบกับปริมาณไวรัสในกลุ่มควบคุมพบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 ได้ 23.2, 36.5, 77.4, 85.1, 97.4 และ 99.7% ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบการทำลายอนุภาคไวรัส HSV-2 ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถทำลายอนุภาคไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ได้ 9.7, 19.3, 52.3 และ 70.7% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับ Amoros *et al.* ในปี 1992 จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 50-500 μg/ml ในเวลา 15-120 นาที กับเชื้อ HSV-1, HSV-2 และพบว่าทดสอบกับเชื้อ HSV เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้ปริมาณของไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ลดลง แต่ในการยับยั้งเชื้อ Varicella zoster virus (VSV) พบว่าความเข้มข้นของโพรพอลิสในปริมาณสูง คือ 500 μg/ml จึงจะมีผลทำให้ปริมาณของเชื้อ VSV ลดลง ดังนั้นสารสกัดโพรพอลิสจึงมีผลในการทำลายอนุภาคของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ได้โดยตรง โดยพบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถทำลายไวรัสได้ดีเมื่อได้สัมผัสกับไวรัสอย่างทั่วถึงโดยทำลายเชื้อ HSV-1 ได้ดีกว่าเชื้อ HSV-2

นอกจากนี้การศึกษาของ Gekker *et al.* ในปี 2005 พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่สกัดโดย ethanol 20% สามารถยับยั้งเชื้อ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ใน $CD4^+$ lymphocyte และ Microglial cells โดยเมื่อทำการทดสอบใน $CD4^+$ cell culture พบว่าสารสกัดโพรพอลิสที่ความเข้มข้นที่ 66.6 μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของ $HIV\text{-}1_{AT}$ ได้มากกว่า 85% และในการทดสอบใน microglial cell culture สามารถยับยั้งการแสดงออกของ $HIV\text{-}1_{SF162}$ ได้ 98% และจากการศึกษาของ Serkedjieva and Manolova ในปี 1992 ได้ทำการศึกษาโพรพอลิสจากบัลแกเรีย พบว่า สามารถยับยั้ง influenza A virus subtype H1N1 และ influenza A virus subtype H3N2 โดยสารที่พบมากในโพรพอลิส คือสารกลุ่ม flavonoid ซึ่งประกอบด้วย pinocembrin, galangin, quercetindihydrate และ chrysin สารในกลุ่ม aromatic acids เช่น benzoic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid และ 2-Propenoic acid และสารกลุ่มอื่นๆ เช่น 4*H*-1-Benzopyran-4-one 2-Propen-1-one ซึ่งสารกลุ่มนี้สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส และทำลายเชื้อไวรัสที่มี envelope ได้ดี เช่น HSV-1, HSV-2, vesicular stomatitis virus, influenza virus A B, A/Hong Kong, HIV-1 (Amoros *et al.* 1992; Bankova *et al.*, 1982; Gekker *et al.*, 2005; Kaul *et al.,* 1985; Mucsi *et al.,* 1977; Sa-Nunes *et al.,* 2003; Serkedjieva and Manolova, 1992)

การศึกษาผลของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับยาต้านไวรัส acyclovir ในการศึกษานี้พบว่า

สารสกัดโพรพอลิส มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมทั้งสองสายพันธุ์ โดยเมื่อทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสกับเชื้อไวรัส HSV-1 พบว่าในกลุ่มไวรัสควบคุมสามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัส ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หลังจากปล่อยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยง และเมื่อปล่อยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์เพาะเลี้ยงในเวลาที่เพิ่มขึ้น ไวรัสในกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย แต่ไวรัสในกลุ่มที่ทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir และกลุ่มที่ทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส พบว่าปริมาณของเชื้อไวรัสก็มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เช่นเดียวกับในกลุ่มไวรัสควบคุม แต่มีปริมาณไวรัสน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม และเมื่อถึงช่วงเวลาหนึ่งไวรัสก็จะลดจำนวนลง โดยในกลุ่มทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir ไม่สามารถตรวจพบอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ได้ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป ส่วนในกลุ่มทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส ไวรัสมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยสังเกตจากชั่วโมงที่ 7 มีค่าปริมาณ Log ไวรัสลดลงเท่ากับ 2.20 เทียบกับในกลุ่มไวรัสควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 พบว่าสามารถยับยั้งได้ 99.4% ในชั่วโมงที่ 7 และยาต้านไวรัส acyclovir สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 ได้ 100% ในชั่วโมงที่ 4 แสดงว่าสารสกัดโพรพอลิส และยาต้านไวรัส acyclovir สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HSV-1 ได้

การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HSV-2 พบว่าในกลุ่มทดสอบกับยาต้านไวรัส acyclovir ไม่สามารถตรวจพบอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ได้ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 เป็นต้นไป ส่วนในกลุ่มทดสอบกับสารสกัดโพรพอลิส ไวรัสมีปริมาณลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยสังเกตจากชั่วโมงที่ 7 มีค่าปริมาณ Log ไวรัสลดลงเท่ากับ 2.44 เทียบกับในกลุ่มไวรัสควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 พบว่าสามารถยับยั้งได้ 99.6% ในชั่วโมงที่ 7 และยาต้านไวรัส acyclovir สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-2 ได้ 100% ในชั่วโมงที่ 5 แสดงว่าสารสกัดโพรพอลิส สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัสทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีมากตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสทั้งสองสายพันธ์ได้ถึง 99% ดังนั้นสารสกัดโพรพอลิสจึงสามารถรบกวนการเพิ่มจำนวน และประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ที่สมบูรณ์ แต่การศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างกับการศึกษาของ Nolkemper *et al.* ในปี 2010 พบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งไวรัสในช่วงการเพิ่มจำนวนได้น้อย โดยโพรพอลิสที่สกัดโดยน้ำสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ 2 ได้ 22.9% ส่วนสารสกัดโพรพอลิสที่สกัดโดย ethanol สามารถยับยั้งเชื้อได้ 6.3% ซึ่งสารสกัดโพรพอลิสที่ทำการสกัดด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ดีกว่าโพรพอลิสที่สกัดโดย ethanol โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพรพอลิสทั้งสองตัวอย่าง พบว่าโพรพอลิสที่สกัดโดยน้ำ จะพบปริมาณของ polyphenoles และ สารกลุ่ม phenylcarboxylic acids มากกว่าในสารสกัดโพรพอลิสที่สกัดโดย ethanol ซึ่งความแตกต่าง

ของผลการทดสอบ สารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อโรคเริมในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสก่อโรคเริมที่ใช้ในการศึกษาของ Nolkemper *et al.* (2010) และแหล่งที่มาของโพรพอลิสมีความแตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมีความแตกต่างกัน โดยจากการศึกษาของ Silici และ Kutluca ในปี 2005 ซึ่งทำการศึกษาโพรพอลิสที่เก็บได้จากผึ้ง 3 ชนิด และทำการศึกษากับเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ พบว่าโพรพอลิสที่ได้จากการเก็บของผึ้ง *Apis mellifera caucasica* สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือโพรพอลิสที่ได้จากการเก็บของผึ้ง *Apis mellifera anatolica* และโพรพอลิสที่ได้จากการเก็บของผึ้ง *Apis mellifera carnica* สามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยที่สุด ทำให้โพรพอลิสแต่ละแหล่ง และโพรพอลิสที่ได้จากการเก็บของผึ้งที่ต่างกันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริมแตกต่างกันได้เช่นกัน

นอกจากนี้โพรพอลิสมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยมีการวิจัยพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* และ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อรา *Candida albicans* (Cardoso *et al.*, 2010; Kosalec *et al.*, 2005; Kujumgiev *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2005; Sforcin *et al.*, 2000; Silici *et al.*, 2005) การศึกษาของ Lu *et al.* ในปี 2005 ได้นำโพรพอลิสที่ทำการสกัดโดย ethanol มาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารสกัดโพรพอลิสในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโพรพอลิส 3 แหล่ง ในไตหวัน ที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายน เดือนสิงหาคม และช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน โดยใช้ความเข้มข้น 60 µg/ml มีค่า MIC น้อยกว่า 3.75 และความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิสที่ 7.5-120 µg/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ และโพรพอลิสที่เก็บในช่วงเดือน สิงหาคม จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยโพรพอลิสที่เก็บใน Mingchien จะให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโพรพอลิสที่เก็บใน Taipei และ Fangliao ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โพรพอลิสที่เก็บในแต่ละแหล่ง และในแต่ละเดือนจะมีผลในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกัน ส่วนการศึกษาของ Cardoso *et al.* ในปี 2010 ได้ทำการศึกษากับเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ก่อโรค โดยทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสที่สกัดด้วย ethanol 70% ได้ทำการศึกษา *Staphylococcus* coagulase-positive 34 ตัวอย่าง และ *Malassezia pachydermatis* isolates 33 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบสารสกัดโพรพอลิสกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* พบว่าให้ค่า MBC เท่ากับ 13.3 mg/ml และ 16 mg/ml ตามลำดับ ให้ค่า MBC_{50} เท่ากับ 10.7 mg /ml และให้ค่า MBC_{90} เท่ากับ 21 mg/ml จากการทดสอบกับ *Malassezia pachydermatis* isolates พบว่าให้ค่า MFC เท่ากับ 2.4 mg/ml ให้ค่า MFC_{50} เท่ากับ 2.6 mg/ml และให้ค่า MFC_{90} เท่ากับ 5.3 mg/ml ซึ่งการศึกษาพบว่าสารสกัดโพรพอลิสสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สองชนิดโดยสามารถยับยั้งเชื้อ *Malassezia pachydermatis* ได้ดีกว่า *Staphylococcus* coagulase-positive

การทดสอบการหาค่าความเป็นพิษของสารสกัดโพรพอลิส กับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) มีค่า 50% cytotoxicity dose (CD_{50}) เท่ากับ 316 µg/ml ซึ่งสำหรับการทดลองได้ทำการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดโพรพอลิสที่มากกว่าค่า CD_{50} เพื่อใช้ทดสอบการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 730, 1100, 1460 และ 2190 µg/ml โดยทำการทดสอบชั่วโมงที่ 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าโพรพอลิสความเข้มข้นดังกล่าวสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยทำให้เซลล์มะเร็งปากมดลูกเกิดการตายแบบ apoptosis จะพบการติดสีแดงของ APO*Percentage* dye เนื่องจากเซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis จะเกิดกระบวนการ flip-flop ของ phosphatidyl serine ซึ่งในเซลล์ปกติจะพบ phosphatidyl serine อยู่ด้านใน cell membrane แต่ในเซลล์ที่เกิด apoptosis พบว่า phosphatidyl serine ย้ายมาอยู่ด้านนอกทำให้สามารถจับกับ APO*Percentage* dye ทำให้เซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis ติดสีแดงของ APO*Percentage* dye จากการทดสอบพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 29.7, 30.8, 41.5 และ 46.7% ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัด โพรพอลิสเพิ่มขึ้นก็จะทำให้เซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเซลล์ควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิด apoptosis โดย etoposide เกิด apoptosis 94.2% ซึ่งการเกิด apoptosis โดยสารสกัดโพรพอลิสอาจเกิดการกระตุ้น caspase 3, 6 และ 7 จากการศึกษาของ Motmura *et al.* ในปี 2008 ได้ทำการศึกษากลไกของโพรพอลิสที่ชักนำให้ Human leukemic U937 cells เกิด apoptosis โดยพบว่าโพรพอลิสที่สกัดโดย methanol สามารถชักนำให้เกิด apoptosis โดยผ่านทางการกระตุ้นของ caspase-3 และ Vatansever *et al.* ในปี 2010 ได้ทำการศึกษาพบว่าสารสกัด โพรพอลิสสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเต้านมเกิด apoptosis โดยผ่านทางการกระตุ้นของ caspase-6 ได้ นอกจากนี้ สารสกัดโพรพอลิสสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์อื่นได้อีก เช่น สามารถชักนำให้เซลล์ human melanoma cells (A2058), human leukemic U937 cells และ human breast carcinoma cell line เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (Chen *et al.*, 2007; Motmura *et al.*2008; Vatansever *et al.*, 2010)

นอกจากนี้ ในปี 1988 จากการศึกษาของ Grunber *et al.* ได้มีการศึกษาสารในโพรพอลิสโดยการสกัดแยก CAPE(4) จากโพรพอลิสในประเทศอิสราเอล พบว่าสาร CAPE ที่ได้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ต่อจากนั้นก็มีการศึกษาในปี 1996 โดย Nataranja *et al.* ได้มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ CAPE (4) โดยพบว่า CAPE (4) สามารถกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa beta (NF-KB) ได้โดยการยับยั้ง tumor necrosis factor (TNF) อย่างสมบูรณ์ และในปี

2000 Weyant *et al.* พบว่า CAPE (4) มีผลต่อการเกิด expression ของเอ็นไซม์ focal adhesion kinase (FAK) ซึ่ง FAK เป็นเอ็นไซม์ที่มีผลต่อการเคลื่อนไหว และอยู่รอดของเซลล์ การที่เอ็นไซม์นี้ทำงานได้ดีมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น และแบ่งตัวได้เร็วขึ้น (ศิริวรรณ, 2008) ดังนั้น เมื่อ CAPE สามารถลดการทำงานของเอ็นไซม์ FAK ก็จะทำให้ขนาดของเซลล์มะเร็งมีขนาดลดลง และสามารถแบ่งตัวได้ช้าลงอีกด้วย

จากการศึกษาของ Sá-Nunes *et al.* ในปี 2003 พบว่าสาร Concanavalin A (Con A) ในโพรพอลิสสามารถสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโดยช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ lymphocyte และการผลิต interferon เมื่อทำการทดสอบกับหนูที่เป็นแผลในกระเพาะอาหารพบว่าสาร Con A สามารถบรรเทาอาการเป็นแผลในช่องท้องของหนูได้ โดย Con A จะกระตุ้นให้ม้ามมีการผลิต IFN-γ เพิ่มขึ้น และพบว่าในสารสกัดโพรพอลิสจะมีองค์ประกอบใหญ่เป็นพวกสารในกลุ่ม flavonoid และ phenolic compound ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ เช่นจากการศึกษาของ Mirzoeva and Calder ในปี 1996 พบว่าโพรพอลิสที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถยับยั้งการเกิด reactive oxygen species ได้อย่างสมบูรณ์ ในปี 1995-1996 Matsushige *et al.* ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจาก โพรพอลิสของประเทศบราซิล โดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical และ superoxide anion radical โดยเปรียบเทียบสารสกัดระหว่าง methanol และน้ำ พบว่าสารสกัดน้ำสามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดจาก methanol ซึ่งสารสำคัญจากสารสกัดน้ำของโพรพอลิสเป็นอนุพันธ์ของ dicaffeoylquinic acid ซึ่งออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้กว่าสารต้านออกซิเดชัน เช่น วิตามินซี วิตามินอี และ caffeic acid นอกจากโพรพอลิสจะสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีแล้ว ยังสามารถต้านการอักเสบ ช่วยรักษาบาดแผล และซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้อีกด้วย (พงษ์พิทักษ์ และคณะ, 2541; ศิริวรรณ, 2008; Huleihel and Isanu, 2004)

ดังนั้นการนำโพรพอลิสซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการรักษาโรคเริม และมะเร็งปากมดลูก จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญสำหรับผู้ป่วยโรคเริม และผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ซึ่งการเลือกใช้สารสกัดธรรมชาติจะสามารถช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่ใช้ในการรักษา และการเกิดการดื้อยาของเชื้อไวรัสเมื่อใช้ยาติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน นอกจากนั้นยังสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในรักษาซึ่งยาส่วนใหญ่ที่ใช้จะเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่มีราคาค่อนข้างสูง