

## السلامة الدوائية والفاعلية العلاجية لمستحضر البروبوليس لعلاج الأصابة التجريبية لألتهاب الضرع في النعاج

كفاح عودة سلمان الجبوري، حيدر فلاح حسن ودريد عبدالهادي عباس

كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، العراق

### الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بهدف تقييم سلامة البروبوليس المحضر بمفرده وبالتراكيز التالية (10%, 5%, 2.5%, 1%) الوالبروبوليس المؤزر بالمضادات الحيوية ومقارنته مع الحالات المعاملة بالمضادات الحيوية والسيطرة على صحة النعجة والضرع والحليب عند استعماله للحقن داخل الضرع أثناء فترة الحلب في النعاج السليمة، حيث بين فحص السلامة أن استخدام البروبوليس داخل الضرع عبر قناة الحلمة أدى إلى حدوث أعراض جانبية اختفت فيما بعد منها (ارتفاع في عدد الخلايا الجسمية SCC في الحليب، انخفاض في إنتاج الحليب، فترة بقاء الدواء في الحليب، تصلب في نسيج الضرع فضلاً عن التضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية مقارنة بمجموعتي المضادات الحيوية والسيطرة)، مع وجود فروق معنوية مختلفة بين المجاميع عند قياس مكونات الحليب (نسبة الدهن والبروتين وسكر اللاكتوز). كما تم تقييم فاعلية مستحضر البروبوليس بمفرده ومستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية ومقارنته مع مجاميع المضادات الحيوية ومجموعة السيطرة في علاج التهاب الضرع التجريبي المحدث ببكتيريا المكورات العنقودية الذهبية في ضرع النعاج، حيث بعد تأكيد تشخيص 6 عزلات من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* باستخدام Api 20 Staph أخذت هذه العزلات لفحص الحساسية إذ اختيرت عزلة كانت مقاومة لـ 10 من أصل 12 مضاداً حيويًا وتم تحديد جرعة 5 وحدة مكونة للمستعمرة / مل من العالق الجرثومي لإحداث الإصابة تجريبياً داخل الضرع عبر فتحة الحلمة في 25 نعجة سليمة، وبعد ظهور الإصابة خلال 18 – 72 ساعة من الحقن عُولجت النعاج التي أظهرت أعراض مرضية (ارتفاع درجة الحرارة وتغير في التنفس والنبض) بالمضادات الحيوية وخافض الحرارة والأدوية المضادة للالتهاب، كما عُولجت موضعياً داخل الضرع بمستحضر البروبوليس بمفرده بتركيز 1% و 10% (8 نعاج) التي أظهرت أعراض جانبية خفيفة جداً ثم مستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية (4 نعاج) وقورنت بمجموعة المضادات الحيوية (12 نعجة) والسيطرة، إذ أظهرت النتائج حدوث شفاء سريري جهازي في جميع النعاج، أما الشفاء السريري الموضعي فكان متفاوتاً حسب نوع المضاد البكتيري والشركة المنتجة له، ولوحظ عدم حدوث شفاء جرثومي في جميع الحالات المعالجة بالبروبوليس مقارنة بالمجموعة المؤزر بالمضادات الحياتية مما يعرض النعاج إلى خطر معاودة الإصابة بعد أي إجهاد تتعرض له.

### Pharmacological safety and therapeutic efficacy of propolis preparation in experimental mastitis of ewes

K.O.S. Al-Jeburii, H.F. Hassan and D.A. Abaas

College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

#### Abstract

This study for the evaluation safety of uses propolis at (1%, 2.5%, 5%, 10%) concentrations (alone and synergistically with antibiotic) inside the intramammary the lactation period of the healthy ewes, compared with treated and control groups. The result of safety test indicated that the uses of propolis as intramammary infusion inside the teat cause some effects that disappeared later, like elevation of SCC in milk, decrease in milk yield, prolong residue time for propolis, in addition to the hardness in the consistency of the udder and enlargement the supramammary lymph node when compared with treated and control groups. Also there is significant difference between groups in milk composition. The second trial was to evaluate the Pharmacological activity of propolis preparation and synergism preparation and compared it with antibiotic and control groups in treatment of experimentally induced *Staphylococcus aureus* Mastitis in the udder of ewes, after confirmed the diagnosis of *Staphylococcus aureus* strains by Api 20 Staph, one isolate of *Staphylococcus aureus* was selected based on (its resistance to

10 of 12 antibiotic tested). The infected dose 5 cfu/ml of bacterial suspension was selected to experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in 25 ewes. After the appearance of infection 18 -72 hours post inoculation of bacterial suspension of *Staphylococcus aureus* in the udder by intramammary route in ewes, the ewes treated paraenterally by antibiotic, antiinflammatory and antipyretic drug and locally in four groups (propolis 1% and 10%) (8 ewes) which appeared very mild side effects, synergism between propolis and antibiotic (4 ewes), antibiotic (12 ewes) and (1 ewe) as control group. The results showed systemic cure in all ewes but with differences in the local clinical cure between groups according to the type of antibiotic and its company production without bacterial cure in all groups, so that make the ewes under the risk of reinfection under any stress condition.

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

## المقدمة

## المواد وطرق العمل

**التجربة الأولى: تقييم السلامة الدوائية لمستحضر البروبوليس والفعالية التأزرية مع المضادات الحيوية عند استعماله للحقن داخل الضرع السليم أثناء فترة إنتاج الحليب.**

### الحيوانات

أجريت هذه التجربة على 24 نعجة خالية من أي التهاب سريري أو تحت السريري بعد إجراء فحص كاليفورنيا، تم شرائها من منطقة الصقلاوية، وبأعمار 3-4 سنوات وبمعدل أوزان 50 كغم، في بداية مرحلة الإرضاع، قسمت الحيوانات إلى 4 مجاميع وكل مجموعة تحتوي على 4 نعاج ماعدا مجموعة البروبوليس كانت 12 (4 نعاج لكل تركيز)، مع ملاحظة تعويد الحملان بعد ولادة النعاج على أكل العلف الخشن من بداية الأسبوع الثاني وذلك من خلال حزمهم في مكان معزول عن أمهاتهم ويقدم لهم العلف الخشن بصورة مستمرة ويسمح لهم برضاعة أمهاتهم مرتين باليوم ولعدة أيام ثم تطول هذه المدة تدريجياً. بعد 3 أسابيع من الولادة (اليوم الواحد والعشرين بعد الولادة)، فرغ الحليب كلياً وعُقم الضرع وعُوملت المجموعة الأولى المعالجة بمستحضر البروبوليس (P) وبالتركيز التالية (P1=1%, P2=2.5%, P3=5%) ولمدة 3 أيام بجرعة حجمها 5 مل حقن بالضرع كل 12 ساعة.

أما المجموعة الثانية فعوملت بالمضادات الحيوية Antibiotics (AB): أعطيت (Multiject) المجهزة من شركة Noorbrok الإنكليزية والحاوي على خليط من (Procain Streptomycin sulfate، Neomycin Sulfate، Pencillin Synergistic)، المجموعة الثالثة ذات الفعل التأزري لخلصة (S): أعطيت مستحضر الفعل التأزري لخلصة البروبوليس مع المضادات الحيوية، المجموعة الرابعة السيطرة (C) Control: هي مجموعة أعطيت المادة الغذائية والمادة الحاملة فقط، تم إجراء الفحوصات السريرية الروتينية على النعجة والضرع والحليب قبل وبعد المعاملة وحساب عدد الخلايا الجسمية في الحليب من خلال إجراء العد المجهرى المباشر للخلايا الجسمية في عينات الحليب قبل وبعد المعاملة في الفترات (قبل المعاملة 14 يوماً، قبل المعاملة 7 أيام، بعد المعاملة 1 يوم،

بعد مرض التهاب الضرع أحد الأمراض المهمة التي تؤثر في صحة وإنتاجية الأغنام لسعة انتشاره والخسائر الاقتصادية الناجمة عنه (1)، ويمكن تعريفه بأنه التهاب يصيب النسيج الحشوي للغدة اللبنية يتميز بحدوث تغيرات فيزيائية و كيميائية في الحليب، إضافة إلى تغيرات مرضية في أنسجة الغدة (2). تشكل المكورات العنقودية الذهبية الجرثومة الأكثر انتشاراً في حالات التهاب الضرع السريري والتحت السريري في النعاج، وتعتبر المكورات العنقودية الذهبية واحدة من أشد مسببات المرضية خطورة، حيث غالباً ما تقاوم المضادات الحيوية فقد حاول الكثير من الباحثين الاستفادة من البدائل الطبيعية كالبروبوليس (3). البروبوليس (العكبر) هو ناتج طبيعي راتيني صمغي القوام، معدن التركيب، متباين اللون، تجمع شغالات نحل العسل من الأجزاء النامية للأشجار والشجيرات كبراعم الأوراق و قلف الأشجار، وذكر المختصون أنه مزيج من رواتين النباتات و الشمع وحبوب الطلع وإفرازات الغدد اللعابية للنحل، يعد البروبوليس من المنتجات المهمة لخلية النحل، حيث يستخدمه النحل في تضييق مداخل الخلية في فصل الشتاء وفي سد التصدعات وملء الشقوق التي يدخل منها الضوء إلى داخل الخلية ويستخدمه في تحنيط القوارض والحشرات التي يقتلها داخل خلاياه ويصعب عليه أخراجها (4). كما أكد الباحثون فاعلية البروبوليس ضد الجراثيم (5)، والفايروسات (6) والفطريات (7) والطفيليات (8).

وأثبت (9) الفاعلية التأزرية للبروبوليس مع العديد من المضادات الحيوية في الزجاج باستخدام طريقة (Kirby and Bauer) وطريقة تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC Minimum Inhibitory Concentration)، حيث وجدوا أن البروبوليس يزيد من فاعلية المضادات الحيوية ضد نمو المكورات العنقودية الذهبية. أستناد لما سبق ذكره جاء هذا البحث لتقييم السلامة الدوائية لمستحضر البروبوليس عند استعماله للحقن داخل الضرع السليم أثناء فترة إنتاج الحليب تقييم الفعالية العلاجية للبروبوليس لوحده بالإضافة للفعل للتأزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية كعلاج موضعي لالتهاب الضرع المحدث تجريبياً ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية في النعاج.

تم اختبار ثلاثة تراكيز مختلفة للجرعة المصيبة في (3) نعاج مع مراقبة وقت ظهور الأعراض المرضية لالتهاب الضرع وشدة الأعراض للسيطرة عليها وتم اختيار الجرعة 5 وحدة مكونة للمستعمرة / مل.

الجدول رقم (1) الصيغ النهائية لمستحضر البروبوليس التي تم حقنها في ضرع النعاج السليمة.

الصيغة الدوائية	المستحضر
Rx	مستحضر
Propolis Ethanolic Extract 1g	البروبوليس
Polyethylene Glycol 200 add 40 ml	بتركيز 1 %
Glycerine 60 ml	
100 ml	
Rx	مستحضر
Propolis Ethanolic Extract 2.5 g	البروبوليس
Polyethylene Glycol 200 add 40 ml	بتركيز 2.5 %
Glycerine 60 ml	
100 ml	
Rx	مستحضر
Propolis Ethanolic Extract 5 g	البروبوليس
Polyethylene Glycol 200 add 40 ml	بتركيز 5 %
Glycerine 60 ml	
100 ml	
Rx	مستحضر
Propolis Ethanolic Extract 10 g	البروبوليس
Polyethylene Glycol 200 add 40 ml	بتركيز 10 %
Glycerine 60 ml	
100 ml	
Rx	مستحضر الفعل
Propolis Ethanolic Extract 5 g	التأزري
Polyethylene Glycol 200 add 30 ml	للبروبوليس مع
Procaine Pencillin 1 g	المضادات
Streptomycine Sulfate 1 g	الحويوية
Neomycine Sulfate 1 g	
Mythylprednisolone 100 mg	
Polyethylene Glycol 200 add 30 ml	
Glycerine 40 ml	
100 ml	
Rx	مستحضر
Polyethelene Glycol 200 40 ml	السيطرة
Glycerine 60 ml	
100 ml	

#### تحضير تراكيز مستحضر البروبوليس

تم تحضير 100 مل من مستحضر البروبوليس بنفس التراكيز التي استخدمت في فحص السلامة الدوائية وهي (1%, 2.5%, 5%, 10%)، أذيب (1, 2.5, 5, 10) غم على التوالي من خلاصة البروبوليس في المادة المذيبة Polyethylene glycol 200 ليكمل الحجم إلى 40 مل وبعد الإذابة الجيدة تم ترشيحه من خلال

بعد المعاملة 7 أيام، بعد المعاملة 14 يوماً)، كذلك تم حساب أنتاج الحليب للشطر المراد فحصه في الفترات أعلاه، كما تم حساب مكونات الحليب (دهن والبروتين واللاكتوز) باستخدام جهاز الـ Milkscope في كلية الزراعة / جامعة بغداد في الفترات المذكورة أعلاه، وقد أجري زرع لعينات الحليب (اكار الدم، اكار المكونكي، الماننول) قبل وبعد المعاملة (10).

#### تحضير مستحضر البروبوليس الأيثانولي

تم شراء 1 كغم من مادة البروبوليس الخام من معشب الأمين في العامرية ببغداد، حيث جمع من مناطق حول الرضوانية في محافظة بغداد، ونظفت من الأتربة وقطع الخشب العالقة بها، ثم وضعت بالمجمدة لعدة ساعات بعدها طحنت باستعمال مطحنة كهربائية حتى أصبح بهيئة مسحوق، ثم حفظت في عبوات نظيفة ومعتمة ومحكمة الغلق في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال (11) مزج مسحوق البروبوليس مع الكحول الإيثيلي ذو التركيز 70% بنسبة 9:1 في درجة حرارة الغرفة وهي المفضلة، بعد ذلك عُذّل الأس الهيدروجيني من 5 إلى 6.4 (12)، وباستعمال المازج المغناطيسي كان يرج يومياً لعدة مرات ولمدة عشرة أيام، ثم رُشح المزيج باستعمال قطعة من القماش، ثم باستخدام ورقة ترشيح من نوع (Whatman No. 1)، ثم تم أحداث التصفية الباردة Cold Filtration وذلك بوضع الراشح في درجة حرارة - 20 م° ولمدة 24 ساعة تقريباً ثم ترشيحه باستخدام ورقة ترشيح من نوع (Whatman No. 50) للتخلص من المواد الشمعية التي ادت الى اعراض جانبية كما في الشكل (1) بحيث، بعد ذلك تمت تصفيته باستخدام المرشحات ذات الثقوب الدقيقة 0.2 مايكروميتر (Milipore Filter Syringe 0.2 µm)، ثم أزيل المذيب من خلال تخثيره وذلك بوضعه في أطباق زجاجية في الفرن الكهربائي بدرجة 70 م° ويجب مراقبته جيداً، وبذلك تم الحصول على خلاصة البروبوليس الخالية من الكحول ( Propolis Ethanol Extract PEE)، ثم وزنت وحفظت في عبوات زجاجية نظيفة ومعتمة ومعقمة في التلاجة بدرجة 4 م° لحين الاستعمال (13). وتم تحضير الصيغ النهائية وبالتراكيز الثلاثة للحقن داخل الضرع Intramammary Infusion: كما في الجدول (1).

التجربة الثانية: تقييم الفعالية الدوائية لمستحضر البروبوليس في علاج التهاب الضرع المحدث تجريبياً ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية في النعاج.

#### الحيوانات

أجريت هذه التجربة على الشطر الثاني (المقابل) في النعاج التي استخدمت لتقييم السلامة الدوائية بعد التأكد من خلوها من أي إصابة بكتيرية أو فطرية من خلال الزرع البكتيري الذي أجري على عينات الحليب المأخوذة منها، حيث تم حقن المكورات العنقودية بعد تحديد الجرعة المصيبة في الزجاج أولاً وباستعمال طريقة (Miles and Misra Method) Drop Plate Method (14).

وذلك نتيجة لوجود الشمع Wax في خلاصة البروبوليس وهذا يتفق مع ما وجدته (18) والذي اشار الى مراعاة حجم الجزيئات Particle Size والخواص الميكانيكية للدواء Mechanical Properties عند تحضير الأدوية للإعطاء داخل الضرع Intramammary infusion، اذ أن الزيادة في حجم الجزيئات يؤدي إلى تحريش في نسيج الضرع والذي قد يؤدي إلى حدوث فعل عكسي An adverse effect وعدم تثبت الدواء داخل الضرع dispersion of a drug مما يتسبب عنه تكتل و/ أو تجمع للجزيئات. ولوحظ أن استخلاص البروبوليس بالطريقة المذكورة مع تحسين القابلية الذوبانية من خلال (تعديل الأس الهيدروجيني وتصفية المبردة للخلاصة عبر ورقة الترشيح ثم عبر المرشحات ذات الثقوب الدقيقة 0.2 µm للتخلص من الشمع)، أدى إلى تحسين في الأعراض الجانبية على الضرع كما في الشكل (2). لوحظ عند تحضير مستحضر البروبوليس ومستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية وإن شكل المستحضر المتكون هو عبارة عن محلول سميك Thick solution وهذا يتفق مع ما ذكر في (10) في إن أشكال مستحضرات العلاج داخل الضرع عبر فتحة الحلمة. يعزى اختيار البولي أثيلين كليكول Polyethylene Glycol 200 مذيباً لخالصة البروبوليس كان الوحيد من بين المذيبات العضوية الأخرى يتصف بكونه أمين ولا يحدث تحريش للضرع ويستعمل بكثرة في المستحضرات المستخدمة داخل الضرع (1)، فضلاً عن وزنه الجزيئي القليل الذي يمكنه من العبور خلال المرشحات الدقيقة Millipore Filter Syringe وبالتالي إمكانية تعقيمه بعد مزجه بالبروبوليس، واستعمل الغليسرين Glycerin كمادة حاملة Vehicle لكي يعطي لزوجة للمزيج، بالإضافة إلى كونه شائع الاستعمال في أدوية التهاب الضرع و رخيص الثمن، فضلاً عن الخواص التي يمتاز بها كونها مادة حافظة Preservative وموازنة Stabilizer (15)، كذلك أشار (19) إلى أن المستحضرات المعطاة داخل الضرع Intramammary Infusion غالباً ما تحتوي على سواغ من مواد مضادة للالتهاب ومواد مضادة للأكسدة ومواد حافظة، ولم يتم إضافة هذه المواد وذلك لما يمتلكه البروبوليس من فعل مضاد للالتهاب وفعل مضاد للأكسدة وفعل وقائي وهذا ما أكدته الكثير من الباحثين (20,21) تم تعقيم المستحضر على مرحلتين : الأولى هي تعقيم خلاصة البروبوليس مع المذيب وذلك باستخدام طريقة الترشيح من خلال المرشحات ذات الثقوب الدقيقة 0.2 مايكروميتر، والمرحلة الثانية هي تعقيم المادة الحاملة الكليسيرين باستخدام الحرارة الجافة Dry Heat وذلك بوضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 150 C° لمدة ساعة (16) وبعد ذلك تم مزجهما في عبوة معقمة.

المرشحات ذات الثقوب الدقيقة Milipore filters No. 0.20 µm وبذلك يتم التعقيم و التخلص من الجزيئات الكبيرة (15). ثم كمل الحجم إلى 100 مل بإضافة الكليسيرين glycerin المعقم داخل الفرن بدرجة حرارة 150 م° ولمدة ساعة، حيث وضع المزيج في عبوة زجاجية معقمة ومحكمة الغلق. ولتحضير 100 مل من مستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية فقد حضر بإذابة نصف تركيز مستحضر البروبوليس 10 % أي 5 % وبذلك أذيب 5 غم (من البروبوليس في مادة Polyethylene glycol 200) ليكمل الحجم إلى 30 مل ثم تم تعقيمه بالترشيح عبر المرشحات ذات الثقوب الدقيقة 0.2 µm، في حين أخذ نصف تركيز مكونات مستحضر الـ Multiject المجهر من شركة Norbrook المصنع في أيرلندا الشمالية، حيث أذيب 1 غم من كل من (Procaine pencillin و Streptomycine sulfate و Neomycine sulfate) و 100 ملغم من (Mythylprednisolone) في المادة المذيبة Polyethylene glycol 200 ليكمل الحجم إلى 30 مل، ثم مزج الخليطين وأضيف إلى 40 مل من Glycerin المعقم بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة (150 م°) لمدة ساعة. أما عند تحضير 100 مل من مستحضر السيطرة، فقد تم مزج 40 مل من المادة المذيبة Polyethylene glycol 200 المعقمة بالترشيح عبر المرشحات ذات الثقوب الدقيقة 0.2 µm و 60 مل من المادة الحاملة الغليسرين Glycerin المعقم بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة (150 م°) لمدة ساعة (16). أستخدمت هذه المواد في كلا التجريبتين لتقييم السلامة الدوائية واختبار القابلية العلاجية لمستحضر البروبوليس ومستحضر الفاعلية التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية عند استخدامه داخل الضرع عبر قناة الحلمة ومقارنته بالمضادات الحيوية ومجموعة السيطرة.

## النتائج والمناقشة

أن استخدام الصيغ الدوائية لخالصة البروبوليس والتي استخلصت بدون تحسين القابلية الذوبانية أدت إلى حدوث أعراض جانبية موضعية في الضرع امتازت بتورم الضرع مع حدوث تصلب في نسيج الضرع وألم للشطر وأحياناً عرج في المشي من شدة الألم و الجس باليد أظهر كتلة دوائية غير متمصة بالنسيج وعند الحلب لوحظ خروج خثر شمعية من المادة الدوائية اذ تخرج بصعوبة مسببة ألماً عند خروجها، مما نتج عنه فشل الصيغ المحضرة الشكل (1).

وقد يعود ذلك ٥٦ إلى أن خلاصة البروبوليس قد تفاعلت مع مكونات الحليب مكونة مركب أكثر تعقيداً مما يؤدي إلى تكتله داخل الضرع وهذا يتفق مع (17)، لذلك فقد تم مزج مستحضر خلاصة البروبوليس مع حليب النعاج (حليب طبيعي وحليب ملتهب) في المختبر وبكميات متساوية ووضع في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° (نفس درجة حرارة داخل الضرع) وكانت النتيجة عدم حدوث أي تكتل للحليب مع البروبوليس وبالتالي استبعاد هذا السبب، وقد يفسر أن حجم الجزيئات كان كبيراً جداً

بالمضادات الحيوية قد يعزى لاحتواء المرهم على السواغ ذو الوجه الدهني Lipophilic Drug والذي أدى بدوره إلى ارتفاع الدهن في الحليب. ولوحظ تأثير المعاملات على نسبة بروتين الحليب ويبين الجدول (3) تأثير المعاملات على نسبة البروتين في حليب النعاج ضمن الفترات الزمنية أعلاه، وتشير النتائج إلى حدوث هبوط معنوي بمستوى ٥% في نسبة بروتين الحليب في الأسبوع الأول والثاني بعد المعاملة في جميع المعاملات، في حين حدث انخفاض معنوي في مجموعة الفعل التآزري و مجموعة المضادات الحيوية في الفترة (بعد 21 يوماً) من المعاملة. أما تأثير المعاملات على نسبة سكر اللاكتوز في الحليب كما في الجدول (4) كما أشارت النتائج إلى حدوث انخفاض معنوي في نسبة سكر اللاكتوز بالحليب في جميع المجاميع (بعد ٧ أيام من المعاملة)، ثم حدث ارتفاع معنوي في نسبة سكر اللاكتوز في الفترة (بعد 14 يوماً من المعاملة) مع تفوق معنوي لمجموعة المضادات الحيوية على باقي المجاميع، أما بعد 21 يوماً من المعاملة حدث انخفاض معنوي في سكر اللاكتوز في مجموعة المضادات الحيوية مقارنة بباقي المعاملات.

كما لوحظ ارتفاع معنوي كبير في عدد الخلايا الجسمية في حليب المجاميع (بعد المعاملة يوماً واحداً) مع حدوث ارتفاع معنوي في جميع المجموعة على مجموعة الحيوانات المعاملة بالمضادات الحيوية التي لم يرتفع فيها عدد الخلايا الجسمية كثيراً، ثم حدث هبوط معنوي في عدد الخلايا الجسمية في جميع المجاميع في المدينتين اللاحقتين مع تفوق معنوي للمجاميع على المجموعة المعالجة بالمضادات الحيوية ثم مجموعة السيطرة على التوالي والتي أنخفض فيها أكثر من باقي المجاميع، وهذا قد يعود إلى السواغ الحاوي على مواد مضادة للالتهاب لتقليل تحسس الضرع للمواد الغريبة الداخلة فيه (19). إذ يعتبر عدد الخلايا الجسمية في الحليب كمؤشر على حدوث تحسس أو تخريش Irritation في نسيج الضرع للصبغ الدوائية المحضرة (10)، وإن الارتفاع في عدد الخلايا الجسمية في حليب شطر الضرع المعامل بالبروبوليس والتي تناسبت طردياً مع الزيادة في تركيزه هو نتيجة احتوائه على بعض المركبات التي أثارت تحسساً في نسيج الضرع إضافة إلى أن فاعلية المواد المضادة للالتهاب Anti-inflammatory الموجودة طبيعياً في البروبوليس هي أقل من فاعلية predinslone الموجود في أدوية الحقن لمجموعة الحيوانات المعالجة وهذا يتفق مع (18).

أشارت النتائج إلى حدوث انخفاض معنوي في إنتاج الحليب في حيوانات المجاميع في المدة بعد ٧ أيام من المعاملة ماعداً حيوانات المجموعة المعالجة بالمضادات الحيوية و مجموعة السيطرة، مع استمرار الانخفاض في إنتاج الحليب في هذه المجاميع بعد ١٤ يوماً من العلاج، ثم عاد الإنتاج إلى مستوياته بعد ٢١ يوماً من الإعطاء ويعزى هذا الانخفاض في إنتاج الحليب في شطر الضرع المعامل بمجموعة البروبوليس والفعل التآزري إلى التصلب في نسيج الضرع الناجم عن تحسس الضرع للمستخلصات.



شكل (١) ظهور خثر شمعية في الحليب نتيجة تحضير مستحضرات من البروبوليس استخلصت بالطرائق القديمة.



شكل (٢) التحسن في الأعراض الجانبية للضرع بعد إجراء استخلاص للبروبوليس مع التحسين في القابلية الذوبانية من خلال التخلص من الشمع وتعديل الأس الهيدروجيني.

#### تأثير المعاملات على مكونات الحليب

تم التأكد من تأثير المعاملات على نسبة الدهن في الحليب كما موضح في الجدول (2) تأثير معاملة أحد شطري ضرع النعاج المحقون بمستحضر البروبوليس والفعل التآزري بين البروبوليس والمضادات الحيوية ومقارنته بمجموعة المضادات الحيوية و مجموعة السيطرة الحاوية على المادة الحاملة والمادة المذيبة فقط. في فترات زمنية (قبل المعاملة، بعد 7 أيام، بعد 14 يوم، بعد 21 يوماً من المعاملة)، حيث أشارت النتائج إلى حدوث ارتفاع معنوي بمستوى 1% في نسبة الدهن في حليب النعاج المعامل بالمضادات الحيوية في الفترة (بعد 7 أيام وبعد 14 يوماً من المعاملة)، في حين لم يحدث أي تغير معنوي بمستوى 1% في باقي المجاميع. أن حدوث ارتفاع في دهن حليب النعاج المعاملة

الجدول (2) التغيرات في نسب الدهون في حليب النعاج المعالجة بأنواع مختلفة من المستحضرات الدوائية.

المعاملة	الفترة			
	قبل المعاملة	بعد ٧ أيام من المعاملة	بعد ١٤ يوماً من المعاملة	بعد ٢١ يوماً من المعاملة
P1	٠,٠٨ ± ٦,٨٢ a A	٠,٠٧ ± ٦,٤٠ b A	٠,٠٤ ± ٥,٧٥ b A	٠,٢٦ ± ٦,٢٩ a A
P2	٠,٠١ ± ٦,٨٩ a A	٠,٠٦ ± ٦,٣٨ b A	٠,٠٢ ± ٥,٨٧ b A	٠,٠٦ ± ٦,٦٢ a A
P3	٠,٠٠٦ ± ٦,٨٩ a A	٠,٠٤ ± ٦,٤٧ b A	٠,٢١ ± ٦,١٢ b A	٠,٠٨ ± ٦,٦٣ a A
AB	٠,١٠ ± ٦,٧٧ a C	٠,١١ ± ١٠,٢١ a A	٠,١٠ ± ٨,٠١ a B	٠,١١ ± ٥,١٤ a C
S	٠,٠٠٨ ± ٦,٩٠ a A	٠,٠٦ ± ٦,٣٧ b A	٠,٠٣ ± ٦,٤٧ b A	٠,٠٣ ± ٦,٥٧ a A
C	٠,٠٩ ± ٦,٧٩ a A	٠,٠٩ ± ٦,٦١ b A	٠,١٠ ± ٦,٥٩ b A	٠,٠٩ ± ٦,٥٩ a A

الجدول (3) التغيرات في نسب البروتين في حليب النعاج المعالجة بأنواع مختلفة من المستحضرات الدوائية.

المعاملة	الفترة			
	قبل المعاملة	بعد ٧ أيام من المعاملة	بعد ١٤ يوماً من المعاملة	بعد ٢١ يوماً من المعاملة
P1	٠,٠٠٢ ± ٥,٠٦ a A	٠,٠٤ ± ٤,٨٣ a B	٠,٠٢ ± ٤,٨٢ a B	٠,٠٢ ± ٥,١٢ a A
P2	٠,٠١ ± ٥,٠٦ a A	٠,٠٣ ± ٤,٨٣ a B	٠,٠٦ ± ٤,٨٦ a B	٠,٠١ ± ٥,١٠ a A
P3	٠,٠٠٥ ± ٥,٠٦ a A	٠,٠٣ ± ٤,٨٩ a B	٠,٠٣ ± ٤,٩٢ a B	٠,٠٠٤ ± ٥,١٣ a A
AB	٠,٠٠٤ ± ٥,٠٦ a A	٠,٠٧ ± ٤,٤٦ a B	٠,٠٤ ± ٤,٧٢ a B	٠,٠٢ ± ٤,٨٧ b B
S	٠,٠٠٤ ± ٥,٠٦ a A	٠,٠٢ ± ٤,٨٤ a B	٠,٠١ ± ٤,٨٤ a B	٠,٠١ ± ٤,٨٨ b B
C	٠,٠٠٤ ± ٥,٠٧ a A	٠,٠٢ ± ٤,٩٠ a B	٠,٠١ ± ٤,٩٨ a AB	٠,٠٠٨ ± ٥,٠٣ a A

الجدول (4) تأثير الحقن بالضرع بمستخلص البروبوليس بنسب مختلفة على سكر اللاكتوز في حليب النعاج.

المعاملة	الفترة			
	قبل المعاملة	بعد ٧ أيام من المعاملة	بعد ١٤ يوماً من المعاملة	بعد ٢١ يوماً من المعاملة
P1	٠,٠١ ± ٥,٠٩ a A	٠,٠٢ ± ٤,٨٨ a B	٠,٠٦ ± ٥,٠٧ b A	٠,٠٢ ± ٤,٩٩ a AB
P2	٠,٠٠٤ ± ٥,٠٧ a A	٠,٠٠٢ ± ٤,٨٨ a B	٠,٠٢ ± ٤,٩٨ bc AB	٠,٠١ ± ٥,٠٤ a A
P3	٠,٠٠٢ ± ٥,٠٧ a A	٠,٠١ ± ٤,٨٩ a B	٠,٠٢ ± ٤,٩٦ c AB	٠,٠٠٢ ± ٥,٠١ a A
AB	٠,٠٠٧ ± ٥,٠٨ a B	٠,٠٢ ± ٤,٣٦ a D	٠,٠٤ ± ٥,٢٢ a A	٠,٠٢ ± ٤,٨٧ b C
S	٠,٠٠٢ ± ٥,٠٧ a A	٠,٠١ ± ٤,٩٠ a B	٠,٠٣ ± ٤,٩٦ c B	٠,٠٢ ± ٤,٩٨ ab AB
C	٠,٠٠٢ ± ٥,٠٧ a A	٠,٠٨ ± ٤,٩١ a B	٠,٠٠٤ ± ٥,٠٧ b A	٠,٠٠٢ ± ٥,٠٦ a A

الجدول (5) تأثير إضافة المعاملات على عدد الخلايا الجسمية SCC مقياساً بوحدة (خلية جسمية / مل من الحليب) في حليب النعاج في فترات زمنية مختلفة.

المعاملة	الفترة			
	قبل المعاملة ١٤ يوم	قبل المعاملة ٧ أيام	بعد المعاملة ١ يوم	بعد المعاملة ٧ أيام
P1	٠,٦٠ ± ١١,١١ a C	١,٠٩ ± ١٠,٥٩ a C	٠,٥٤ ± ١٧,٦٣ a A	٠,٥٧ ± ١٥,٥٨ a B
P2	٠,٢١ ± ١١,٣٠ a C	٠,٣٤ ± ١٠,٥٣ a C	٠,٠٧ ± ١٧,٨٣ a A	٠,٣١ ± ١٥,٢٤ a B
P3	١,٠٩ ± ١٠,٥٩ a C	٠,١٦ ± ١٠,٨٦ a C	٠,٠٩ ± ١٨,٠٦ a A	٠,١٩ ± ١٥,٣٢ a B
AB	٠,٣٣ ± ١٠,٧٠ a B	٠,٣٧ ± ١٠,٣٩ a B	٠,٥٨ ± ١٣,٢٩ b A	٠,٨٣ ± ١١,٩٦ b AB
S	٠,٤٣ ± ١١,٠٩ a C	٠,٢٠ ± ١٠,٥٥ a C	٠,١٨ ± ١٧,٦١ a A	٠,٢٩ ± ١٣,٨٢ a B
C	٠,٣٣ ± ١١,٠٩ a C	٠,١٦ ± ١٠,٦٣ a C	٠,٣٥ ± ١٦,٦١ a A	٠,٥٢ ± ١٣,٥٣ a B

الجدول (6) تأثير إضافة المعاملات على إنتاج الحليب مقياساً بوحدة (غم) للنعاج في فترات زمنية مختلفة.

المعاملة	الفترة			
	قبل المعاملة ٧ أيام	قبل المعاملة ٧ أيام	بعد المعاملة ٧ أيام	بعد المعاملة ١٤ يوماً
P1	٥٤,٠٥ ± ٣٧٦,٢٥ a A	٥٤,٠٠ ± ٣٦٠,٠٠ a A	٥,٤٠ ± ٤٠,٠٠ b C	١٥,٠٥ ± ١٤١,٢٥ b B
P2	١٨,٨٧ ± ٣٠٧,٥٠ a A	١٧,٩٦ ± ٣٠٢,٥٠ a A	١,٤٤ ± ٢٢,٥٠ b C	٤,٧٨ ± ١٢٧,٥٠ b B
P3	١٧,٠١ ± ٢٨٢,٥٠ a A	٢٠,٥٦ ± ٢٧٢,٥٠ a A	٣,١٤ ± ٢٦,٢٥ b C	٧,٠٧ ± ١١٠,٠٠ b B
AB	٢٩,٢٥ ± ٣٧٦,٢٥ a A	٣٠,١٠ ± ٣٥٢,٥٠ a A	٣٥,٠٠ ± ٣١٥,٠٠ a B	٣٥,٠٠ ± ٣١٥,٠٠ a A
S	٢٨,٨٩ ± ٣٤١,٢٥ a A	٢٨,٦٨ ± ٣٢٢,٥٠ a A	٦,٤٥ ± ٣٥,٠٠ b C	٦,٤٥ ± ١٢٥,٠٠ b B
C	٥٥,٦٩ ± ٣٢١,٢٥ a A	٦٠,٢٠ ± ٢٩٥,٠٠ a A	٥٤,٤٢ ± ٢٨٠,٠٠ a A	٤٧,٠٩ ± ٢٦١,٢٥ a A

حين أستمر معدل مدة التصلب في نسيج الضرع في مجموعة المعاملة بالبروبولس بتركيز ١% إلى ٧ أيام، بينما كان معدل انتهاء مدة التصلب في نسيج الضرع في مجموعة المعاملة بمستحضر الفعل التآزري للبروبولس مع المضادات الحيوية إلى ٦ يوم، في حين لم يحدث أي تصلب لنسيج الضرع في مجموعة المعاملة بالمضادات الحيوية ومجموعة السيطرة الجدول (٧)، وأن حدوث التصلب في نسيج الضرع قد يعزى إلى احتواء البروبولس على بعض المركبات التي أثارت تحسناً في نسيج الضرع مما أدى إلى التهابه وتصلبه، بينما يعزى سبب قلة معدل

تبيين نتائج الفحص السريري الروتيني للنعاج عدم حدوث أي تغييرات جهازية على النعاج كارتفاع درجة الحرارة والنبض والتنفس في النعاج المعالجة، وأشارت نتائج فحص الضرع إلى عدم حدوث تورم أو احمرار أو سخونة، ولكن لوحظ إن جس الضرع باليد أظهر تصلب في نسيج الضرع اختلف فيما بعد في مجاميع المعاملة بالبروبولس بتركيز ١% و ٢,٥% و ٥% ومستحضر الفعل التآزري للبروبولس مع المضادات الحيوية، إذ أستمر التصلب في نسيج الضرع لمدة طويلة و بمعدل أكثر من ٧ أيام في مجموعة المعاملة بالبروبولس بتركيز ٢,٥% و ٥%، في

السماح لحملاتها برضاعة الشطر المعامل اذ أستمر الألم إلى سبعة وثمانية أيام في هذه المجاميع وقد يرجع حدوث الألم في هذه المجاميع إلى التهاب الناجم عن وجود بعض المركبات الكيميائية في التركيب الكيميائي للبروبوليس والتي أثارت تحسناً في نسيج الضرع. من خلال الجدول (٧) نلاحظ حدوث تلون للحليب باللون الوردي اختفى فيما بعد في مجموعة النعاج المعالجة بمستحضر البروبوليس لوحدهً بالتراكيز ١%، ٢,٥%، ٥% وبمستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية، يعزى اللون الوردي إلى وجود البروبوليس في الحليب، اذ أشارت النتائج إلى حدوث ارتفاع معنوي في طول مدة بقاء اللون الوردي في الحليب عند المعاملة بالبروبوليس بالتراكيزين ٢,٥% و ٥%، اذ أستمر اللون الوردي إلى أكثر من ١٥ يوماً مقارنةً بالمجموعة المعاملة بالبروبوليس بتراكيز ١% والذي أستمر اللون الوردي فيها إلى ١٣ يوماً، ثم تلاه المجموعة المعاملة بالفعل التآزري والذي أستمر اللون الوردي فيها إلى ١٠ أيام، وهذه المدد طويلة مقارنةً بفترة بقاء الدواء في مجموعة المعاملة بالمضادات الحيوية والتي أعتمد فيها على تعليمات الشركة المجهزة (Norbrook الأيرلندية) والمتمثلة بثلاث أيام علاج وثلاث أيام لبقايا الدواء بعد العلاج لذلك فان مدة انتهاء بقايا الدواء هي سبعة أيام بعد العلاج، في حين تعذر رؤية ومتابعة مستحضر السيطرة وذلك للون الشفاف لمادة الغليسرين ومادة البولي أنيلين.

أما نتائج تقييم الفعالية العلاجية لمستحضر البروبوليس في علاج التهاب الضرع المحدث تجريبياً في النعاج السليمة فقد تم إجراء فحص الحساسية لست عزلات من المكورات العنقودية الذهبية في التراكيز الثلاثة والمستخدم في فحص السلامة الدوائية على الزجاج ويظهر الجدول (٨) أقطار التنشيط للنمو الجرثومي وكذلك الصورة تظهر الفعالية العالية لخالصة البروبوليس تركيز ١٠% تجاه بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في المختبر باستخدام طريقة الأنتشار بالحفر كما في الجدول (٨) والشكل (٣).

مدة التصلب في نسيج الضرع بمجموعة الفعل التآزري مقارنةً بمجموعة المعاملة بالبروبوليس لاحتوائه على مضاد الالتهاب Predinsolone الذي قلل من مدة التصلب في نسيج الضرع، في حين سبب عدم حدوث تصلب في نسيج الضرع في مجموعة المضادات الحيوية هو عدم احتواء المضادات الحيوية على مواد تؤدي إلى تحسس في نسيج الضرع ونفس الشيء بالنسبة لمجموعة السيطرة. وأشارت النتائج إلى حدوث تضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية في مجاميع الحيوانات المعالجة بالبروبوليس بتراكيز ١% و ٢,٥% و ٥% ومستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية، في حين لم يحدث أي تضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية عند المعاملة بالمضادات الحيوية والمعاملة بالسيطرة، اذ كان هناك ارتفاع معنوي في طول مدة التضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية في مجموعة المعاملة بالبروبوليس بالتراكيز ٢,٥% و ٥% ولمدة ٣ أيام بينما أستمر التضخم بمعدل ٣ يوم في المعاملة بالبروبوليس بتراكيز ١%، بينما كان معدل انتهاء مدة تضخم الغدة اللمفية فوق الثديية ٣ يوم في مجموعة المعاملة بمستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية الجدول (٧) وقد يرجع حدوث التصلب في الغدة اللمفية فوق الثديية إلى احتواء البروبوليس على بعض المركبات الكيميائية التي أثارت تحسناً في النسيج مما أدى إلى تضخم الغدة اللمفية فوق الثديية والتهابها، في حين عدم حدوث تضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية في مجاميع المعاملة بالمضادات الحيوية والسيطرة يعود إلى عدم احتواء أو المادة الحاملة الكسيريين والمادة المذيبة Polyethylene Glycol 200 على أي مادة مخرشة أو مهيجة لتفاعل التهابي. كما لوحظ حدوث ألم في نسيج الضرع اختفى فيما بعد عند المعاملة بمستحضر البروبوليس بتراكيز ١% و ٢,٥% و ٥% وبمستحضر الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية مقارنةً بمجموعة المعاملة بالمضادات الحيوية Multiject ومجموعة السيطرة التي لم يحدث فيها أي ألم في نسيج الضرع، اذ أستدل على الألم من خلال ردة الفعل التي تبديها النعجة عند حلبها أو أثناء إرضاع صغارها والتي تتمثل في الرفس والحركة بالإضافة إلى رفض

الجدول (7) تأثير المعاملات على بقايا الدواء في الحليب والتأثير على نسيج الضرع أثناء الجس باليد وعلى الغدة اللمفية فوق الثديية والألم.

المعاملة	بقايا المعاملة	التصلب في نسيج الضرع	تضخم الغدة اللمفية فوق الثديية	الألم
P1	b ٠,٤٠ ± ١٣,٠٠	ab ٠,٤ ± ٧,٠٠	a ٠,٣٨ ± ٢,٥٠	a ٠,٢٨ ± ٧,٥٠
P2	a ٠,٢٨ ± ١٥,٥٠	a ٠,٢٥ ± ٧,٢٥	a .. ± ٣,٠٠	a ... ± ٨,٠٠
P3	a ٠,٢٥ ± ١٥,٧٥	a ٠,٢٥ ± ٧,٧٥	a .. ± ٣,٠٠	a ٠,٢٥ ± ٧,٧٥
AB	d ... ± ٧,٠٠	c ٠	b ٠	b ٠
S	c ٠,٢٥ ± ١٠,٧٥	b ٠,٢٥ ± ٥,٧٥	a ٠,٢٥ ± ٢,٧٥	a ٠,٢٥ ± ٧,٧٥
C	....	c ٠	b ٠	b ٠



في ملمس نسيج الضرع، تضخم في وريد الحليب، تضخم في الغدة اللمفية فوق الثديية) و الحليب أمتاز بقوامه المائي وذو لون أبيض، مع ظهور النمو جرثومي في العينات الحليب للأشطر المصابة فقط.



الشكل (٣) الفاعلية العالية لخلاصة البروبوليس بتركيز ١٠% تجاه بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية في المختبر باستخدام طريقة الانتشار بالحفر، بينما يمثل التثبيط في الحفر إلى اليمين واليسار فاعلية مزيج المادة الحاملة Glycerin والمادة المذيبة Polyethylene Glycol 200 فقط.

الجدول (٩) النسبة المئوية لمقاومة ٦ عزلات من بكتيريا Staphylococcus aureus لـ ١٢ مضاداً حيوياً.

نسبة المقاومة له	عدد العزلات المقاومة لكل مضاد	رمزه	أسم المضاد الحيوي
١٠٠%	٦	Amp	Ampicillin
١٠٠%	٦	P	Pencilline G
٨٣,٣٣%	٥	L	Lincomycin
٦٦,٦٦%	٤	T	Oxytetracycline
٥٠,٥٥%	٣	C	Chloramphenicol
٣٣,٣٣%	٢	K	Kanamycin
٣٣,٣٣%	٢	Te	Tetracycline
٣٣,٣٣%	٢	N	Neomycin
١٦,٦٦%	١	S	Streptomycin
١٦,٦٦%	١	E	Erythromycin
٠%	٠	Gn	Gentamycin
٠%	٠	CIP	Ciproflaxacin

الجدول (٨) التغيرات في أقطار تثبيط النمو بالملم للمكورات العنقودية باستخدام تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للبروبوليس في الزجاج.

التركيز	أقطار تثبيط النمو بالملم ± الخطأ القياسي
١٠ مغ / مل	٠,٢ ± ٩,٨٦
٢٥ مغ / مل	٠,٢ ± ١٢,٣
٥٠ مغ / مل	٠,٣ ± ١٣,٧٢
٧٥ مغ / مل	٠,٤ ± ١٨,٠٥
١٠٠ مغ / مل	٠,٣ ± ٢٠,٤

وتتفق هذه النتائج مع ما ورد في العديد من الدراسات التي أشارت إلى إن لخلاصة البروبوليس فعل مثبط ضد نمو المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من عينات حليب الأبقار (30) و (26) والذي يعود إلى كونه مضاد بكتيري قوي نتيجة احتوائه على العديد من المواد الفعالة (31) في حين أثبتت هذه التجربة فاعلية البروبوليس المضادة لجرثومة المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حليب الأغنام في الزجاج. واتفقت هذه النتائج مع ما أكده (٢٥) ما لهذه المادة من تأثير مثبط لنمو المكورات العنقودية الذهبية باستخدام طريقة الانتشار بالحفر عند استعمال تراكيز متدرجة من (١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، ٦٠، ٧٠، ٨٠، ٩٠، ١٠٠) مغ / مل إذ أظهرت معدلات أقطار تثبيط النمو ضد بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (٨ ± ٠,٣، ٩,٧ ± ٠,٢، ١١,٥ ± ٠,٣، ١٢,١ ± ٠,٥، ١٣,٠ ± ٠,٦، ١٤,٨ ± ٠,٢، ١٦,٦ ± ٠,٢، ١٧,١ ± ٠,٢، ١٧,٥ ± ٠,٣، ١٧,٦ ± ٠,٤) ملم على التوالي في حين لم تتفق نتائجنا مع (٢٤) إذ ذكر أن تركيزاً مقداره ٥ مغ / مل من الخلاصة الكحولية للبروبوليس العراقي والهيكاري أحدث تثبيطاً لنمو بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *E. coli*، *Klebsiela pneumonia* بمعدلات أقطار تثبيط (٣، ٢٢، ٢٢,٥)، (٢١,٣، ٢٠)، (١٩,٣، ٢٠,٣) ملم على التوالي حيث أن هذا التركيز قليل مقارنة بهذه الدراسة والدراسة التي أجراها (25).

وبعد إجراء فحص الحساسية لـ ٦ عزلات من بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، تم انتخاب العزلة الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية إذ كانت مقاومة لـ ١٠ من أصل ١٢ مضاداً حيوياً وكما مبين في الجدول (٩).

تم اختبار أكثر من جرعة مصيبة (١ x ١٠، ١ x ١٠، ٥) وحدة مكونة للمستعمرة فتم اختيار الجرعة ٥ وحدة مكونة للمستعمرة / مل كجرعة مصيبة أظهرت اعراض مسيطر عليها بعد (١٨-٧٢) ساعة من الحقن حيث كانت مصحوبة بارتفاع في (درجات الحرارة بمعدل ٤١,٣ ± ٠,١٣) و في عدد ضربات القلب بمعدل ١٠٣,٩ ± ١,٨ ضربة / بالدقيقة وفي سرعة التنفس بمعدل ٣٠ ± ٠,٣٦ مرة / بالدقيقة، فقدان الشهية (ماعداً نعجتين) و خمول و رفض المشي مع عرج من الجانب المصاب، أما الضرع فقد لوحظت عليه (تورم، سخونة، احمرار، تصلب،

جدول (١٠) نتائج الشفاء السريري لأشطر النعاج المعالجة بعد أسبوع و بعد أسبوعين من ظهور الإصابة.

العلامات												المجموع					
علامات على الحليب						علامات على الصرع											
اللون	أسبوع	أسبوعين	القوام	أسبوع	أسبوعين	اصمرار	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	تصلب	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	تورم	عدد النعاج	الفترة بعد ظهور الإصابة
	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	أسبوع	أسبوعين	
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	4	P1
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	4	P1
مدمم	وردي	مائي	ثخين	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	4	P1
مدمم	وردي	مائي	ثخين	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	4	P1
وردي	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	4	P2
وردي	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	4	P2
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	4	P2
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	4	P2
-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	4	AB1
-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	4	AB1
-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	4	AB1
-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	4	AB1
-	-	-	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
-	-	-	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB2
ابيض	وردي	مائي	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB3
ابيض	وردي	مائي	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB3
ابيض	وردي	مائي	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB3
ابيض	وردي	مائي	ثخين	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	AB3
-	وردي	مائي	ثخين	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	4	S
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	4	S
مدمم	وردي	مائي	ثخين	++	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	4	S
مدمم	وردي	مائي	ثخين	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	4	S
-	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	1	C

+++ = شديد، ++ = معتدل، + = خفيف، - = عدم ظهور العلامة، G = الشكل المواتي، Gangrene = P، مجموعة العلاج بالبروبوليس، PI = العلاج بالبروبوليس بتركيز ١٠%، P2 = العلاج بالبروبوليس بتركيز ١٠%، AB = مجموعة لعلاج المضادات الحيوية، AB1 = العلاج بمزيج المضادات الحيوية (Mastijet Fort)، AB3 = العلاج بمزيج المضادات الحيوية (Mastijet Fort)، S = مجموعة الفعل التآزري للبروبوليس مع المضادات الحيوية، C = مجموعة السيطرة الحاوية على المادة المذيبة والمادة الحاوية فقط.

الذي نُصحَ به عند إجراء فحص الانتشار بالحفر على الزجاج والتي أتفقت نتائجها مع الدراسة التي أجراها (25) والتي أثبتت الفاعلية العالية لهذا التركيز من البروبوليس تجاه المكورات العنقودية الذهبية في الزجاج، إذ لم تتفق نتيجة التجربة الحقلية مع المختبر وذلك من خلال نتائج التورم والتصلب في نسيج الضرع والتورم في الغدة اللمفية فوق الثديية في النعاج الأربعة المعالجة في هذا التركيز، مع تحول لون الحليب من الوردى إلى المدمم في نعجتين من أصل ٤ نعاج عولجت بهذا التركيز من المضادات الحيوية مع وجود نمو جرثومي ببكتيريا المكورات العنقودية الذهبية. اعتماداً على تجربة حقلية أجرتها (26) على مرض التهاب الضرع في الأبقار، أثبتت فيها أن مرهم المضادات الحيوية الحاوي على (Procain Pencillin، Neomycin Sulfate، Streptomycin sulfate، Prednisolone) فعال تجاه بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، في حين لم يثبت مرهم المضادات الحيوية الحاوي على (Gentamycin) كفاءة عالية، وعلى هذا الأساس تم اختيار مرهم (Multiject) (AB1)، ولكن النتائج لم تتفق مع (26) وذلك لتطور الإصابة في الأشر المصابة للأربع نعاج المعالجة بهذا المرهم إلى التهاب لضرع المواشي في خلال ٥-٧ أيام من ظهور الإصابة، حيث أصيبت نعجتين بالتهاب الضرع المواشي ذو الشكل الجاف Dry Gangrene والذي تطور من أسخونة والاحمرار والتورم إلى برودة وتلون باللون الأزرق ثم تحول إلى اللون الأسود، أما الحليب فقد تحول من اللون الأبيض المائي إلى اللون الوردى ثم إلى اللون المدمم ثم أنقطع في اليوم السادس كلياً، أما النعجتين الأخرتين فقد أصيبت بالتهاب الضرع المواشي ذو الشكل الرطب Moist Gangrene والذي تميز بتكون الغاز في نسيج الضرع مع خروج غاز أثناء الحلب الشطر المصاب ومن هنا كان لابد من تغيير العلاج الموضعي بمضاد حيوي آخر. كما استخدم مرهم المضادات الحيوية (Mastijet) (Fort) (AB2) المصنع في شركة Intervet الهولندية والحواي على (Tetracycline، Neomycin، Bacitracin، prednisolone) في علاج الإصابة التجريبية لـ ٤ نعاج، حيث أظهرت النتائج حدوث تلييف وضمور في الأشر المصابة والمعالجة بهذا المرهم، مع انقطاع إفراز الحليب خلال الأسبوع الأول من العلاج بهذا المرهم، كما تم تجريب مرهم آخر وهو مرهم المضادات الحيوية (Mastilex) (AB3) الإسباني الحاوي على (Gentamycin و Cephalixin) حيث أثبت الـ Gentamycin فاعلية عالية تجاه نفس عترة المكورات العنقودية التي انتخبت لإحداث الإصابة التجريبية في فحص الحساسية في مختبر وهذا يتفق مع (23) و (22)، حيث أظهرت نتائج العلاج بهذا المرهم حدوث شفاء سريري في أشر النعاج المعالجة ماعدا وجود خثر في حليب النعجة الرابعة بعد أسبوع من انتهاء العلاج، في حين أشار وجود زرع بكتيري بجرثومة المكورات العنقودية الذهبية إلى فشل في الشفاء الجرثومي. أن العلاج الموضعي بمستحضر الفعل التآزري للبروبوليس لـ ٤ نعاج أحدث فيها التهاب الضرع التجريبي ببكتيريا المكورات العنقودية الذهبية، أدى إلى تطور

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إلى أن جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية كانت حساسة و بنسبة ١٠٠% لمضادى Ciprofloxacin و Gentamycin، بينما كانت كل العزلات مقاومة و بنسبة ١٠٠% لمضادى Ampicillin و Pencilline G، بينما سجل Lincomycin نسبة مقاومة ٨٣,٣٣%، بينما تراوحت نسب المقاومة لبقيّة المضادات الحيوية بين هذه النسب، وتشير نتائج الدراسة إلى أن أفضل المضادات الحيوية في تأثيرها على عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من التهاب الضرع في النعاج كان مضاد Ciprofloxacin وبفطر تثبيطي وصل إلى ٣٣ ملم، وفي مقارنة لدراسات سابقة على التهاب الضرع في النعاج في العراق ذكرت (٢٢) أن اختبار الحساسية لـ ٢٥ عزلة من المكورات العنقودية الذهبية أنها حساسة لمضادات الجنتاميسين والكلورمفينيكول والنايتروفيرازون والكاناميسين والأمبسيلين والنيوميسين، بينما وجد (٢٣) أن مضادات الجنتاميسين والنيوميسين والاريثروميسين والنايتروفيرازون والسيفالكسين كانت أكثر المضادات الحيوية كفاءته في حين كان الاموكسيسيلين و البنسلين ج أقلها كفاءة. وإن هذه النتائج تتفق مع (2) في إمكانية أحداث المرض تجريبياً على شرط أن يكون في نهاية مرحلة الإرضاع وبعد قليل من البكتيريا. تم تقييم الاستجابة العلاجية من خلال حدوث أو عدم حدوث الشفاء Cure للنعاج المصابة بالتهاب الضرع التجريبي المحدث ببكتيريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمضادات الحيوية والشديدة الضراوة على أساس الشفاء السريري Clinical Cure و الشفاء البكتيري Bacterial Cure إذ أظهرت النعاج المعالجة جهازياً بالحقن العضلي بالمضاد الحيوي Oxytetracycline وخافض الحرارة Metalgine و الأدوية المضادات للالتهاب Anti-inflammatory drug (Dexamethasone) استجابة سريرية جهازية لجميع النعاج المعالجة، إذ انخفضت درجة حرارة النعاج و ظهر تحسن في شهية الحيوان مع رجوع في سرعة التنفس و النبض إلى الطبيعي، مع ظهور اختلاف في الاستجابة العلاجية الموضعية للضرع بين المجاميع اعتماداً على نوع العلاج الموضعي Local Treatment وتركيزه وعلى النحو التالي:

تم العلاج الموضعي بمستحضر البروبوليس بتركيز ١% والذي هو التركيز الأقل أعراضاً جانبية على الضرع اعتماداً على فحص السلامة، هذا بالإضافة إلى أنه أعلى بمرتين ونصف من التركيز المثبط الأدنى MIC (٤, ٠%) للبروبوليس ضد بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (24)، حيث أظهر هذا التركيز (١%) عدم حدوث شفاء سريري في النعاج المعالجة وذلك من خلال استمرار التورم للشطر المصاب و تورم الغدة اللمفية فوق الثديية مع حدوث تغيرات في قوام ولون الحليب من اللون الوردى التخين إلى اللون المائي المدمم بعد أسبوع من انتهاء العلاج مع وجود زرع بكتيري بنفس عترة المكورات العنقودية الذهبية المستعملة في الحقن في حين لم يحدث تصلب أو سخونة أو احمرار في نسيج الضرع. أن ظهور هذه النتائج اضطرتنا إلى زيادة التركيز لمستحضر البروبوليس إلى ١٠% وهو التركيز

والمضافة إلى مرهم المضادات الحيوية (Mastilex)، حيث تعتبر المكورات العنقودية الذهبية من الجراثيم المفروزة لخطر الليفيين Fibrin clots في النسيج والقنوات الصغيرة في الضرع مما يؤدي إلى حدوث ضمور في نسيج الضرع و أعاقه مرور الدواء عبر قنوات الضرع (28). قد يعزى السبب من استمرار وجود علامات الالتهاب في نسيج الضرع المجاميع المعالجة إلى أن المركبات المضادة للالتهاب Anti-inflammatory Agents الموجودة طبيعياً في البروبوليس أو المضافة إلى المضادات الحيوية موضعية لم تكن كافية لمواجهة الالتهاب المتسبب عن الذيفانات الداخلية المفروزة من المكورات العنقودية الذهبية داخل الضرع، إذ أشار (29) إلى أهمية مضادات الالتهاب في علاج الشكل الحاد من التهاب الضرع السريري، حيث أن الأدوية المضادة للالتهاب تعمل من خلال تثبيط تصنيع eicosanoids والتي تشمل Prostaglandins و leukotienes و thromboxanes، حيث أن مادة الـ Archidonic acid التي توجد في غشاء خلية الثدييات هي المادة الأساسية التي تتشكل منها eicosanoids، وإن الذيفانات الداخلية للبكتيريا تعمل على تفعيل Phospholipase A2 الذي يتسبب في تحرير Archidonic acid من غشاء الخلية و الذي يؤدي إلى صناعة الـ eicosanoids، حيث أن Eicosanoids هو الذي يسهم في الالتهابات موضعية والجهازية مما يؤدي إلى فشل متعدد في الأعضاء والأجهزة Multiple Organs-Systems Failure كلايكل ٢٠٠.

#### المصادر

1. Saratsis, P., Leontides, L., Tzora, A., Alexopoulos, C., Fthenakis, G.C. (1998). Incidence risk and etiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in Southern Greece. Preventive Veterinary Medicine 37,173,183.
2. Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff K.W. and Constable, P.D. Veterinary Medicine, 10<sup>th</sup> edition. London, W.B. Saunders Company Limited. Reprint 2007.
3. Sears, P.M. and McCarthy, K.K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis in: Symposium on Mastitis. Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice. 19: 171-185.
4. Haddadin, M.S.; Nazer, I.; Robinson, P.K. (2008). Effect of Propolis on Two Bacterial Species with Probiotic Potential. Pakistan Journal of Nutrition 7(2): 391-394.
5. Kosalec, I.; Pepeljnjak, S.; Bakmaz, M. and Knezevic, S.V. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta. Pharm. 55: 423-430.
6. Hulielhel, M. and Isanu, V. (2002). Antiherpes Simplex Virus Effect of an Aqueous Extract of Propolis. Institute for Applied Bioscience, Ben-Gurion university of Neger, Beer Shera, Isreal. IMAJ Vol. 4:923-927.
7. Silici, C. and Koc, A.N. (2006). Comparative Study of in vitro methods to analyze the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with Superficial Mycosis. Letters in Applied Microbiology 43: 318-324.
8. Salomao, K.; Souza, E.M.; Pous, A.; Barbosa, H.S. and Castro, S.L. (2009). Brazilian green propolis: Effect In Vitro and In Vivo on Trypanosoma Cruzi. Evidence Based Complement Alternative Medicine 10:1-12.
9. Junior, A.F.; Balestrin, E.C.; Betoni, J.E.C.; Orsi, R.O.; Cunha, M.R. Montelli, A.C. (2005). Propolis: anti. Staphylococcus aureus and

الإصابة إلى التهاب الضرع المواتي في أحد النعاج المعالجة، بينما امتازت الحالات الأخرى بتورم وتصلب نسيج الضرع مع تورم للغدة اللمفية فوق الثديية، مع وجود إفرازات دموية في الحليب بعد أسبوع من انتهاء مدة العلاج، هذا بالإضافة إلى الفشل الجرثومي الناجم عن وجود زرع بكتيري بجرثومة المكورات العنقودية الذهبية في عينات الحليب المأخوذة. كانت نتيجة العلاج موضعي لنعجة السيطرة بالمادة المضادة والمادة الحاملة فقط إلى تطور في الإصابة موضعية إلى الشكل المواتي لالتهاب الضرع والذي كان من النوع الرطب Moist Gangrene، حيث حدث تطور من تورم واحمرار وسخونة وتضخم للغدة اللمفية فوق الثديية إلى التلون باللون الأزرق ثم الموت بعد ٥ أيام من ظهور الإصابة، أما قوام ولون الحليب فقد تطور من الأبيض المائي إلى اللون الدمدم ثم انقطع إفراز الحليب ليخرج غاز عند حلب الشطر المصاب. أن عدم حدوث شفاء جرثومي Bacterial Cure في جميع النعاج المعالجة موضعياً يعرض النعاج إلى خطر معاودة الإصابة Re-infection بعد الشفاء نتيجة تعرض النعاج إلى أي إجهاد Stress كالولادة وذلك لحدوث تثبيط في مناعة الحيوان (27). من خلال الجدول (١٠) نلاحظ تفوق لمجموعة العلاج موضعي بالـ (Mastilex) (AB3) في حدوث الشفاء السريري على باقي المجاميع وهذا يعود إلى حساسية الجرثومة للـ (Gentamycin) من خلال إجراء فحص الحساسية، في حين كان الشفاء السريري للمضادات الحيوية (Multiject) (AB1) هو الأسوأ من حيث الشفاء السريري مقارنةً بباقي المجاميع، ثم يليه مستحضر الفعل التآزري (S) وقد يعود الفشل في هذا المستحضر إلى الخطأ في اختيار المضادات الحيوية بالنسبة للجرثومة المحقونة حيث لو استخدم مضاد الـ Gentamycin كان من الممكن أن يعطي نتائج أفضل. أن المكورات العنقودية الذهبية هي من البكتيريا الشائعة التي يعزى لها الشكل المواتي من التهاب الضرع في الأبقار والأغنام، أما حدوث السمدمية هي نتيجةاً لسموم البكتيريا و تلف النسيج Tissue destruction (2). إن النوع الرطب من التهاب الضرع المواتي Moist Gangrene في نعجة السيطرة والفعل التآزري ونعجتين عُولجت بالمضادات الحيوية (Multiject) (حدث نتيجة الخمج الثانوي ببكتيريا الايشكريشيا القولونية E. coli والمطثيات Clostridium spp، الذي يعزى له تكوين الغاز Gas production و شدة الآفة Severity of Lesion، بينما حدث الشكل الجاف من التهاب الضرع المواتي في نعجتين من مجموعة العلاج بالمضادات الحيوية (Multiject) يعود إلى ضراوة بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية فقط من دون حدوث خمج ثانوي (2). أن حدوث تليف في نسيج ضرع النعاج المعالجة موضعياً بمرهم (Mastijet Fort) هو نتيجة عدم كفاءة المواد المحللة للتليف Fibrinolytic agent والتي غالباً ما تضاف في الأدوية المستخدمة في علاج التهاب الضرع وهذا يتفق مع ما ذكره (19)، في حين يثبت عدم حدوث تليف في أشطر ضرع النعاج المعالجة بالبروبوليس والمضادات الحيوية الأخرى إلى كفاءة المواد المحللة لليفيين الموجودة طبيعياً في البروبوليس

21. Park, E.H. and Kahug, J.H. (1999). Suppersive effects of propolis in rat adjuvant arthritis Arch. Pharm. Res. 22:554-558.
٢٢. العزي، عفاف عبد الرحمن (١٩٨٢). دراسة بعض جوانب التهاب الضرع الجرثومي في الأغنام. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
٢٣. الكبيسي، صلاح محمود عاشور (٢٠٠٠). التهاب الضرع الجرثومي والفطري في النعاج في منطقة القائم - محافظة الأنبار. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
٢٤. السلماني، علاء كامل محمود (٢٠٠٧). التأثير الحياتي لمركبات البروبوليس العراقي والهنكاري على إصابات الضرع وذات الرئة في الأبقار. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
٢٥. المحنه، علي محمد غازي. (٢٠٠٤). دراسة فاعلية خلاصة مادة البروبوليس الكحولي المحلي في علاج الجروح الخارجية المخموجة ببعض الجراثيم والفطريات الممرضة في الفئران. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
٢٦. الدليمي، إبراهيم جابر عبد (٢٠٠٥). دراسة تأثير التثبيطي لبعض المستخلصات نبات الكلغان *Silybum marianum* في نمو بعض الأحياء المجهرية الممرضة. رسالة ماجستير - كلية العلوم - جامعة بغداد.
27. Francis, P.G. (1989). Update of Mastitis III. Mastitis therapy. BR. Vet. J. 145: 302-311.
28. Sears, P.M. and McCarthy, K.K. (2003). Diagnosis of mastitis for therapy decisions in: Symposium on Mastitis. Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice 19: 93-108.
29. Erskine, R.J. ; Wanger, S. and Degraives F.J. (2003). Mastitis therapy of pharmacology in: Symposium on Mastitis. Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice. 19: 109-138.
30. Metersa, E. and Metersa, T. (1985). An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis in Cows. Medycyna Weterynaryjna 41: 92-489.
31. Kilic, A. ; BAysaller, M. ; Besirbelloglu, B. ; Salth, B. ; Sorkun, K. ; Tanyuksel, M. (2005). In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin. Resistance staphylococcus aureus and vancomycin. Resistance Enterococcus Faecium.
- synergism with antimicrobial drugs and Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 100(5) : 563-566.
10. U.S. FDA Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine (2009). Guidance Safety for Veterinary Pharmaceutical Products.
11. Krell, P.V. (1996). Value-Added products form Beekeeping. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, services bulletin. No. 124.
12. Aga, H. ; Shibuya, T. ; Hamada, S. ; Iritani, S. and Miyake, T. (1999). Propolis extract with improved water Solubility. United state patent, Number 5,922,324.
13. Bizarre Patent (2001). US Patent 4382886 Method for extraction propolis and water soluble dry propolis. United State Patent , Number 4382886.
14. Miles, A.A. ; Misra, S.S. and Irwin, J.O. (1938). The Estimation of bactericidal power of blood. J. Hyp. Camp., 38:739-749.
15. Allen, L.V. ; Popovich, N.G. and Ansel, H.C. (2005). Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System , 8<sup>th</sup> edition. Published by A Walters Kluwer Company.
16. Martindale (1973). The Extra Pharmacopeia. The Pharmaceutical Press, London.
17. Ziv, G. and Soback, S. (1989). Pharmacotherapeutics of newer antibacterial agents in lactating ewes and goats : a review, in proceedings of the fourth International Symposium on machine milking of Small Ruminants. Tel Aviv, Israel, PP. 408-423.
18. Gregory, E.H and Baggot, J.D. (1998). Development and Formulation of Veterinary dosage forms. 2<sup>nd</sup> Edition. Drugs and the Pharmaceutical Sciences , Vol.88. Published by Marcel Dekker. Allen, L.V. ; Popovich, N.G. and Ansel, H.C. (2005). Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System , 8<sup>th</sup> edition. Published by A Walters Kluwer Company.
19. British Pharmacopoeia (1999). Veterinary British Pharmacopoeia , 3<sup>rd</sup> Edition. Published by Stationary Office Ltd.
20. Ozturk, F. ; Kurt, E. ; Inan, U.U. ; Emiroglu, L. ; Ilker, S.S. (2000). The effect of propolis extract in experimental Chemical Corneal injury. Ophthalmic Res. , 32:13-18. Page: 1-10.